



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

Sborník souhrnů a plných textů konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2020

2. dubna 2020

Editor: Olga Mařátková, Irena Kolouchová

Praha 2020

Pořádající instituce:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Přípravný a organizační výbor:

doc. Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

doc. Ing. Olga Mat'átková, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani odbornou úpravou. Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020

ISBN 978-80-7592-070-6.

Obsah

Brázdová L.: Vyhledávání a charakterizace nových metabolitů s alkylprolinovým motivem ...	5
Husáková M.: Fenotypová variabilita endofytních kmenů rodu <i>Kocuria</i> izolovaných z <i>Vitis vinifera</i>	14
Kulišová M.: Identifikace, produkce a základní charakteristika endofytů révy vinné	22
Lucáková S.: Produktivita biomasy <i>Arthrospira maxima</i> ve třech typech kultivačních zařízení – tubulární, deskový a gas-lift fotobioreaktor	29
Lokočová K.: Antifungální aktivita kombinace pterostilbenu a amfotericinu B vůči biofilmu kvasinek rodu <i>Candida</i>	37
Maršík D.: Lidské monoaminoxidasy jako terapeutický cíl	38
Michailidu J.: Antimikrobiální aktivita stříbrných nanočástic syntetizovaných pomocí odpadů ze zpracování technického konopí	46
Miškovská A.: Antibakteriální aktivita zlatých nanočástic připravených pomocí extraktu z <i>Vitis vinifera</i>	50
Nguyenová T.T.M.: Zastoupení endofytů ve vinicích s odlišným přístupem pěstování	55
Poliačiková Z.: Mikrobiologický profil geotermálních a minerálních prameňov	65
Rollová M.: Vliv extraktů <i>Vitis vinifera</i> na celkovou biomasu biofilmu vybraných zástupců bakterií gastrointestinálního traktu	72
Timkina E.: Mikroorganismy rodu <i>Kocuria</i> izolované z extrémního prostředí	79
Vasyliuk A.: Vliv postřiků na fyziologický stav révy	89

SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ

Vyhledávání a charakterizace nových metabolitů s alkylnoprolinovým motivem

L. Brázdová^{1,2}, Z. Kameník², S. Kadlčík², J. Janata², J. Masák¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, ²Mikrobiologický ústav AV ČR

Abstrakt

Třída aktinobakterií, zejména pak rod *Streptomyces*, jsou nejvýznamnějšími producenty řady specializovaných biologicky aktivních metabolitů. Mezi tyto metabolity se řadí zejména velké skupiny polyketidů, neribozomálních peptidů a ribozomálně syntetizovaných post-translačně modifikovaných peptidů, ale také velké množství menších skupin strukturně neobvyklých metabolitů. Jednou z takových skupin se zabývá naše laboratoř - konkrétně se jedná o specializované metabolity s 4-alkyl-L-prolinovým motivem (APD látky). Tento poměrně vzácný motiv přispívá k lepším biologickým účinkům metabolitů, do nichž je inkorporován. Vyhledávání a charakterizace nových APD látek je proto slibným přístupem k rozšíření látek s potenciálním využitím v medicíně. To je naléhavé zejména v případě léčby bakteriálních infekcí, která se stále častěji komplikuje se zvyšující se rezistencí patogenních bakterií k dosud používaným antibiotikům. Naši laboratoři se povedlo identifikovat novou látku, intervencin, která patří do skupiny linkosamidových antibiotik, ale její 4-alkyl-L-prolinová jednotka je syntetizovaná ve zcela odlišné dráze než je tomu u dosud popsanych látek v této skupině. Konkrétně intervencin ve své struktuře obsahuje 4-methyl-L-prolin biosynteticky odvozený od L-leucinu, zatímco dosud známé linkosamidy obsahují proteinogenní L-prolin (např. celesticetin), a 4-ethyl-L-prolin nebo 4-propyl-L-prolin odvozený od L-tyrosinu (linkomycin A a B).

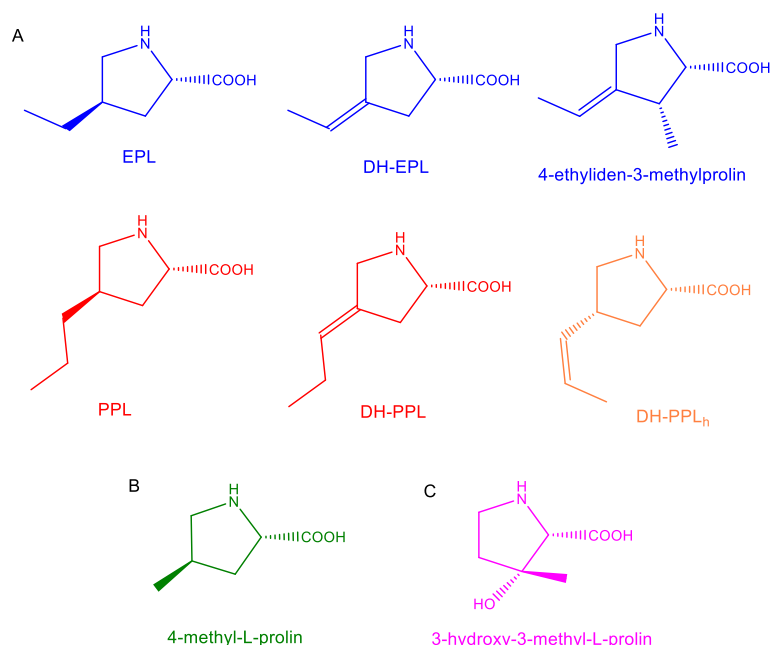
4-alkyl-L-prolinové deriváty

4-alkyl-L-prolinové deriváty (APD), které jsou produkovány zejména třídou aktinobakterií, mají strukturu velmi podobnou biogenní aminokyselině L-prolin, avšak jsou biosyntetizovány ze zcela jiných aminokyselin, jako je L-tyrosin, L-leucin nebo L-isoleucin (Höfer a kol., 2011; Hu a kol., 2007; Hurley a Gariola, 1979). Nejvíce a nejpodrobněji je popsána dráha, kdy APD jednotka vzniká z L-tyrosinu. Takováto APD jednotka může mít na pozici C4 různě dlouhý a satureovaný postranní alkylový řetězec. Na Obr. 1 jsou pak zobrazeny v části A vybrané APD s dvouuhlíkatým nebo tříuhlíkatým postranním řetězcem, které jsou biosyntetizovány z L-tyrosinu. Tyto APD jednotky mohou být následně

inkorporovány do různých struktur, jako jsou linkosamidy, pyrrolbenzodiazepiny (PBD) nebo hormaomycin (Gerratana, 2012; Höfer a kol., 2011; Zhao a kol., 2015; Janata a kol., 2018). Na základě porovnání struktur se k těmto látkám řadí také lucentamycin, který ve své struktuře má zabudován 4-ethyliden-3-methyl-L-prolin (Cha a kol., 2012). Biosyntéza této látky však nebyla dosud objasněna a není proto jasné, jakým způsobem tento APD prekurzor vzniká, zejména pak nevíme, zda k substituci 3-methyl skupinou dochází ještě před inkorporací APD, až po ní, nebo zda je lucentamycin produkován zcela jiným způsobem.

Biosyntézou z L-leucinu vzniká APD jednotka 4-methyl-L-prolin (Obr. 1B), která je inkorporována například do struktury griselimycinu (Lukat a kol., 2017). V případě polyoxyptidu A (látku účinná proti karcinomu pankreatu) je APD jednotka biosyntetizovaná z L-isoleucinu za vzniku 3-hydroxy-3-methyl-L-prolinu (Obr. 1C). Tato dráha nebyla dosud v odborné literatuře plně popsána, přestože Umezawa a kol. (2001) se snažili biosyntézu objasnit pomocí izotopově značených aminokyselin a Du a kol. (2014) predikovali na základě analýzy genového klastru některé kroky.

APD jednotka poskytuje z evolučního hlediska jistou výhodou. V případě linkosamidů a PBD se ukázalo, že zástupci těchto skupin s APD jednotkou vykazují lepší biologické vlastnosti v porovnání s analogy, které obsahují místo APD jednotky pouze aminokyselinu L-prolin. To je způsobeno 4-alkylovým řetězcem a jeho délkou, neboť významně zesiluje biologickou aktivitu. Biologické cíle a způsoby působení linkosamidů a PBD jsou zcela odlišné, proto lze usuzovat, že výhoda APD jednotky pro biologickou aktivitu je obecnější a mohla by tedy mít potenciál ve využití v klinické praxi i v případě jiných látek než linkosamidy a PBD (Janata a kol., 2018).



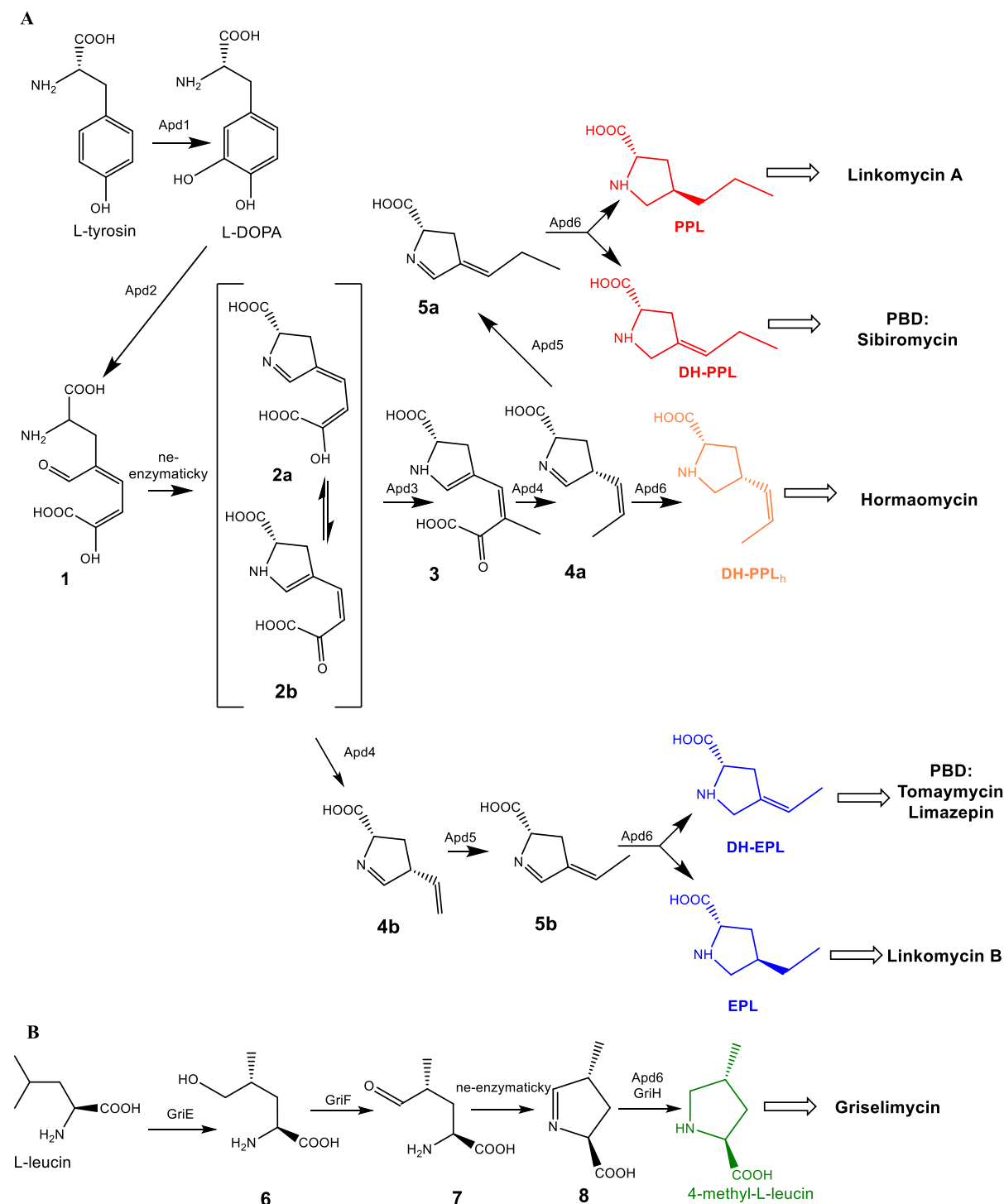
Obr. 1: Struktury vybraných APD. A – APD odvozené od L-tyrosinu: EPL – 4-ethyl-L-prolin, DH-EPL – 4-ethyliden-L-prolin, PPL – propyl-L-prolin, DH-PPL – 4-propyliden-L-prolin, DH-PPL_h – 4-propen-1-yl-L-prolin, 4-ethyliden-3-methyl-L-prolin, B – APD odvozené od L-leucinu: 4-methyl-L-prolin, C – APD odvozené od L-isoleucinu: 3-hydroxy-3-methyl-L-prolin

Biosyntéza APD jednotky

Biosyntéza APD jednotky odvozené od L-tyrosinu je katalyzovaná proteiny, které jsou kódovány až šesti geny *apd1* – *apd6* (Janata a kol., 2018). Schéma biosyntézy je pak naznačeno na Obr. 2A. První dvě katalyzované reakce převádějí L-tyrosin prostřednictvím L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) na intermediát **1**, který je poté neenzymaticky přeměněn na dikarboxylovou kyselinu **2** (Novotná a kol., 2004; Colabroy, 2016; Jirasková a kol., 2016). Tento intermediát může být následně C-methyltransferázou Apd3 methylován na postranním řetězci za vzniku intermediátu **3** (Jirasková a kol., 2016). Z intermediátu **3** popřípadě **2** je pomocí Apd4 odštěpen oxalát a vzniká tak intermediát **4**, u kterého není dosud potvrzena struktura (Jirasková a kol., 2016; Zhong a kol., 2017). Pořadí kroků, které jsou katalyzovány proteiny Apd3 a Apd4, je stále diskutováno (Zhong a kol., 2017; Kameník a kol., 2018). Předpokládá se, že isomeráza Apd5 katalyzuje krok k vytvoření intermediátu **5**, který byl již dříve identifikován v biosyntéze linkomycinu (Jirasková a kol., 2016), a je substrátem reduktázy Apd6 (Janata a kol., 2018; Steiningerová a kol., 2020). Právě Steiningerová a kol. (2020) se ve své studii zabývá proteiny Apd6, kdy v případě PBD dochází k redukci pouze endocyklické dvojné vazby, kdežto u linkosamidů dochází k redukci jak endo- tak exocyklické dvojné vazby. Rozdílná reakční specifita proteinů Apd6 tak zajišťuje plně saturované APD

v případě linkomycinu a naopak APD jednotku s jednou (nebo častěji dvěma v důsledku další dehydrogenační aktivity) dvojnou vazbou v případě PBD.

U linkosamidů, PBD a hormaomycinu, je APD jednotka biosyntetizovaná v dráze z L-tyrosinu, jak je popsáno výše, na rozdíl od griselimycinu, kdy APD jednotka vzniká z L-leucinu. Tato dráha (Obr. 2B) je kódovaná pouze třemi biosyntetickými geny. Na začátku této biosyntetické dráhy je L-leucin za pomoci GriE hydroxylován za vzniku intermediátu **6**, který je v následné reakci katalyzované GriH oxidován na intermediát **7**. Spontánní cyklizací s následnou redukcí proteinem GriH vzniká prekurzor 4-methyl-L-prolin (Lukat a kol., 2017). GriH reduktáza patří mezi Apd6 a je tak jediným Apd proteinem z L-tyrosinové dráhy, který je zapojen také do APD dráhy z L-leucinu. (Steiningerova a kol., 2020).



Obr. 2: A – schéma biosyntézy APD jednotky z aminokyseliny L-tyrosin, B – schéma biosyntézy APD jednotky z aminokyseliny L-leucin

Linkosamidy

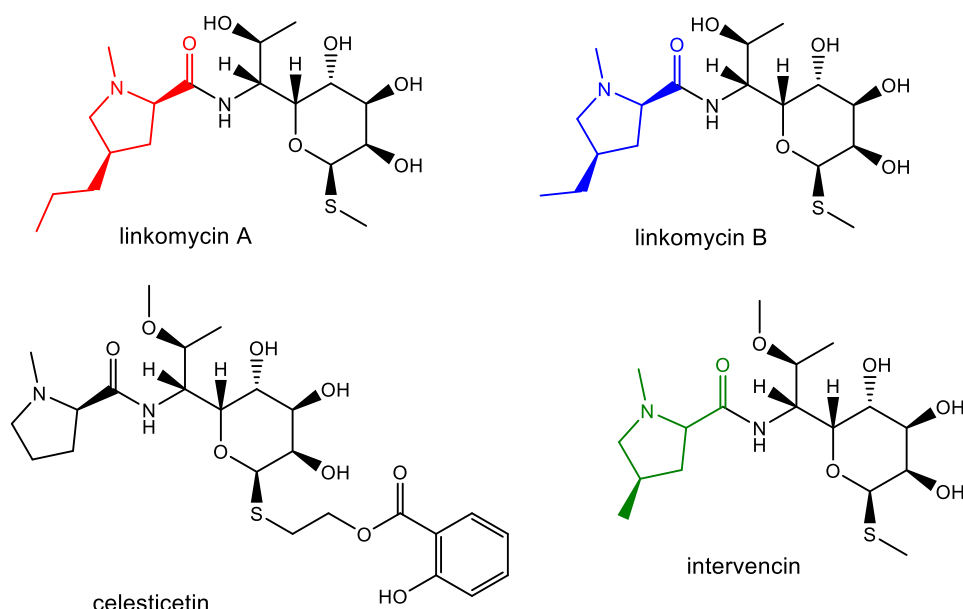
Linkosamidy jsou malou, ale významnou skupinou klinicky vyžívaných antibiotik. Právě na této skupině lze demonstrovat biologickou výhodu APD jednotky. Linkosamidy se

skládají jednak z APD jednotky popřípadě z aminokyseliny L-prolin a jsou spojeny peptidovou vazbou k neobvyklé aminosacharidové jednotce (Spizek a kol., 2004). Vybrané sloučeniny z této skupiny jsou pak zobrazeny na Obr. 3. Linkomycin A má ve své struktuře zabudovaný 4-propyl-L-prolin tedy APD jednotku s tříuhlíkatým postranním řetězcem, zatímco celesticetin má místo APD jednotky L-prolin. Bylo prokázáno, že celesticetin je méně účinný proti řadě mikroorganismů než je tomu u linkomycinu A (Spizek a Rezenka, 2017). Při porovnání linkomycinu A a linkomycinu B, který má APD jednotku pouze s dvouuhlíkatým postranním řetězcem (4-ethyl-L-prolin), bylo zjištěno, že linkomycin B dosahuje pouze 25% aktivity linkomycinu A (Pang a kol., 2015). Lze tedy usoudit, že s rostoucí délkou postranního alkylového řetězce se zvyšuje biologická aktivita (Janata a kol., 2018).

Linkosamidy se váží na 50S podjednotku bakteriálního ribozomu, kde zabraňují v prodloužení peptidového řetězce a inhibují tedy biosyntézu proteinů (Janata a kol., 2018). V humánní medicíně je využíván linkomycin při léčbě infekcích způsobených streptokoky, stafylokoky a pneumokoky, popřípadě je používán pro léčbu pacientů s alergickou reakcí na penicilin (Czarniak a kol., 2016). V klinické praxi je dále používán semisyntetický chlorovaný derivát klindamycin, který je účinný proti některým anaerobním bakteriím, ale i proti původcům malárie (Greenwood, 2010).

Intervencin

V naší laboratoři byla identifikována nová látka intervencin (Obr. 3), která je produkována bakteriálním kmenem *Rhodococcus* sp. 06-235-1A. Na základě analýzy genového klastru, kde byl nalezen homolog genu kódující enzym LmbD, který katalyzuje tvorbu amidové vazby mezi APD a aminosacharidovou jednotkou v biosyntéze linkomycinu. Jedná se o unikátní enzym právě pro linkosamidy, který neodpovídá žádnému proteinu v dostupných databázích, katalyzující analogickou reakci u jiných skupin látek. Na základě této analýzy a porovnání biosyntetických genových shluků intervencinu s ostatními genovými shluky linkosamidů jsme usoudili, že by se mělo jednat o nový linkosamid. Nebyly však nalezeny geny odpovídající biosyntéze APD jednotky z L-tyrosinu, ale byly objeveny geny kódující biosyntézu APD jednotky 4-methyl-L-prolin z aminokyseliny L-leucin, jako je tomu v případě griselimycinu, jehož biosyntéza APD jednotky je popsána výše. Intervencin je tedy prvním linkosamidem, který obsahuje APD jednotku syntetizovanou v dráze z L-leucinu (Guzman a kol., 2020).



Obr. 3: Struktury vybraných linkosamidů s červeně, modře nebo zeleně zvýrazněnou APD jednotkou

Závěr

Podařilo se rozšířit malou skupinu linkosamidů o další sloučeninu, intervencin, který je produkován kmenem *Rhodococcus* sp. 06-235-1A. K dosavadním látkám se zbudovaným 4-propyl-L-prolin (linkomycin A), 4-ethyl-L-prolin (linkomycin B) a L-prolinem (celesticetin) přibyla sloučenina s inkorporovaným 4-methyl-L-prolinem (intervencin). Lze však předvídat na základě struktury APD jednotky, která obsahuje v postranním řetězci pouze jeden uhlík, že tato látka nedosáhne biologické aktivity jako linkomycin. Jedná se o dosud první linkosamid obsahující ve své struktuře APD jednotku odvozenou od jiné aminokyseliny než je L-tyrosin. 4-methyl-L-prolin vzniká v biosyntetické dráze z aminokyseliny L-leucin. Rozšiřuje nám tedy způsoby biosyntézy APD jednotky u linkosamidů.

Literatura

- Colabroy K. L.** (2016) Tearing down to build up: Metalloenzymes in the biosynthesis lincomycin, hormaomycin and the pyrrolo 1,4 benzodiazepines. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1864(6), str. 724-737.
- Czarniak P., Boddy M., Sunderland B., Hughes J. D.** (2016) Stability studies of lincomycin hydrochloride in aqueous solution and intravenous infusion fluids. *Drug Design Development and Therapy*, 10, str. 1029-1034.
- Du Y., Wang Y., Huang T., Tao M., Deng Z., Lin S.** (2014) Identification and characterization of the biosynthetic gene cluster of polyoxypeptin A, a potent apoptosis inducer. *BMC Microbiology*, 14(30), str. 1471-2180.
- Gerratana B.** (2012) Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines. *Medicinal Research Reviews*, 32(2), str. 254-293.

- Greenwood D.** (2010) Lincosamides (Antibiotic and Chemotherapy) Elsevier, Londýn, str. 272-275.
- Guzman J., Kadlcik S., Kamenik Z., Brazdova L., Pavlikova M., Gazak R., Vimberg V., Zapal J., Kuzma M., Najmanova L., Janata J.** (2020) Intervencin, a lincosamide antibiotic mined from *Rhodococcus* genome. *Frontiers in Microbiology*, v přípravě.
- Höfer I., Crüsemann M., Radzom M., Geers B., Flachshaar D., Cai X., Piel J.** (2011) Insights into the Biosynthesis of Hormaomycin, An Exceptionally Complex Bacterial Signaling Metabolite. *Chemistry & Biology*, 18(3), str. 381-391.
- Hu Y., Phelan V., Ntai I., Farnet C. M., Zazopoulos E., Bachmann B. O.** (2007) Benzodiazepine Biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chemistry & Biology*, 14(6), str. 691-701.
- Hurley L. H. a Gairola C.** (1979) Pyrrolo(1,4)benzodiazepine Antitumor Antibiotics: Biosynthetic Studies on the Conversion of Tryptophan to the Anthranilic Acid Moieties of Sibiromycin and Tomaymycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(1), str. 42-45.
- Cha J. W., Park J., Sim T., Nam S., Kwon H. Ch., Del Valle J. R., Fenical W.** (2012) Structure Assignment of Lucentamycin E and Revision of the Olefin Geometries of the Marine-Derived Lucentamycins. *Journal of Natural Products*, 75 (9), str. 1648–1651.
- Janata J., Kamenik Z., Gazak R., Kadlcik S., Najmanova L.** (2018) Biosynthesis and incorporation of alkylproline-derivative (APD) precursor in complex natural products. *Royal Society of Chemistry*, 35, str. 257-289.
- Jiraskova P., Gazak R., Kamenik Z., Steiningerova L., Najmanova L., Kadlcik S., Novotna J., Kuzma M., Janata J.** (2016) New Concept of the Biosynthesis of 4-Alkyl-L-Proline Precursors of Lincomycin, Hormaomycin, and Pyrrolobenzodiazepines: Could a γ -Glutamyltransferase Cleave the C–C Bond? *Frontiers in Microbiology*, 7 (276).
- Kamenik Z., Gazak R., Kadlcik S., Steiningerova L., Rynd V., Janata J.** (2018) C-C bond cleavage in biosynthesis of 4-alkyl-Lproline precursors of lincomycin and anthramycin cannot precede C-methylation. *Nature Communications*, 9, v tisku, DOI 10.1038/s41467-018-05455-3.
- Lukat P., Katsuyama Y., Wenzel S., Binz T., Köning C., Blankenfeldt W., Brönstrup M., Müller R.** (2017) Biosynthesis of methyl-prolin containing griselimycins, natural products with antituberculosis activity. *Royal Society of Chemistry*, 8, str. 7521–7527.
- Novotna J., Honzatko A., Bednar P., Kopecky J., Janata J., Spizek J.** (2004) L-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradiol cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 271(18), str. 3678-3683.
- Pang A. P., Du L., Lin C. Y., Qiao J., Zhao G. R.** (2015) Co-overexpression of lmbW and metK led to increased lincomycin A production and decreased byproduct lincomycin B content in an industrial strain of *Streptomyces lincolnensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 199. str. 1064–1074.
- Spizek J., Novotna J., Rezenka T.** (2004) Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 56, str. 121-154.
- Spizek J. a Rezenka T.** (2017) Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology*, 133, str. 20–28.
- Steiningerova L., Kamenik Z., Gazak R., Kadlcik S., Bashiri G., Man P., Kuzma M., Pavlikova M., Janata J.** (2020) Different reaction specificities of F₄₂₀H₂-dependent reductases facilitate pyrrolobenzodiazepines and lincomycin to fit their biological targets. *Journal of the American Chemical Society*, 142, str. 3440–3448.
- Umezawa K., Ikeda Y., Kawase O., Naganawa H., Kondo S.** (2001) Biosynthesis of Polyoxypeptin A: Novel Amino Acid 3-hydroxy-3-methylproline derived from isoleucin. *The Royal Society of Chemistry*, 1, str. 1550-1553.

- Zhao Q., Wang M., Xu D., Zhang Q., Liu W.** (2015) Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature*, 518, str. 115–119.
- Zhong G. N., Zhao Q. F., Zhang Q. L., Liu W.** (2017) 4-alkyl-L-(Dehydro)proline biosynthesis in actinobacteria involves N-terminal nucleophile-hydrolase activity of gamma-glutamyltranspeptidase homolog for C-C bond cleavage. *Nature Communications*, 8, v tisku, DOI 10.1038/ncomms16109.

Fenotypová variabilita endofytních kmenů rodu *Kocuria* izolovaných z *Vitis vinifera*

M. Husáková¹, A. Palyzova², M. Vrublevskaya¹, I. Kolouchová¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; ²Mikrobiologický ústav, AV ČR

Abstrakt

Endofyty jsou asymptomatické mikroorganismy, které osidlují rostlinné tkáně a tvoří přirozený mikrobiom všech rostlin. Může se jednat o viry či houby, nejvyšší zastoupení však mají endofytní bakterie. Endofytní mikroorganismy přirozeně působí jako prvek podporující růst rostlin. Kromě toho mají i další benefiční vlastnosti, mohou rostlinám umožňovat lepší konkurenceschopnost a odolnost proti biotickým i abiotickým nepříznivým vlivům. Jedním z endofytních rodů izolovaným z *Vitis vinifera* (révy vinné) je rod *Kocuria*. Bakterie rodu *Kocuria* jsou grampozitivní, převážně aerobní mikroorganismy. Zástupci rodu *Kocuria* produkují biotechnologicky potenciálně využitelné sekundární metabolity, jako například pigmenty, antibiotika či exopolysacharidy.

Endofytní mikroorganismy

Pojem endofyt pochází z řeckých slov *endon* a *phyton*, což znamená „v rostlině“, jedná se tedy o mikroorganismy, které osidlují rostlinné tkáně a tvoří tak přirozený mikrobiom všech rostlin. Endofyty jsou asymptomatické mikroorganismy, jejich přítomnost rostlinu totiž nijak nepoškozuje a nezpůsobují jí ani žádné specifické příznaky infekce (Lata a kol., 2019). Vzájemný vztah mezi rostlinou a endofytním mikroorganismem může být symbiotický, mutualistický nebo komenzální (Ryan a kol., 2008).

Mikroorganismy se do rostlinných pletiv dostávají primárně skrz povrchové poškození rostliny, případně prostřednictvím kořenových vlásků (Lata a kol., 2019), proto jsou zastoupeny v nadzemních (fylosféra) i podzemních (rhizosféra) částech rostlin (Ryan a kol., 2008). Mohou se také vyskytovat v důsledku přirozeného růstu rostlin (Lata a kol., 2019). Jedná se hlavně o endofytní mikromycety či bakterie, výjimečně se můžeme setkat také s endofytními viry (Pancher a kol., 2012).

Endofytní mikroorganismy mohou sloužit jako prvek podporující růst a dobrý stav rostlin, a to prostřednictvím biologické fixace dusíku, stimulací a syntézou rostlinných hormonů, enzymů a dalších látek, produkcí sideroforů, čímž dochází k solubilizaci a sekvestraci železa z půdy, a solubilizací dalších minerálních látek, například fosforu, draslíku nebo zinku (Lata a

kol., 2019). Dále mohou být rostlinám prospěšné nepřímo, a to produkcí některých sekundárních metabolitů například s antimikrobiální nebo antifungální aktivitou. Tyto metabolity mohou nalézat uplatnění také v zemědělství, medicíně a průmyslu (Ryan a kol., 2008).

V zemědělské produkci je v posledních letech trend vyšších výnosů s nižšími dopady na životní prostředí a zdraví konzumentů, proto se nabízí využití mikrobiálních prostředků pro ochranu a podporu růstu jako alternativa ke konvenčním zemědělským technologiím. Poznání a porozumění významu a vlivu přirozeného mikrobiomu rostlin, jakož i rodového zastoupení endofytních mikroorganismů je tedy důležitým prvkem pro lepší, efektivnější a udržitelnější zemědělské a průmyslové využití rostlin (Compant a kol., 2019, Lata a kol., 2019).

Potencionálnímu využití endofytních mikroorganismů však brání obtížná kultivace mimo rostlinné tkáně a to především u bakterií osidlující kořenový systém rostlin, jež jsou z velké části nekultivovatelné bez přítomnosti hostitelské rostliny (Reinhold-Hurek a Hurek, 2011).

Endofytní bakterie ve *Vitis vinifera*

Vitis vinifera patří mezi jednu z nejstarších kulturních plodin, její první pěstování je datováno již do období 8500 – 4000 let před naším letopočtem. Dnes se jedná o jednu z nejrozšířenější pěstovaných rostlin. Ve *Vitis vinifera* jako i ve všech rostlinách byly identifikovány endofytní mikroorganismy. Mezi hlavní endofyty révy patří mikromycety a bakterie. Endofytní bakterie vyskytující se ve *Vitis vinifera* taxonomicky patří mezi *Actinobacteria* případně *Gammaproteobacteria*. Nejvyšší zastoupení mají rody *Pseudomonas*, *Bacillus* a *Pantoea*, dále byly identifikovány například rody *Streptomyces*, *Curtobacterium*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Chryseomonas*, *Burkholderia*, nalézt v pletivech révy však můžeme i mnohé další (Andreolli a kol., 2016, Bulgari a kol., 2009, Campisano a kol., 2014, Pancher a kol., 2012, Vitulo a kol., 2019, West a kol., 2010).

Obecná charakteristika rodu *Kocuria*

Bakterie rodu *Kocuria* patří mezi grampozitivní bakterie (Stackebrandt a kol., 1995). Taxonomicky se řadí do řádu *Micrococcales* a čeledi *Micrococcaceae*, mezi další rody čeledě patří rod *Micrococcus*, rod *Acaricomes*, rod *Arthrobacter*, rod *Citricoccus*, rod *Nesterenkonia*, rod *Renibacterium*, rod *Rothia*, rod *Sinomonas*, rod *Yaniella* a rod *Zhihengliuella* (Pribham a kol., 2012).

Jedná se o nezapouzdřené, nepohyblivé koky, které netvoří endospory (Stackebrandt a Schumann, 2015). Zástupci rodu *Kocuria* jsou převážně aerobní (některé druhy mohou být mírně fakultativně anaerobní, případně mohou mít potenciál žít v striktně anaerobních podmínkách (Takarada a kol., 2008)), mezofilní, kataláza pozitivní, obecně nehalofilní (Stackebrandt a kol., 1995) a chemoorganotrofní mikroorganismy (Stackebrandt a Schumann, 2015).

Ochranný efekt produkovaných pigmentů proti UV záření a tvar koků umožňuje zástupcům rodu *Kocuria* přežití daleko od původního stanoviště, jako v případě bakterie nalezené na Panenských ostrovech, která se původně vyskytovala v prachu Sahary (Stackebrandt a Schumann, 2015).

Optimální růstové podmínky se pro jednotlivé druhy liší, většina roste v rozmezí teplot 20 — 37 °C (*K. aegyptia* až do 40 °C, *K. marina* do 43 °C, *K. polaris* a *K. marina* při 5 °C, *K. polaris* a *K. palustris* nerostou při 37 °C). Obecně vyžadují lehce zásadité pH. Typovým druhem rodu *Kocuria* je *Kocuria rosea*. Rod *Kocuria* se skládá z více než 20 zatím známých a klasifikovaných druhů, z nichž některé druhy obsahují několik kmenů. Jednotliví zástupci rodu *Kocuria* jsou si velmi blízce příbuzní. Podle sekvence genu pro 16S rRNA lze odlišit dvě osamocené linie a dva klastry druhů. Jednotlivé druhy byly izolovány z masa, mléka, pokožky savců, mořského sedimentu, vody, půdy (chladné, temperované i pouštní), z nadzemních (fylosféra) i podzemních (rhizosféra) částí rostlin (Stackebrandt a Schumann, 2015). Zástupci rodu *Kocuria* patří mezi bakterie resistantní k ionizujícímu záření, byly izolovány z různých prostředí, kde jsou vystaveny vysokému množství rentgenového záření a gama záření (Gholami a kol., 2015). Dalšími takovými rody jsou *Deinococcus*, *Acinetobacter*, *Chroococcidiopsis*, *Hymenobacter*, *Kineococcus* a *Methylobacterium* (Brooks a Murray, 1981). Resistence těchto mikroorganismů k ionizačnímu záření představuje komplikaci při sterilaci potravin a dalších materiálů (Gholami a kol., 2015).

Bakterie rodu *Kocuria* mají peptidoglykanové uspořádání buněčné stěny $_L$ -Lys-Ala₃₋₄ typ A3 α , neobsahují mykolovou a teichoovou kyselinu, hlavní zastoupenou mastnou kyselinou je C_{15:0} anteiso pentadekanová kyselina. Převažující aminosacharidy tvořící buněčnou stěnu jsou galaktosamin a glukosamin. Polární lipidy se skládají z difosfatidylinositolu a fosfatidylglycerolu (Stackebrandt a kol., 1995). Menachinony jsou hydrogenovány (dominantní je MK-7 (H₂) a MK-8 (H₂) nebo MK-9 (H₂)), tedy menachinony s 7 až 9 isoprenoidními jednotkami (Stackebrandt a Schumann, 2015). Obsah G+C bazí v DNA se pohybuje mezi 66—75 mol% v závislosti na druhu (Stackebrandt a kol., 1995).

Pigmenty produkované rodem *Kocuria*

Kocuria marina produkuje β -kryptoxanthin, což je karotenoidní barvivo. Vykazuje přibližně stejnou antioxidační aktivitu jako kyselina askorbová, z tohoto důvodu má široké uplatnění jako nutraceutikum, potravinářské aditivum nebo také v dalších oblastech (Kumar Samanta a kol., 2016). Pigmenty produkované bakterií *Kocuria* sp. mají potenciální využití také ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, protože vykazují antimikrobiální aktivitu (testováno s pozitivním výsledkem na *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* (Mulik a kol., 2017), *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* a *Shigella dysenteriae* (Saxena, 2014)). Na produkci pigmentů má vliv několik parametrů. V případě produkce karotenoidních barviv kmenem *Kocuria* sp. BRI 36 dochází k nejvyšší produkci při 10 °C a pH 7,5 (*Kocuria carniphila* MY a *Kocuria polaris* MO také produkují karotenoidy při 10 °C a za neutrálního pH (Yusef a kol., 2014)). Dalším sledovaným parametrem na produkci pigmentů byla přítomnost těžkých kovů. Se vzrůstajícím obsahem těžkých kovů dochází ke snížení produkce pigmentů. Tento jev by bylo možné využít k vývoji biosensorů pro detekci přítomnosti těžkých kovů a případné kontaminace prostředí těžkými kovy (v případě Pb^{2+} a Cd^{2+} byl však pozorován pozitivní vliv na produkci pigmentů) (Mulik a kol., 2017).

Exopolysacharidy produkované rodem *Kocuria*

Extracelulární polymerní látky (Extracellular polymeric substances (EPS)) jsou látky vylučované mikroorganismy do svého okolí. Obvykle se jedná o polysacharidy (exopolysacharidy) nebo peptidy. Produkce EPS je ovlivněna okolním prostředím, ve kterém se daný mikroorganismus vyskytuje, například pH, teplotou nebo koncentrací iontů kovů (Kilic a Donmez, 2008). Mohou mít protirakovinné, antivirotické, antioxidační a imunomodulační vlastnosti (Lee a kol., 2009, Okutni, 1984, Sun a kol., 2004). Exopolysacharidy jsou důležitým prvkem při agregaci buněk, tvorbě biofilmu nebo zadržování vody v buňkách (Zhang a kol., 2006). Funkční skupiny exopolysacharidů, jako například karboxylová nebo hydroxylová skupina, usnadňují chelataci iontů kovů, což nahrává využití mikroorganismů produkujících EPS při odstraňování znečištění těžkými kovy z životního prostředí (Kilic a Donmez, 2008).

Kocuran je exopolysacharid produkovaný *Kocuria rosea* BS-1. Skládá se ze sacharidů (91 %) a z uronové kyseliny (9 %), sacharidická část je tvořena glukózou, galaktózou, manózou a glukuronovou kyselinou (Kumar a Sujitha, 2014). Má antioxidační a imunosupresivní vlastnosti. Inhibuje sekreci komponenty C3 makrofágů, čímž reguluje imunitní odpověď, může proto být využit při léčbě autoimunitních onemocnění (Carroll, 1998).

Dalším druhem produkujícím EPS je *K. turfanensis*, která produkuje EPS s působením jako biosurfaktant. Biosurfaktanty jsou povrchově aktivní látky, které mají proti syntetickým tenzidům výhodu v snazší biologické odbouratelnosti a nižší toxicitě. V případě biosurfaktantu produkovaného *K. turfanensis* se jedná o látku, která je schopna emulgovat pesticidy za extrémních podmínek (Dubey a kol., 2012).

Antibiotika produkované rodem *Kocuria*

Vzhledem k rozvíjející se resistenci některých patogenních kmenů k antibiotikům dochází k výzkumu a vývoji nových efektivních druhů antibiotik. Jedním z vhodných prostředí k výzkumu je také moře, které představuje bohatý zdroj nedefinovaných bakterií a hub produkujících biologicky aktivní sekundární metabolity využitelné k produkci antibiotik (Uzair a kol., 2018).

Jedním z mikroorganismů využitelných k produkci antibiotik je *Kocuria marina*. Jedná se o kmen *Kocuria marina* CMG S2 izolovaný z hnědé řasy *Pelvetia canaliculata*. Tento kmen produkuje látku kocumarin, což je derivát benzoové kyseliny (Uzair a kol., 2018). Heterocyklické sloučeniny mají významný vliv na regulaci biologické aktivity. Benzoová kyselina, jako nejjednodušší aromatická kyselina je známá svými antimikrobiálními účinky (Uzair a kol., 2018). Proto se také používá jako konzervant v potravinářství (Velíšek a Hajšlová, 2009). Kocumarin má potenciál širokospektrálního antibiotika, má dobrý inhibiční efekt pro více než 15 druhů bakterií či mikromycet, včetně klinicky relevantních kmenů G⁺ i G⁻ bakterií a sporulujících mikromycet (Uzair a kol., 2018).

Kocurin je peptid odvozený od thiazolu. Thiazolové peptidy vznikají při kaskádě posttranslačních modifikací z reziduí pre-peptidových prekurzorů (Walsh a kol., 2010). Kocurin byl izolován z mikroorganismu *Kocuria palustris*, který se vyskytuje v moři. Byl nalezen v izolátech nezávisle na jejich geografickém původu, což nahraňuje širokou distribuci této sloučeniny (Palomo a kol., 2013). Biologická aktivita této látky byla testována na grampozitivních i gramnegativních bakteriích a mikromycetách. Bylo zjištěno, že kocurin inhibuje růst MRSA (meticilin resistantní *Staphylococcus aureus*) (Martin a kol., 2013), které mají největší podíl na infekcích vedoucí k úmrtí pacienta (Klevens a kol., 2007). Kocurin vykazuje také antibakteriální aktivitu k patogenním mikroorganismům *Bacillus subtilis* a *Enterococcus faecium* (Martin a kol., 2013).

Kocuria varians izolovaná z fermentovaných salámů produkuje lantibiotikum variacin (O'Mahony a kol., 2001). Jedná se o peptid s antimikrobiálními účinky, jehož působení je podobné známějšímu nisinu (Beuchat a kol., 1997, Scott a Taylor, 1981). Inhibuje patogenní

organismy vyskytující se v kojenecké výživě a v dalších sušených mléčných výrobcích, jakými jsou například *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* nebo *Clostridium botulinum* (Pridmore a kol., 1996). Jeho možné využití je jako konzervant v mléčných výrobcích. Je totiž stabilní při vysokých teplotách, takže nedochází k jeho degradaci během pasterace potravin (O'Mahony a kol., 2001), a také při širokém rozmezí pH (při hodnotách 2–10 (Pridmore a kol., 1996)), což nahrává využití v sýrařském průmyslu (O'Mahony a kol., 2001).

Závěr

Mikroorganismy jsou všudypřítomné, nevyskytují se pouze v životním prostředí, ale jsou také součástí vnitřního prostředí různých typů organismů. Mezi takové mikroorganismy patří endofyty, jež jsou zastoupeny v nadzemních (fylosféra) i podzemních (rhizosféra) částech rostlin (Ryan a kol., 2008). Endofytní mikroorganismy mohou podporovat růst rostlin. Dále mohou být rostlinám prospěšné nepřímo, a to produkcí některých sekundárních metabolitů například s antimikrobiální nebo antifungální aktivitou (Ryan a kol., 2008).

Jedním ze známých endofytních rodů je rod *Kocuria* (Andreolli a kol., 2016). Aktuálně je popsáno více než 20 druhů, které se vzájemně liší na základě sekvence genů pro 16S rRNA a některých chemotaxonomických vlastností (Stackebrandt a Schumann, 2015). Někteří zástupci rodu *Kocuria* produkují využitelné sekundární metabolity, například pigmenty (Kumar Samanta a kol., 2016), exopolysacharidy (Carroll, 1998, Dubey a kol., 2012) nebo látky s antibakteriálními účinky (Palomo a kol., 2013, Pridmore a kol., 1996, Uzair a kol., 2018).

Poděkování za podporou GAČR v rámci projektu 18-26463S.

Literatura

- Andreolli, M., Lampis, S., Zapparoli, G., Angelini, E. a Vallini, G.** (2016) Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiol Res*, 183, str. 42-52.
- Beuchat, L. R., Clavero, M. R. a Jaquette, C. B.** (1997) Effects of nisin and temperature on survival, growth, and enterotoxin production characteristics of psychrotrophic *Bacillus cereus* in beef gravy. *Appl Environ Microbiol*, 63, str. 1953-1958.
- Brooks, B. W. a Murray, R. G. E.** (1981) Nomenclature for “*Micrococcus radiodurans*” and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 31, str. 353-360.
- Bulgari, D., Casati, P., Brusetti, L., Quaglino, F., Brasca, M., Daffonchio, D. a Bianco, P. A.** (2009) Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *J Microbiol*, 47, str. 393-401.

- Campisano, A., Antonielli, L., Pancher, M., Yousaf, S., Pindo, M. a Pertot, I.** (2014) Bacterial endophytic communities in the grapevine depend on pest management. *PLoS One*, 9, str. e112763.
- Carroll, M. C.** (1998) The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*, 16, str. 545-568.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H. a Sessitsch, A.** (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res*, 19, str. 29-37.
- Dubey, K. V., Charde, P. N., Meshram, S. U., Shendre, L. P., Dubey, V. S. a Juwarkar, A. A.** (2012) Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanesis* strain-J at extreme environmental conditions. *Bioresour Technol*, 126, str. 368-374.
- Gholami, M., Etemadifar, Z. a Bouzari, M.** (2015) Isolation a new strain of *Kocuria rosea* capable of tolerating extreme conditions. *J Environ Radioact*, 144, str. 113-119.
- Kilic, N. K. a Donmez, G.** (2008) Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp. *J Hazard Mater*, 154, str. 1019-1024.
- Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L. H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J. M., Craig, A. S., Zell, E. R., Fosheim, G. E., McDougal, L. K., Carey, R. B. a Fridkin, S. K.** (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama*, 298, str. 1763-1771.
- Kumar, C. G. a Sujitha, P.** (2014) Kocuran, an exopolysaccharide isolated from *Kocuria rosea* strain BS-1 and evaluation of its in vitro immunosuppression activities. *Enzyme Microb Technol*, 55, str. 113-120.
- Kumar Samanta, A., Chaudhuri, S. a Dutta, D.** (2016) Antioxidant efficacy of carotenoid extract from bacterial strain *Kocuria marina* DAGII. *Mater Today Proc*, 3, str. 3427-3433.
- Lata, R. K., Divjot, K. a Nath, Y. A.** (2019) Endophytic microbiomes: Biodiversity, ecological significance and biotechnological applications. *Res J Biotechnol*, 14, str. 142-162.
- Lee, H. H., Lee, J. S., Cho, J. Y., Kim, Y. E. a Hong, E. K.** (2009) Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of *Lentinus edodes*. *J Microbiol Biotechnol*, 19, str. 566-572.
- Martin, J., da, S. S. T., Crespo, G., Palomo, S., Gonzalez, I., Tormo, J. R., de la Cruz, M., Anderson, M., Hill, R. T., Vicente, F., Genilloud, O. a Reyes, F.** (2013) Kocurin, the true structure of PM181104, an anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) thiazolyl peptide from the marine-derived bacterium *Kocuria palustris*. *Mar Drugs*, 11, str. 387-398.
- Mulik, A., Kumbhar, P. a Bhadekar, R.** (2017) Production and partial characterization of pigments produced by *Kocuria* sp BRI 36: Influence of heavy metals. *Int J Pharm Pharm Sci*, 9, str. 137-145.
- O'Mahony, T., Rekhif, N., Cavadini, C. a Fitzgerald, G. F.** (2001) The application of a fermented food ingredient containing 'variacin', a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *J Appl Microbiol*, 90, str. 106-114.
- Okutni, K.** (1984) Antitumor and immunostimulant activities of polysaccharide produced by a marine bacterium of the genus *Vibrio*. *NIPPON SUISAN GAKK*, 50, str. 1035-1037.
- Palomo, S., Gonzalez, I., de la Cruz, M., Martin, J., Tormo, J. R., Anderson, M., Hill, R. T., Vicente, F., Reyes, F. a Genilloud, O.** (2013) Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. *Mar Drugs*, 11, str. 1071-1086.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I. a Campisano, A.** (2012) Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. *Appl Environ Microbiol*, 78, str. 4308-4317.

- Pribham, E., Stackebrandt, E., Rainey, F. A. a Ward-Rainey, N. L.**, (2012), *Micrococcaceae* (Bergey's manual of systematics of *Archaea* and *Bacteria*, Whitman, W. B.; Rainey, F.; Kämpfer, P.; Trujillo, M.; Chun, J.; DeVos, P.; Hedlund, B.; Dedysh, S., Eds.).
- Pridmore, D., Rekhif, N., Pittet, A. C., Suri, B. a Mollet, B.** (1996) Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to lacticin 481 of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 62, str. 1799-1802.
- Reinhold-Hurek, B. a Hurek, T.** (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol*, 14, str. 435-443.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J. a Dowling, D. N.** (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett*, 278, str. 1-9.
- Saxena, J.** (2014) Antimicrobial activity by pigmented psychrotrophic bacterial isolates. *Indian J Appl Res*, 4, str. 70-73.
- Scott, V. N. a Taylor, S. L.** (1981) Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J Food Sci*, 46, str. 117-126.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. a Schumann, P.** (1995) Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermaococcus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J Syst Bacteriol*, 45, str. 682-692.
- Stackebrandt, E. a Schumann, P.**, (2015), *Kocuria* (Bergey's manual of systematics of *Archaea* and *Bacteria*, Whitman, W. B.; Rainey, F.; Kämpfer, P.; Trujillo, M.; Chun, J.; DeVos, P.; Hedlund, B.; Dedysh, S., Eds.).
- Sun, C., Wang, J.-W., Fang, L., Gao, X.-D. a Tan, R.-X.** (2004) Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp. YS 4108. *Life Sci J*, 75, str. 1063-1073.
- Takarada, H., Sekine, M., Kosugi, H., Matsuo, Y., Fujisawa, T., Omata, S., Kishi, E., Shimizu, A., Tsukatani, N., Tanikawa, S., Fujita, N. a Harayama, S.** (2008) Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *J Bacteriol*, 190, str. 4139-4146.
- Uzair, B., Menaa, F., Khan, B. A., Mohammad, F. V., Ahmad, V. U., Djeribi, R. a Menaa, B.** (2018) Isolation, purification, structural elucidation and antimicrobial activities of kocumarin, a novel antibiotic isolated from actinobacterium *Kocuria marina* CMG S2 associated with the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*. *Microbiol Res*, 206, str. 186-197.
- Velíšek, J. a Hajšlová, J.**, (2009), *Chemie potravin*. OSSIS: 580 stran.
- Vitulo, N., Lemos, W. J. F., Calgaro, M., Confalone, M., Felis, G. E., Zapparoli, G. a Nardi, T.** (2019) Bark and grape microbiome of *Vitis vinifera*: Influence of geographic patterns and agronomic management on bacterial diversity. *Front Microbiol*, 9, str. 12.
- Walsh, C. T., Acker, M. G. a Bowers, A. A.** (2010) Thiazolyl peptide antibiotic biosynthesis: a cascade of post-translational modifications on ribosomal nascent proteins. *J Biol Chem*, 285, str. 27525-27531.
- West, E. R., Cother, E. J., Steel, C. C. a Ash, G. J.** (2010) The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can J Microbiol*, 56, str. 209-216.
- Yusef, H. H., Belal, M. A. a El-Sharouny, E. E.** (2014) Production of natural pigments from novel local psychrotolerant *Kocuria* spp. *Life Sci J*, 11, str. 500-507.
- Zhang, D., Wang, J. a Pan, X.** (2006) Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. *J Hazard Mater*, 138, str. 589-593.

Identifikace, produkce a základní charakteristika endofytů révy vinné

M. Kulišová, M. Vrublevskaya, I. Kolouchová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Réva vinná (*Vitis vinifera*) patří již od středověku mezi hospodářsky nejvýznamnější plodiny. Využití nachází zejména ve výrobě vína, na kterou je spotřebován nejvyšší podíl sklizených hroznů. Stejně jako u jiných rostlin, jsou rostlinná pletiva révy vinné osídlena různými typy mikroorganismů. Tyto organismy mohou být epifytní, tedy povrchové, nebo osidlující vnitřní pletiva, tedy endofytní. Endofytní mikroorganismy jsou pro svého hostitele prospěšné v mnoha ohledech, zejména jako obrana vůči cizím fytopatogenům prostřednictvím produkce rozmanitých metabolitů. Tyto látky mohou sloužit jako slibné zdroje nových přírodních produktů pro léčebné, zemědělské a průmyslové využití.

Endofyty

Pojem endofyt byl poprvé použit v roce 1866 německým mykologem Antonem de Barym, který popsal endofytní houby jako parazitické druhy žijící uvnitř rostlinných pletiv (Bary, 1866). V současnosti je endofyt definován jako asymptomatický mikroorganismus, který kolonizuje vnitřní pletiva rostlin. Vztah mezi endofytem a rostlinou může být patogenní, ale především se vyskytuje vztah neutrální, oboustranně prospěšný (mutualismus) nebo jednostranně prospěšný (komensalismus) (Strobel a kol., 2004).

Molekulární podstata endofytních interakcí je na rozdíl od patogenních velmi málo prozkoumána. Zatím není prokázáno, zda tyto interakce mají společný původ, ačkoliv existují důkazy o přítomnosti řady příznivých vlivů endofytů na život rostliny. Podpora růstu může být dosažena mikrobiální produkcí regulátorů růstu rostlin, jako jsou auxiny, cytokininy a gibereliny. Endofyty mohou potlačit syntézu ethylenu ve stresových podmínkách 1-aminocyklopropan-1-karboxylát (ACC) deaminasovou aktivitou, dusíkaté a jiné živiny mohou být činností endofytů dostupné pro rostlinu ve vyšší míře pomocí biologické fixace dusíku. Dále mohou endofyty zajišťovat rostlině ochranu vůči patogenům indukcí řady obranných mechanismů (Hurek a Hurek, 2011). Zlepšení fyziologického stavu rostliny

a konkurenceschopnosti vůči ostatním rostlinám podporují endofyty zvýšením klíčivosti nebo zlepšením absorpce nutričních prvků hostitelem. Navíc díky přítomnosti endofytů s vhodnými systémy degradace, chelatace nebo sekvestrace kovů, mají rostliny vyšší toleranci k přítomnosti těžkých kovů a lépe přežívají v kontaminovaných půdách (Aly a kol., 2011).

Endofytní diverzita

Přítomnost asymptomatických endofytních mikroorganismů v rostlinách je známa již téměř dvě století. Svého významu však dosáhly až v nedávné minulost pro své komerční a průmyslové využití. Nejvíce zastoupenou skupinou endofytních mikroorganismů jsou bakterie, ze kterých nejvýznamnější zástupci spadají do třech hlavních kmenů (*Actinobacteria*, *Proteobacteria* a *Firmicutes*) a zahrnují členy rodů *Azoarcus*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* a *Streptomyces*. Další zástupce endofytů můžeme hledat mezi mikroskopickými houbami. Spojení fungálních endofytů a hostitelských rostlin je považováno za nevyhnutelné a unikátní. Mnoho vědců se domnívá, že houby kolonizující zdravé listy, stonky, kořeny a reprodukční orgány hostitele významně ovlivňují fyziologii, ekologii a reprodukční biologii hostitelských rostlin. Existují dostatečné důkazy, které dokazují, že endofytní houby poskytují hostitelům ochranu před hmyzem, škůdci, býložravci, stresovým působením a dalšími nepříznivými vlivy. Na oplátku dostávají výživu, optimální prostředí a propagační příležitosti uvnitř hostitelského organismu (Maheshwari, 2017).

Sekundární metabolity produkované endofyty

Živé organismy produkují obrovské množství nejrozličnějších metabolitů. Většina z nich pochází z rostlin, ale bohatým zdrojem jsou také mikroorganismy. Endofyty vykazují významnou chemickou rozmanitost tvorby sekundárních metabolitů, což je příčinou jejich značného biotechnologického potenciálu. Představují relativně slabě prozkoumaný a atraktivní zdroj přírodních produktů vhodných k využití v lékařství, zemědělství a průmyslu (González a Tello, 2011). Endofyty syntetizují metabolity pro soužití s hostitelem, dalšími endofyty a patogeny za účelem kolonizace hostitele a zajištění výživy (Clay, 1988). Působí jako hlavní zdroje strukturně jedinečných, biologicky aktivních přírodních metabolitů jako jsou alkaloidy, benzopyranony, benzochinony, flavonoidy, fenoly, steroidy, terpenoidy, tetralony a xanthony. Funkce těchto sloučenin mohou být antibakteriální, antifungální, antivirové, cytotoxické a imunosupresivní. Tyto bioaktivní metabolity mají široký potenciál výzkumu nových využití a mohou hrát klíčovou roli při léčbě řady závažných chorob. Endofyty také produkují značné

množství antioxidantů, které zabraňují oxidačnímu poškození buněčných složek (Wiyakrutta a kol., 2004).

Látky produkované endofyty často souvisí s podporou rostlinného růstu. Mechanismy, které mikroorganismy používají k podpoře růstu rostlin, lze obecně rozdělit do dvou kategorií – přímé a nepřímé. Přímé mechanismy jsou ty, kde endofyty aktivně a přímo poskytují živiny a další látky, které jsou nezbytné pro růst rostlin nebo modulaci hladiny rostlinných hormonů. V případě nepřímých mechanismů endofyty zabraňují inhibici růstu způsobenou různými patogenními původci. Nepřímé mechanismy zahrnují produkci lytických enzymů, antibiotik, sideroforů, indukci systémové rezistence, změnu hladin ethyleny a přímou konkurenci s fytopatogeny (Glick, 2012).

Sekundární metabolity s antibakteriální aktivitou

V poslední době se postupně zvyšuje rezistence lidských patogenních bakterií vůči známým antibakteriálním lékům, tudíž vývoj nových alternativ k aktuálně dostupným širokospektrým terapeutikům je jasnou prioritou. Objev existence velké, z velké části neprozkoumané skupiny endofytních mikroorganismů, vedl k cílenému výzkumu v průmyslových i akademických laboratořích (Rice, 2008). Mikroorganismy s antibakteriální aktivitou jsou již většinou dobře prozkoumané v laboratorním měřítku, ale jsou potřeba další studie o izolaci a přečištění, aby se přesně stanovila jejich struktura a mechanismus působení. V případech, kdy byly přírodní produkty identifikovány biologickými testy, by měly být považovány za „leads“, které se stanou kandidáty pro vývoj léčiv (Molinari, 2009).

Antibakteriální aktivita je nejčastěji detekována při testování kultur druhů *Fusarium*, *Phomopsis* a *Phoma*. Bohužel toto zjištění nelze přičítat jejich vysoké antibakteriální aktivitě, ale spíše vyšší frekvenci izolace těchto mikroorganismů ve srovnání se zbytkem izolovaných hub. Počet antibakteriálních látek získaných z endofytních hub není tak velký jako počet získaný z bakteriálních kmenů, nejproduktivnějším fungálním endofytem se zdá být *Streptomyces sp.* Existuje celá řada studií, které se zabývají strukturně novými metabolity produkovanými endofyty, jejichž antibakteriální potenciál nebyl dosud testován. Z toho vyplývá cíl do budoucna – provedení komplexního screeningu antibakteriální aktivity těchto metabolitů proti kmenům rezistentních bakterií (Radic a Šrukelj, 2012).

Sekundární metabolity s protirakovinnou aktivitou

Endofytům jako potenciálním zdrojům přírodních látek se začala věnovat intenzivnější pozornost ve chvíli, kdy byla u některých hub izolovaných z tisu pacifického (*Taxus brevifolia*) zjištěna schopnost produkce taxolu. Taxol, diterpenoid ze skupiny taxanů, je účinný proti

lidským nádorovým buněčným liniím prsu a vaječníků a využívá se v klinické chemoterapii (Schiff a Horwitz, 1980). Prvním důkazem, že i jiné organismy než rostlinné buňky dokáží produkovat taxany, bylo objevení mikroorganismu *Taxomyces andreanae* z třídy *Hyphomycetes*. Endofytní houba byla izolována z *Taxus brevifolia* a byla schopna produkce taxanových metabolitů kultivací na semisyntetickém kapalném médiu (Stierle a kol., 1993). V současnosti je nejvýznamnějším producentem taxanů kmen *Pestalotiopsis microspora* izolovaný z *Taxus wallichiana*. Produkce je 1000x vyšší než u endofytu *Taxomyces andreanae*. Mimo produkce taxolu je u *Pestalotiopsis microspora* zaznamenána i produkce dalších cytotoxických látek. Příkladem je cytotoxická kyselina torreyanová, izolovaná z *Pestalotiopsis microspora*, endofytu jehličnanu *Torreya taxifolia* (Lee a kol., 1996).

Produkce sideroforů

Získávání železa je jedním z klíčových kroků pro podporu mikrobiálního růstu. Ačkoli je železo hojně zastoupeno v zemské kůře, v aerobním prostředí existuje v podobě nerozpustných Fe^{3+} komplexů, které jsou pro mikroorganismy nepřístupné (Szebesczyk a kol., 2016). K získání železa vyvinuly mikroorganismy komplexní a složité systémy. V podmínkách s nedostatkem železa mikroorganismy produkují siderofory, molekuly s nízkou molekulovou hmotností (pod 1500 Da) a vysokou vazebnou afinitou pro železo. Tyto metabolity jsou schopné solubilizovat Fe^{3+} komplexy a následně z nich sekvestrovat železo (Lankford a Byers, 1973).

Jedním z klíčových mechanismů bakteriální rezistence na antibiotika je snížená permeabilita vnější membrány bakterie. Řešením této rezistence může být transport molekuly antibiotika do bakteriální buňky připojením na molekulu sideroforu, která běžně slouží jako chelátor železa (Górska a kol., 2014).

Produkce antioxidantů

V živých organismech probíhá za běžných podmínek neustálá produkce reaktivních forem kyslíku. Tyto reaktivní částice jsou původci řetězových radikálových reakcí, které mohou způsobovat poškození DNA a buněčnou smrt. Antioxidanty napomáhají obraně organismů proti těmto reaktivním formám kyslíku, protože díky své struktuře reagují s radikály a tím přerušují řetězovou radikálovou reakci za vzniku stabilních a netoxických sloučenin (Oldham a Bowen, 1998). Tradiční léčivé rostliny jsou slibným zdrojem endofytů produkujících metabolity s antioxidační aktivitou. Tyto sloučeniny patří většinou mezi fenolické látky, které jsou rozšířenými antioxidanty a mají vysokou redukční schopnost (Theantana a kol., 2011). Za zmínku stojí kaemferol, polyfenolová sloučenina produkovaná

například endofytem *Mucor fragilis*, která snižuje náchylnost k chorobám jako diabetes mellitus a různým typům rakoviny (Gehlot a Singh, 2018).

Produkce rostlinných hormonů

Rostliny jsou vystaveny různým abiotickým stresům, jako je sucho, extrémní teplota, salinita a přítomnost těžkých kovů. Abiotické stresy mají negativní vliv na fyziologii a morfologii rostlin prostřednictvím defektů v genetické regulaci buněčných drah. Fytohormony patří mezi nejdůležitější růstové regulátory. Mikroorganismy dodávají nebo upravují esenciální hladiny fytohormonů, včetně auxinu, cytokininu, ethylenu, gibberelinu nebo poskytují rostlinám živiny jako fosfát, dusík či železo (Doty, 2017).

Endofyty *Vitis vinifera*

Kontrola onemocnění a napadení révy je nezbytnou součástí kvalitní produkce hroznů. Pesticidy a fungicidy jsou aplikovány od časného jara do doby sklizně pro ochranu révy před nejrůznějšími fytopatogeny. V posledních desetiletích se používání syntetických fungicidů k ochraně rostlin zvýšilo, což vedlo k rozšíření povědomí veřejnosti o škodách na životním prostředí způsobených těmito látkami (Goldammer, 2015). Tyto obavy zvýšily poptávku po alternativních přípravcích pro ochranu rostlin, mezi něž patří možnost využití mikrobiálních endofytů jako kontrolních činidel k vyvolání rezistence vůči fytopatogenům u plodin jako je réva vinná (Compant a Mathieu, 2016). Vyvolání reakcí pro ochranu rostlin je žádoucí vlastností v boji proti hnilobě dřeva a chorob kmenů. Kromě toho mohou endofyty učinit rostliny révy vinné odolnější vůči nepříznivým environmentálním a edafickým podmínkám jako je dehydratace, salinita nebo omezená dostupnost živin (Maheshwari, 2017).

Réva vinná je hostitelem velmi rozmanitých druhů endofytních mikroorganismů. Složení endofytních komunit ovlivňuje mnoho faktorů jako je místo odběru, věk pletiva či bioklimatické faktory (González a Tello, 2011). Z bakterií jsou významnými endofyty vyskytujícími se ve *Vitis vinifera* zástupci rodů *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* či *Rhizobium*. Co se týče mikromycetních endofytů, *Alternaria alternata*, *Fusarium proliferatum*, *Epicoccum nigrum* byly identifikovány jako slibná biokontrolní činidla proti specifickým patologickým stavům révy vinné, jako je plíseň révová způsobená houbou *Plasmopara viticola*. *Vitis vinifera* je známým producentem resveratrolu, sloučeniny známé pro prevenci a zpomalení výskytu řady onemocnění včetně rakoviny, kardiovaskulárních a ischemických chorob. Mnoho endofytů vykazuje schopnost produkovat stejné funkční sloučeniny jako jejich hostitelé a přitom žít asymptomaticky v rostlinných pletivech. Mezi

mikromycety schopné produkce resveratrolu patří zástupci *Botryosphaeria*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor* a *Alternaria* (Shi a kol., 2012).

Závěr

Endofytní mikroorganismy disponují rozsáhlou schopností produkce unikátních přírodních metabolitů. Jako producenti těchto látek jsou velmi perspektivní díky snadné mikrobiální kultivaci. Populace endofytů *Vitis vinifera* zahrnuje celou řadu rozmanitých bakteriálních i mikromycetních zástupců jejichž metabolity mohou být využitelné v řadě průmyslových a zemědělských odvětví. Do budoucna by bylo zajímavé zaměřit se na metabolity s antifungální aktivitou a potenciál jejich využití při tvorbě biopesticidů, které by mohly být šetrnější variantou jak k rostlině, tak k životnímu prostředí.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu GAČR 18-26463S.

Literatura

- Aly A.H., Debabb A., Proksch P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, str. 1829-1845.
- Bary A. (1866). *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany, Leipzig, 316 stran.
- Clay K. (1988). Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69 (1), str. 10-16.
- Compant S., Mathieu F. (2016). *Biocontrol of major grapevine diseases: leading research*. CABI, Wallingford, 262 stran.
- Doty S.L. (2017). Functional importance of the plant microbiome. Springer, New York, str. 89-105.
- Gehlot P., Singh J. (2018). *Fungi and their role in sustainable development*. Springer, Singapore, str. 539-551.
- Glick B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, str. 1-15.
- Goldammer J.G. (2015). Vegetation fires and global change-challenges for concerted international action: a white paper directed to the United Nations and International Organization. *Planet Risk*, 3, str. 45-47.
- González V., Tello M.L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47, str. 29-42.
- Górska A., Sloderbach A., Poitr Marszall M. (2014). Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35 (9), str. 442-449.
- Hurek B., Hurek T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, str. 435-443.
- Lankford C.E., Byers B.R. (1973). Bacterial assimilation of iron. *CRC critical reviews in microbiology*, 2 (3), str. 273-331.
- Lee J.C., Strobel G.A., Lobkovsky E., Clardy J. (1996). Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *The Journal of Organic Chemistry*, 61, str. 3232-3233.

- Maheshwari D.K. (2017). Endophytes: biology and biotechnology. Springer, Cham, 342 stran.
- Molinari G. (2009). Natural products in drug discovery: present status and perspectives. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 655, str. 13-27.
- Oldham K.M. a Bowen P.E. (1998). Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? *Journal of the American Dietetic Association*, 98 (9), str. 1001-1008.
- Radic N., Štruklj B. (2012). Endophytic fungi – the treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, 19, str. 1270-1284.
- Rice L.B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, 196, str. 1079-1081.
- Schiff P.B., Horwitz S.B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77 (3), str. 1561-1565.
- Shi J., Zeng Q., Liu Y., Pan Z. (2012). *Alternaria* sp. *MG1*, a resveratrol-producing fungus: isolation, identification, and optimal cultivation conditions for resveratrol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, str. 369-379.
- Stierle A., Strobel G.A., Stierle D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260, str. 214-216.
- Strobel G. A., Daisy B., Castillo U., Harper J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67 (2), str. 257-268.
- Szebesczyk A., Olshvang E., Shanzer A., Carver P.L., Gumienna-kontecka E. (2016). Harnessing the power of fungal siderophores for the imaging and treatment of human diseases. *Coordination Chemistry Reviews*, 327, str. 84-109.
- Theantana T., Kanjanapothi D., Lumyong S. (2011). In vitro inhibition of lipid peroxidation and the antioxidant system of endophytic fungi from Thai medicinal plants. *Chiang Mai Journal of Science*, 39 (3), str. 429-444.
- Wiyakrutta S., Sriubolmas N., Panphut W., Thongon N., Danwisetkanjana K., Ruangrunsi N., Meevootisom V. (2004). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarian activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (3), str. 265-272.

Produktivita biomasy *Arthrospira maxima* ve třech typech kultivačních zařízení – tubulární, deskový a gas-lift fotobioreaktor

S. Lucáková^{1,2}, T. Brányik¹, I. Brányiková²

¹Ústav biotechnologie VŠCHT Praha

²Ústav chemických procesů AV ČR v.v.i.

Abstrakt

Biomasa sinic rodu *Arthrospira* (komerčně označované jako spirulina) obsahuje velké množství nutričně významných komponent – až 70% sušiny tvoří proteiny, dalšími významnými složkami jsou barviva (chlorofyl, fykocyanin), esenciální mastné kyseliny, vitamíny a minerální látky. I přes velký potenciál a široké možnosti využití čelí velkoobjemová produkce spiruliny stále problému vysoké ceny biomasy spojené s poměrně nízkou produktivitou v běžně používaných kultivačních zařízeních. Tato práce je zaměřena na sledování vlivu intenzity a vlnové délky záření na produktivitu biomasy *Arthrospira platensis* při kultivaci v tubulárních fotobioreaktorech. Zároveň byl testován vliv typu kultivačního zařízení a porovnána produktivita při kultivaci v tubulárním, deskovém a gas-lift reaktoru. Cílem pokusů je vybrat vhodnou geometrii a typ osvětlení pro kultivaci tohoto rodu cyanobakterií za účelem maximalizace produktivity biomasy a zlepšení celkové ekonomické bilance produkce.

Úvod

Cyanobakterie (sinice) a mikrořasy jsou řazeny mezi fototrofní mikroorganismy. Zatímco jednobuněčné mikroskopické řasy („mikrořasy“) patří mezi organismy s eukaryotním typem buňky (např. rod *Chlorella*), cyanobakterie jsou řazeny do kategorie organismů prokaryotních (např. rod *Arthrospira*). Stejně jako vyšší rostliny jsou sinice a mikrořasy schopny fotosyntetické konverze anorganicky vázaného uhlíku ve formě CO₂ do organicky vázané formy (biomasy). V porovnání s agronomicky využívanými plodinami vyniká biomasa mikrořas a sinic celou řadou benefitů, například podstatně vyšší plošnou produktivitou nebo možností kultivace na zemědělsky neobdělávatelné půdě. Díky unikátním nutričním hodnotám a pozitivnímu efektu jejich konzumace na lidské zdraví se produkty obsahující fototrofní mikroorganismy (*Chlorella*, spirulina) staly vyhledávanými doplňky stravy. Celosvětová roční

produkce mikrořas a cyanobakterií se v současné době pohybuje okolo 5000 tun, z čehož spirulina tvoří zhruba 60% (Ali a Saleh, 2012).

V současné době je největší část vyprodukované biomasy mikrořas a cyanobakterií využita jako doplněk stravy nebo krmivo (*Chlorella*, *Spirulina*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Isochrytis*), dále pro produkci betakarotenu (*Dunaliella*) a dalších barviv, například astaxanthinu (*Haematococcus*). Velký potenciál má využití i v dalších průmyslových odvětvích jako jsou například výroba kosmetiky, farmaceutický průmysl, čištění odpadních vod a zemědělství (produkce biostimulantů nebo biohnojiv) (Singh a Sharma, 2012).

Arthrospira

Nejznámějším zástupcem cyanobakterií je rod *Arthrospira* (*Spirulina*), komerčně označována jako spirulina. Využití spiruliny jako součásti výživy bylo popsáno již v 9. století v okolí jezera Čad. V této oblasti ženy i v současnosti sklízají biomasu spiruliny z přírodních alkalických jezer filtrací přes písek nebo jemné textilie, sklizenou biomasu následně suší na slunci, usušené filtrační koláče zvané “dihé” jsou prodávány na místních trzích a po kuchyňské úpravě konzumovány například ve formě omáček. Zdravotní stav jedinců konzumujících dihé je i přes jinak velice chudou stravu překvapivě dobrý, což bylo potvrzeno studiemi WHO. Zhruba od 16. století lze nalézt zmínky o sklizení a konzumaci spiruliny podobným způsobem i v některých Aztéckých civilizacích ve střední Americe, kde je spirulina dodnes pěstována například v oblasti jezera Texcoco. Spirulina roste v teplých jezírcích se zásaditým pH (8,5), což jí při kultivaci ve fotobioreaktorech poskytuje značnou selektivní výhodu oproti jiným mikroorganismům a je tak méně náchylná ke kontaminaci jinými kmeny mikrořas nebo bakteriemi (Batello a kol., 2004).

První průmyslová velkoobjemová produkce spiruliny začala zhruba v 60. letech minulého století. Roku 2003 dostala spirulina status GRAS (Generally Recognised As Safe) od organizace FDA (Food and Drug Administration of the United States). Celosvětová produkce spiruliny je v současné době odhadována na zhruba 3000 tun, mezi největší producenty patří Čína, Indie, USA, Myanmar a Japonsko. Průměrná cena biomasy se pohybuje okolo 36 EUR/kg (Brennan a Owende, 2010).

Výzkumné centrum IIMSAM (International Institution for the Use of Micro-Algae Spirulina Against Malnutrition) spadající pod OSN označilo spirulinu roku 1974 za potravinu budoucnosti, především kvůli vysokému obsahu proteinů a dalších nutričně významných složek a nenáročným podmínkám kultivace. Kosmické společnosti NASA a ESA se intenzivně věnují výzkumu biologických podpůrných systémů na kultivaci spiruliny, které by během letů

do vesmíru umožňovaly regeneraci vzduchu a přípravu plnohodnotných potravin pro posádku letu (Tikhomirov a kol., 2007).

Spirulina tvoří vlákna dlouhá zhruba 0,1-0,2 mm s průměrem přibližně 0,01 mm, která umožňují separaci biomasy od kultivačního média pomocí běžné filtrace a náklady na downstream procesy tak nejsou příliš vysoké. Další výhodou je stravitelnost buněčné stěny, díky které není nutná její dezintegrace. Tyto faktory umožňují sklizení spiruliny i ve velmi primitivních podmínkách (Vonshak, 1997). Kromě typického sklizení z alkalických jezer v oblastech subtropů lze trend kultivace spiruliny v jednoduchých podmínkách sledovat například v jižní Francii, kde se část farmářů (Fédération des Spiruliniers de France, <http://www.spiruliniersdefrance.fr>) přeorientovala na kultivaci spiruliny místo pěstování konvenčních zemědělských plodin.

Typy zařízení ke kultivaci mikrořas

V závislosti na typu organismu (morfologie buňky, růstová rychlost a produktivita, náchylnost ke kontaminaci, cena finálního produktu) mohou být ke kultivaci mikrořas a sinic využity různé typy kultivačních zařízení. Kultivační zařízení lze obecně rozdělit do dvou typů, a to zařízení otevřená (otevřené nádrže typu „raceway ponds“) a uzavřená (fotobioreaktory). Klíčovými faktory pro úspěšnou kultivaci vybraného fotoautotrofního mikroorganismu v určitém typu zařízení je zajištění dostatečné intenzity osvětlení, dostatečné dodávky oxidu uhličitého a minerálních látek, zajištění odpovídající intenzity míchání, vhodný konstrukční materiál zařízení, efektivní způsob odvodu kyslíku vznikajícího při fotosyntéze a možnost regulace parametrů jako jsou teplota a pH.

V současné době je spirulina většinou kultivována v otevřených nádržích hlubokých 15-35 cm (Shimamatsu, 2004), jejichž hlavní nevýhodou je nízká produktivita biomasy způsobená především obtížnou regulací teploty a nízkým průměrným osvětlením kultury zapříčiněným nízkým poměrem plochy ku objemu zařízení. Další nevýhodou je poměrně krátká kultivační sezóna, která ve většině oblastí trvá pouze několik měsíců v roce (Converti a kol., 2006). Kultivace v uzavřených systémech je kvůli vysokým investičním i provozním nákladům neekonomická, přesto je část vědecké komunity přesvědčená, že optimalizace uzavřených systémů a kultivačních podmínek v nich v budoucnosti umožní ekonomicky výhodnou produkci biomasy spiruliny v přesně kontrolovaných podmínkách. Vhodně navržené uzavřené systémy mohou vést k podstatnému snížení plochy, která je fotobioreaktorem zabrána (a tím k podstatnému zvýšení plošné produktivity). Další výhodou vertikálně umístěných uzavřených fotobioreaktorů, například tubulárního typu, je zvýšení doby zdržení molekul oxidu uhličitého

v zařízení vedoucí ke zvýšení účinnosti jeho využití. Další možností zvýšení efektivity využití CO₂ je zařazení tubulárních reaktorů do série (de Moraes a Costa, 2007).

Při konstrukci fotobioreaktoru pro kultivaci spiruliny je potřeba brát ohled na její vláknitou strukturu a vysokou citlivost vláken ke střízným silám. V případě tubulárních fotobioreaktorů hraje roli průměr a délka trubek, intenzita a typ míchání kultury a typ zařízení způsobujícího cirkulaci kultury v reaktoru. Průměr trubek je hlavní parametr, pomocí kterého je regulován poměr plochy ku objemu zařízení, který má zásadní vliv na intenzitu osvětlení kultury. Délka trubek a geometrie jejich uspořádání ovlivňují charakter cirkulace kultury v zařízení. Parametry kultivace (intenzita osvětlení, koncentrace biomasy, teplota, typ fotobioreaktoru) ovlivňují rychlost vzniku kyslíku, jehož přílišná akumulace je potřeba vhodným nastavením zabránit, jinak by docházelo ke snižování rychlosti růstu a tím produktivity zařízení. Míchání je nezbytné pro zajištění rovnoměrného osvětlení všech buněk v zařízení a distribuci nutrientů a plynů (Converti a kol., 2006).

Produktivita biomasy zástupců rodu *Spirulina* v různých typech zařízení

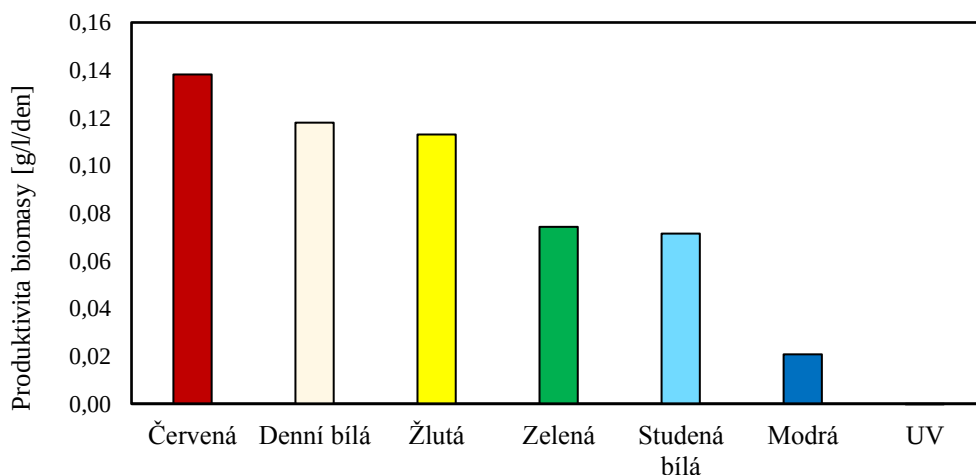
V závislosti na použitém typu zařízení se produktivita biomasy pohybuje v rozmezí od 0,1 do 0,8 g/l/den. Při kultivaci v otevřených zařízeních typu raceway ponds je obvyklá produktivita biomasy zhruba 0,05-0,18 g/l/den v závislosti především na ročním období a klimatickém pásu (Vonshak, 1997), např. Venkateraman (1997) ve své studii uvádí hodnotu 0,15 g/l/den. V uzavřených zařízeních je obecně dosahováno vyšší objemové produktivity, např. Converti a kol. (2006) uvádějí produktivitu 0,62 g/l/den při kultivaci *Spirulina platensis* v tubulárním fotobioreaktoru o objemu 5,5 litru, de Moraes a Costa (2007) dosáhli produktivity *Spirulina* sp. 0,22 g/l/den při kultivaci v tubulárním fotobioreaktoru o objemu 1,8 litru. Rozdíl v produktivitách je způsoben nejen typem kultivačního zařízení, ale především použitým zdrojem (solární vs. umělý) a intenzitou osvětlení.

Vliv intenzity a vlnové délky osvětlení

Stejně jako ostatní fotoautotrofní mikrořasy a cyanobakterie využívá i spirulina světlo jako zdroj energie. Pro ekonomicky výhodnou kultivaci je nezbytné zvolit takovou intenzitu osvětlení, aby byla konverze světelné energie co nejvyšší. Množství energie dostupné pro jednotlivé buňky závisí nejen na intenzitě osvětlení, ale i na koncentraci buněk a míře homogenizace kultury v kultivačním zařízení. Při velmi nízké koncentraci buněk rostou buňky vyšší rychlostí (exponenciálně), ale při příliš nízké koncentraci buněk v zařízení dochází při vysoké intenzitě osvětlení k jevu zvanému fotoinhibice a buňky jsou velkým množstvím světla nevratně poškozeny. V případě spiruliny byl fotoinhibiční efekt při osvětlení slunečním

zářením pozorován při koncentraci buněk nižší než 0,1 g/l (Shimamatsu, 2004). Při technologicky běžných koncentracích biomasy (0,1-3 g/l) dochází ve vsádkových kultivačních zařízeních typicky k lineárnímu růstu, kdy je veškeré dopadající světlo absorbováno kulturou a produktivita je konstantní. Při příliš vysoké koncentraci buněk v zařízení dochází ke snižování produktivity biomasy.

Při kultivaci ve válcových reaktorech v laboratorním měřítku byl testován vliv vlnové délky a chromatičnosti osvětlení. Byla provedena série kultivací ve válcových fotobioreaktorech s pracovním objemem 350 ml, které byly osvětleny LED pásky o stejné intenzitě světla ($300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) lišící se ve vlnové délce (v případě polychromatických pásků v chromatičnosti světla). Fototrofní mikroorganismy využívají energii záření v rozmezí vlnových délek 400-700 nm tj. tzv. fotosynteticky aktivní záření. Vzhledem k tomu, že absorpční maximum chlorofylu je 676 nm a absorpční maximum fykocyaninu je 620 nm, největšího nárůstu spiruliny by teoreticky mělo být dosaženo při osvětlení s vlnovými délkami blízkými těmto hodnotám (například červená – 630 nm, oranžová – 610 nm, žlutá – 595 nm). Testovány byly monochromatické LED pásky o následujících vlnových délkách: červená (630 nm), žlutá (592 nm), zelená (530 nm), modrá (470 nm) a UV (400 nm) a polychromatické LED pásky o následující chromatičnosti: studená bílá (6000 K) a denní bílá (4500 K). Srovnání produktivit vypočtených z gravimetricky určené koncentrace biomasy po jednom týdnu kultivace je pro jednotlivé pásky uvedeno v Obr. 1.



Obr. 1: Srovnání produktivity biomasy pro jednotlivé typy LED pásků

Produktivita v deskovém fotobioreatoru

V další fázi byla spirulina kultivována v pneumaticky míchaném deskovém fotobioreatoru s pracovním objemem 40 litrů. Během kultivace byl sledován vliv intenzity záření, a to při hodnotách 150 a $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Kultivace probíhala po dobu jednoho týdne, byla měřena

růstová křivka a vypočtena produktivita biomasy v závislosti na intenzitě světla. Ostatní podmínky kultivace byly konstantní (teplota 30 °C, průtok aeračního plynu 10 l/min, obsah CO₂ v aeračním plynu 2 %obj., pH 8,5-9,5, Zarroukovo médium, zdroj záření LED panel).

Po jednom týdnu kultivace bylo při nižší intenzitě osvětlení (150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) dosaženo produktivity biomasy 0,09 g/l/den. Při zvýšení intenzity osvětlení na 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ bylo dosaženo zvýšení produktivity na 0,14 g/l/den.

Produktivita v gas-lift fotobioreaktoru

Dalším typem zařízení, ve kterém byla spirulina kultivována, byl gas-lift fotobioreaktor s pracovním objemem 1,1 litru. V tomto modelovém zařízení byl sledován vliv intenzity záření v rozsahu 300-1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ na produktivitu biomasy. Spirulina byla kultivována v gas-lift fotobioreaktoru temperovaném pomocí duplikátoru na 30 °C po dobu jednoho týdne pro každou ze zvolených hodnot intenzity (300, 1000 a 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Měřením absorbance a gravimetrickým stanovením koncentrace biomasy byla stanovena růstová křivka a vypočtena produktivita biomasy. Hlavními cíli těchto experimentů bylo i) zhodnotit závislost produktivity na intenzitě záření ii) pokusit se o nalezení meze fotoinhibice, tedy takové kombinace hodnoty intenzity záření a koncentrace biomasy, při které dojde k nevratnému poškození buněk příliš vysokým osvětlením.

Během kultivace byly měřeny růstové křivky a po jednom týdnu kultivace byla gravimetricky určena finální koncentrace biomasy, ze které byla dopočtena objemová produktivita. V testovaném rozsahu intenzit světelného záření byl sledován rostoucí trend produktivity biomasy při zvyšující se intenzitě záření, ani u nejvyšší použité hodnoty intenzity záření (1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) nebyl pozorován efekt fotoinhibice. V Tab. I jsou uvedeny objemové produktivity biomasy vypočtené pro jednotlivé hodnoty intenzity záření.

Intenzita záření [$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$]	P_{X,7 dní} [g/l/den]
300	0,30
1000	0,34
1500	0,40

Tab. I: Kultivace v gas-lift reaktoru - závislost produktivity na intenzitě záření

Z výsledků je patrná snižující se účinnost konverze světelné energie na biomasu při zvýšení intenzity záření, z tohoto pohledu je nejvyšší účinnost využití světla při použití intenzity záření 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Porovnání produktivity v tubulárním, deskovém a gas-lift fotobioreaktoru

Na závěr byla porovnána objemová produktivita biomasy v tubulárním, deskovém a gas-lift fotobioreaktoru při kultivaci za stejných podmínek (teplota 30 °C, Zarroukovo médium, pH 9,5-10, intenzita světelného záření 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Kromě geometrie se zařízení liší i v pracovním objemu – tubulární reaktor 0,35 l, gas-lift reaktor 1,1 l a deskový reaktor 40 l. Objemové produktivity biomasy vypočtené pro jednotlivá zařízení z gravimetricky stanovených hodnot koncentrace biomasy jsou uvedené v Tab. II.

Typ zařízení	$P_{X,7 \text{ dní}}$ [g/l/den]
Tubulární reaktor	0,26
Deskový reaktor	0,14
Gas-lift	0,30

Tab. II: Srovnání objemové produktivity biomasy dosažené za stejných podmínek v různých typech fotobioreaktorů

Závěr

V první části experimentů byl sledován vliv vlnové délky osvětlení na produktivitu biomasy při kultivaci v tubulárních fotobioreaktorech osvětlených monochromatickými a polychromatickými LED pásky různých barev a chromatičností. Nejvyšší produktivity bylo dosaženo při použití červeného LED pásku (vlnová délka 630 nm) a LED pásku s denní bílou barvou – produktivita 0,13 g/l/den a 0,12 g/l/den, naopak nejnižší produktivita biomasy byla při použití LED pásek s krátkou vlnovou délkou – UV (vlnová délka 400 nm), modrá (vlnová délka 470 nm), studená bílá (produktivity 0,00; 0,02 a 0,07 g/l/den). Z výsledků je zřejmý trend rostoucí produktivity s rostoucí vlnovou délkou použitého světla, což odpovídá předpokladu vysoké produktivity ve vlnových délkách blízkých se absorpčnímu maximu zelených fotosyntetických barviv fykocyaninu a chlorofylu, která jsou 676 a 620 nm.

Při kultivaci v deskovém a gas-lift fotobioreaktoru byl sledován vliv intenzity záření na produktivitu biomasy. U deskového fotobioreaktoru byly testovány hodnoty 150 a 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, zatímco u gas-lift fotobioreaktoru hodnoty 300, 1000 a 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. U obou typů zařízení byl potvrzen trend zvýšení růstové rychlosti a produktivity zvýšením intenzity osvětlení. Při kultivaci v gas-lift reaktoru nebyl ani při poměrně vysoké intenzitě osvětlení 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ pozorován jev fotoinhibice (poškození buněk vysokou dávkou světla). Nejvyšší účinnost konverze dopadajícího záření na biomasu byla v případě nejnižší intenzity

záření, v případě intenzity 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ byla účinnost konverze snížena o 66% a v případě intenzity 1500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ o 73%.

Pro srovnání vlivu geometrie zařízení na produktivitu biomasy byla provedena série kultivací v tubulárním, deskovém a gas-lift fotobioreaktoru za stejných podmínek (teplota, pH, průtok a složení aeračního plynu, složení média, intenzita osvětlení). Jako nejvhodnější typ zařízení byl na základě nejvyšší produktivity vyhodnocen gas-lift reaktor (produktivita 0,30 g/l/den), nejnižší produktivity bylo dosaženo v deskovém fotobioreaktoru (0,14 g/l/den). Kromě geometrie se tato zařízení liší především v typu míchání a cirkulace kultury v zařízení (probubublávaná kolona vs. gas-lift) a poměru osvětlené plochy k objemu. Z výsledků je patrné, že gas-lift reaktor je pro kultivace vláknité spiruliny vhodný typ uzavřeného fotobioreaktoru a v navazujících experimentech bude provedena optimalizace parametrů kultivace v tomto zařízení s cílem maximalizace produktivity biomasy a snížení celkových produkčních nákladů.

Poděkování za podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci projektu QK1910300.

Literatura

- Batello C., Marzot M., Touré A. H. (2004) The Future is an Ancient Lake. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 274-285 stran.
- Brennan L., Owende P. (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14, str. 557-577.
- Converti A., Lodi A., Del Borghi A., Solisio C. (2006) Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. Biochemical Engineering Journal. 32, str. 13-18.
- de Moraes M. G., Costa J. A. V. (2007) Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology. 129, str. 439-445.
- Shimamatsu H. (2004) Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. Hydrobiologia. 512, str. 39-44.
- Singh R. N., Sharma S. (2012) Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 16, str. 2347-2353.
- Tikhomirov A., Ushakova S., Kovaleva N., Lamaze B., Lobo M., Lasseur C. (2007) Biological life support systems for a Mars mission planetary base: Problems and prospects. Advances in Space Research. 40, str. 1741-1745.
- Venkataraman L. V. (1997) *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell Biology and Biotechnology, edited by Avigad Vonshak. Journal of Applied Phycology. 9, str. 295-296.
- Vonshak A. (1997) *Spirulina platensis*, *Arthrospira*: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology. Taylor & Francis, stran 252.

Antifungální aktivita kombinace pterostilbenu a amfotericinu B vůči biofilmu kvasinek rodu *Candida*

K. Lokočová, J. Masák

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Mikrobiální biofilm lze definovat jako společenství mikroorganismů obklopených ochrannou maticí exopolymerních látek, která jsou schopna kolonizovat různé biotické a abiotické povrchy. K nejběžnějším druhům kvasinek způsobujících nozokomiální infekce patří například *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* a *Candida albicans*. Léčba infekcí spjatých s biofilmem je velmi obtížná kvůli vysoké rezistenci biofilmových buněk vůči širokému spektru antimikrobiálních látek. V současné době je proto potřeba neustále vyvíjet nové antimikrobiální či antibiofilmové látky.

Tato studie je zaměřena na testování kombinace biologicky aktivních látek s antibiofilmovým účinkem. Za tímto účelem byla vybrána přírodní látka pterostilben a antibiotikum amfotericin B a byl studován jejich potenciál inhibovat tvorbu biofilmu oportunně patogenních kvasinek *Candida albicans* ATCC 2091, *Candida parapsilosis* CCM 8260 a *Candida krusei* CCM 8271. Metabolická aktivita buněk biofilmu byla stanovena pomocí MTT testu a celkový obsah biomasy biofilmu byl kvantifikován barvením krystalovou violetí. Biofilm byl následně vizualizován fluorescenčním mikroskopem. Nejvyšší inhibiční účinek byl potvrzen u kombinace 40 mg/l pterostilbenu s 2 mg/l amfotericinu B v případě *Candida albicans* ATCC 2091. Na základě získaných výsledků jsme dospěli k závěru, že kombinace těchto látek má slibný potenciál pro léčbu infekcí způsobených různými druhy kvasinek rodu *Candida*.

Lidské monoaminoxidasy jako terapeutický cíl

D. Maršík

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Lidské monoaminoxidasy (hMAOs) jsou intracelulární enzymy vázané na vnější mitochondriální membránu, kde katalyzují oxidativní deaminaci biogenních monoaminů. Produkty oxidativní deaminace jsou pak peroxid vodíku, příslušný aldehyd a v případě primárních aminů amoniak nebo u sekundárních aminů substituovaný amin (Weyler a kol., 1990; Youdim a kol., 2006). Na základě odlišné afinity k přirozeným substrátům byly popsány dvě isoformy hMAOs. Isoforma katalyzující oxidaci serotoninu je označována jako hMAO A, zatímco isoforma se substrátovou specifitou k benzylaminu nebo 2-fenylethylaminu nese označení hMAO B. Vzájemně jsou si ale velmi podobné, a proto některé substráty jako katecholaminy degradují s podobnou účinností (Geha a kol., 2001; Youdim a kol., 2006). Jejich inhibitory našly uplatnění v terapii deprese a Parkinsonovy nebo Alzheimerovy choroby. V současnosti se stále testují nové látky, které by rozšířily možnosti indikace inhibitorů hMAOs a naplnily tak terapeutický potenciál této skupiny léčiv.

Funkce hMAOs

Primární funkcí hMAOs je ochrana organismu před nadměrným množstvím biogenních aminů a některých xenobiotik. Degradace probíhá buď přímou oxidací z krve nebo preventivně před vstupem aminů do krevního řečiště. Stejný význam má i hMAO B obsažená v hematoencefalické bariéře (Tipton a kol., 2004; Youdim a kol., 2006).

V periferním a centrálním nervovém systému jsou hlavními funkcemi hMAOs ochrana nervové tkáně před poškozením vlivem exogenních aminů, regulace skladování aminových neurotransmiterů a ukončení jejich působení. Po uvolnění do synaptické štěrby je část neurotransmiterů vychytávána gliovými buňkami a astrocyty, kde probíhá degradace extraneuronálně. Zbýlé neurotransmitery jsou po přenosu signálu zpětně vychytávány do presynaptického neuronu, kde mohou být degradovány intraneuronálně. Nedegradované neurotransmitery jsou nakonec uskladněny v synaptickém váčku, ve kterém jsou před dalším působením hMAOs chráněny. Při narušení zpětného vychytávání má extraneuronální degradace zastupitelnou funkci (Tipton a kol., 2004; Youdim a kol., 2006).

Nerovnoměrná distribuce v nervovém systému a rozdíly v substrátové specifitě umožňují hMAOs vykonávat odlišné funkce. Serotoninergní neurony obsahují paradoxně výrazně vyšší množství hMAO B. Úlohou hMAO B v serotoninergních neuronech je pravděpodobně eliminace cizích aminů a zabránění jejich vstupu do synaptických váček. Díky tomu se zvyšuje čistota serotoninu putujícího do synaptické štěrbin. V degradaci serotoninu hraje pravděpodobně důležitou roli extraneuronálně umístěná hMAO A v gliových buňkách. Toto zjištění je v rozporu s původní myšlenkou, že metabolismu neurotransmiterů se výhradně účastní hMAOs umístěné v nervových zakončeních, kdežto extraneuronálně umístěné hMAOs se degradaci účastní až po jeho nadměrném vyplavení. Vše potvrzují inhibiční studie, kdy po podání selektivních inhibitorů hMAO A dochází ke zvýšení koncentrace serotoninu, zatímco u inhibitorů hMAO B ne (Tipton a kol., 2004; Youdim a kol., 2006).

V noradrenergických neuronech obsahujících hMAO A i hMAO B je noradrenalin přibližně stejně dobrým substrátem pro oba enzymy. V synaptosomu je noradrenalin preferenčně vychytáván do synaptických váček, takže v této části není téměř degradován (Tipton a kol., 2004; Youdim a kol., 2006).

Využití hMAOs jako terapeutického cíle

hMAOs ovlivňují hladinu neurotransmiterů v centrální nervové soustavě. Jejich nerovnováha je spojena s pathobiochemií řady neurogenních poruch včetně deprese, Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy choroby. Nadměrná aktivita enzymu v mozku hraje zásadní roli u různých psychiatrických poruch. Ztráta kognitivních funkcí u pacientů s Alzheimerovou chorobou je spojována s vysokou hladinou hMAO B, zatímco nízké koncentrace neurotransmiterů stanovené u pacientů trpících těžkými depresemi jsou přisuzovány zvýšené hladině hMAO A. Dnes se klinicky využívá inhibice hMAOs při léčbě deprese, Parkinsonovy choroby nebo demence. Další možnosti indikací jsou ve fázi klinických studií nebo výzkumu (Kumar a kol., 2017).

Deprese

Deprese je chronické onemocnění spojené s nízkými hladinami serotoninu, noradrenalinu a dopaminu v centrální nervové soustavě. Obecně dochází k poruše přenosu na neuronálním zakončení v důsledku nízké koncentrace neurotransmiteru v synaptické štěrbině. Tento stav může mít hned několik příčin. Mezi nejpravděpodobnější patří snížená produkce neurotransmiteru v presynaptickém zakončení, zvýšené zpětné vychytávání neurotransmiteru ze synapse (Anders a Roth, 2000) nebo nadměrná exprese hMAO A a tím zvýšená degradace neurotransmiteru. Cílem terapie je zvýšení koncentrace neurotransmiterů v synaptické oblasti.

Tohoto efektu lze docílit inhibicí hMAOs, která je jedním z nejstarších přístupů využívaných v terapii deprese. Inhibitor se váže přímo s enzymem a zastavuje tak jeho katalytický účinek. Potlačením degradace vzrůstá koncentrace neurotransmiterů v nervových zakončeních (Kumar a kol., 2017; Yamada a Yasuhara, 2004).

Fenotypové studie pacientů se vzácným vrozeným onemocněním Norrieho choroba, u kterých byla diagnostikována delece genů pro hMAO A, hMAO B nebo pro oba enzymy naznačuje, že i přes převahu hMAO B v lidském mozku hraje hMAO A důležitější roli v jeho neurofyzilogickém vývoji a funkci (Lenders a kol., 1996). Studie na myších, u kterých byl proveden knockout genů pro mMAOs prokázala, že dominantní vliv na degradaci neurotransmiterů, a tedy i potenciálně na vznik deprese má forma A. Po knockoutu genů pro mMAO A došlo v mozku ke zvýšení hladiny serotoninu, noradrenalinu a v malém množství i dopaminu, zatímco po vyřazení genů pro mMAO B byla zvýšená pouze koncentrace 2-fenylethylaminu. Knockout obou enzymů vedl ke zvýšené odolnosti vůči stresu (Youdim a kol., 2006). Tyto skutečnosti naznačují, že k navození antidepressivního účinku stačí využít inhibice hMAO A, proto vznikla podskupina IMAOs označovaná jako RIMA, které reversibilně inhibuje isoformu A. Tato skupina má podobné terapeutické působení i indikace jako inhibitory zpětného vychytávání neurotransmiterů (Anders a Roth, 2000). Její zástupci jsou velice účinní při léčbě atypických depresí a úzkostných poruch. RIMA jsou vhodné zejména pro starší pacienty, u kterých může dojít k poklesu noradrenergí neurotransmise v mozku, a také protože s rostoucím věkem roste i aktivita hMAOs (Yamada a Yasahura, 2004).

Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je chronické neurodegenerativní onemocnění spojené se zvýšenou aktivitou hMAO B v bazálních gangliích, která odpovídá za metabolismus dopaminu. Aktivita hMAO B se zvyšuje v důsledku gliosy neboli zmnožení gliových buněk (Youdim a kol., 2006), ve kterých se s rostoucím věkem může zvýšit exprese hMAO B až čtyřikrát. Protože je v této oblasti mozku dominantní aktivita hMAO B, k terapii se využívá její inhibice (Kumar a kol., 2017).

Přínos inhibitorů hMAO B v terapii Parkinsonovy choroby byl studován na základě identifikace dopaminergního neurotoxinu 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinu (MPTP), který je metabolizován hMAO B na neurotoxin 1-methyl-4-fenylpyridinium (MPP^+). MPP^+ navozuje degradaci nigrostriálních dopaminergních neuronů a způsobuje parkinsonismus u lidí a primátů. Současně bylo zjištěno, že mMAO B knockout myši jsou proti

účinkům toxinu rezistentní. Podáním inhibitorů hMAO B bylo zabráněno neurodegeneraci a s tím spojenému úbytku dopaminu (Youdim a kol., 2006).

Neuroprotektivní efekt získaný po inhibici hMAO B naznačuje, že produkty reakcí katalyzované hMAOs mohou přispívat k neurotoxicitě. V případě Parkinsonovy choroby je obzvlášť důležitý cytotoxický aldehyd odvozený od dopaminu. Pacienti s touto nemocí mají v substantia nigra výrazně nižší množství aldehyddehydrogenasy, která 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd (DOPAL) fyziologicky degraduje (Galter a kol., 2003; Lamensdorf a kol., 2000). Kumulující se DOPAL může kondenzovat s neoxidovaným dopaminem a vytvořit tak tetrahydropapaverolin (THP). Ve struktuře THP je aminová skupina součástí tetrahydroisochinolového kruhu. Takové struktury degradují dopaminergní neurony a mohou se tak podílet na vzniku parkinsonismu (Shin a kol., 2004).

Dalšími neurotoxickými produkty oxidativní deaminace jsou amoniak a peroxid vodíku (Halliwell, 1992; Klann a Thiels, 1999; Norenberg a kol., 2004; Yang a kol., 2004). Peroxid vodíku a další reaktivní volné radikály generované hMAO B mohou zapříčinit zhoršení neuronálních funkcí nebo smrt neuronů a amplifikuji tak účinek THP (Yamada a Yasahura, 2004). Inhibicí hMAO B dochází k jejich poklesu, díky kterému by mohlo dojít ke zpomalení neurodegenerativních procesů spojených s Parkinsonovou chorobou (Kumar a kol., 2017). Na druhou stranu, celkový mechanismus cytoprotektivního účinku inhibitorů hMAO B není známý a jejich význam v terapii Parkinsonovy choroby je sporný. Zatím se nepodařilo přesvědčivě prokázat přínos ve zmírnění progresu onemocnění. Neuroprotektivní účinek nebyl prokázán u všech inhibitorů hMAO B a inhibice hMAOs nemusí být hlavním mechanismem jeho vzniku (Youdim a kol., 2006). Inhibitor hMAO B účinný v neuroprotektci totiž ochránil před toxicitou MPP⁺ také buněčné linie MAO B postrádající (Sharma a kol., 2003).

V současné době je pro léčbu Parkinsonovy choroby dostupná pouze symptomatická terapie. Pro zvýšení množství dopaminu se podává jeho prekursor levodopa, který může na rozdíl od dopaminu prostoupit hematoencefalickou bariérou a v mozku se na dopamin působením DDC přeměnit (Youdim a kol., 2006). Inhibitory hMAO B přímo množství dopaminu nezvyšují. Tohoto efektu lze dosáhnout pouze inhibicí obou forem enzymu (Green a kol., 1977). Inhibice hMAO B posiluje účinky levodopy a napomáhá udržet koncentraci dopaminu v terapeutické hladině. Její využití může vést ke snížení dávek levodopy potřebné pro navození účinku (Kumar a kol., 2017).

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je progresivní onemocnění způsobující degenerativní zánik neuronů. Onemocnění doprovází postižení kognitivních funkcí, zejména se projevuje syndromem demence. Přesná příčina degenerace neuronů není známá. Etiologie onemocnění je však spojená se zvýšeným oxidačním stresem a nadměrnou aktivitou hMAO B při gliose, která zvyšuje koncentraci H_2O_2 a množství reaktivních volných radikálů. U pacientů s Alzheimerovou chorobou byly ve specifických oblastech mozku stanoveny nízké hladiny acetylcholinu, který zajišťuje přenos informací mezi mozkovými buňkami. Úbytek buněk a narušení přenosu signálu významně poškozuje mozkové funkce jako učení a tvorba paměti (Kumar a kol., 2017).

Alzheimerova choroba je dodnes nevyléčitelné onemocnění. Současně dostupná farmakoterapie má za cíl zpomalit proces postižení kognitivních funkcí a zkvalitnit život pacientům. Průběh demence lze zmírnit inhibitory cholinesteras, které potlačují degradaci acetylcholinu (Salomone a kol., 2011). Lze je podávat v kombinaci s prekursory acetylcholinu jako lecitin (Higgins a Flicker, 2009).

Od inhibitorů hMAO B se na základě etiologie očekává neuroprotektivní účinek a zpomalení progresu onemocnění. Na jejich význam v terapii Alzheimerovy choroby však nepanuje jednotný názor (Bortolato a kol., 2008). V současné době se testují látky s duálním mechanismem účinku. Do klinických studií se dostal Ladostigil inhibující acetylcholinesterasu, butyrylcholinesterasu a obě MAOs. Inhibice MAOs je ireversibilní a probíhá výhradně v mozku. V preklinických studiích prokázal silné antiapoptické a neuroprotektivní účinky a výsledky nasvědčují, že by mohl významně podpořit aktivitu cholinergního systému (Weinreb a kol., 2012).

Srdeční a mozková ischemie

Ke zvýšené mitochondriální produkci peroxidu vodíku a reaktivních volných radikálů dochází také v situacích, kdy buňky nejsou dostatečně zásobeny v krvi rozpuštěným kyslíkem. Do stavu hypoxie se tkáň dostávají při srdeční nebo mozkové ischemii. Hromadící se reaktivní formy kyslíku po opětovném uvolnění krevního průtoku neboli reperfuzi poškozuji přilehlé tkáň a způsobují zánět. IMAOs by svým účinkem mohly zablokovat významný zdroj volných radikálů, snížit periferní poškození tkáň a zrychlit zotavení po ischemii (Kaludercic a kol., 2014; Simon a kol., 2001; Slezak a kol., 1995)

Rizika spojená s užíváním IMAOs

Původní generace IMAOs inhibující enzym ireversibilně a neselektivně byla pro vysokou toxicitu a nežádoucí interakce s potravinami a dalšími léčivy postupně nahrazena selektivními

inhibitory nebo inhibitory zpětného vychytávání. Zásadní nebezpečí spočívá v ireversibilitě vazby inhibitoru, jehož účinek může být zvrácen pouze obnovou enzymu a zvyšuje tak riziko při předávkování (Yamada a Yasahura, 2004).

Při užívání ireversibilních IMAOs je nutné dodržovat tyraminovou dietu. Exogenně přijímaný tyramin je ve střevech fyziologicky metabolizován hMAO A. Po inhibici roste koncentrace tyraminu, který přechází ze střev do krve a ve vysokém množství navozuje uvolnění noradrenalinu. Sympatomimeticky účinkující tyramin s noradrenalinem aktivují kardiovaskulární systém, dochází k masivnímu zvýšení krevního tlaku, při kterém hrozí poškození až selhání některých orgánů. Tento život ohrožující stav označujeme jako hypertenzní krize (Kumar a kol., 2017; Youdim a kol., 2006). Popsaná interakce léčiva s potravinou se nazývá „cheese reaction“, protože první zaznamenaný případ interakce byl po požití syra. Tyramin je ale běžnou složkou fermentovaných potravin (Rao a Yeragani, 2009).

Toxicitu a nežádoucí interakce s potravinami se podařilo zmírnit vývojem RIMA a selektivních inhibitorů hMAO B. RIMA „cheese reaction“ nezpůsobují, protože tyramin je schopný v trávicím systému vytlačit reversibilně vázaný inhibitor z aktivního místa enzymu a v mozku navodit antidepressivní účinek. U ireversibilních, ale selektivních inhibitorů hMAO B problém s interakcí není, protože tyramin je stále účinně metabolizován pomocí hMAO A. Výjimkou je použití těchto látek ve vysokých dávkách, protože selektivita je podmíněna koncentrací (Youdim a kol., 2006). Klinicky testovaný Ladostigil by potencovat aktivitu kardiovaskulárního systému neměl, protože inhibuje MAOs specificky v mozku (Weinreb a kol., 2012).

IMAO mohou nebezpečně interagovat s léky, které zesilují jejich účinek a bezprostředně tak ohrozit pacienta na životě. V kombinaci s přípravky aktivujícími adrenergní receptory zvyšují krevní tlak až do stavu hypertenzní krize. Stejně riziko hrozí při vzájemném užívání s inhibitory zpětného vychytávání noradrenalinu. Kontraindikovány jsou také s antibiotiky, které inhibují hMAOs (Kumar a kol., 2017).

Při těžkých depresích je možné kombinovat účinek IMAOs s SSRI. Tato terapie je spojena s rizikem vzniku serotoninového syndromu, což je toxický stav, při kterém dochází k nadměrné stimulaci serotoninových receptorů. Klinicky se projevuje řadou závažných příznaků, mezi něž patří i život ohrožující hypertemie (Anders a Roth, 2000; Kumar a kol., 2017). O tomto riziku musí být pacient informován, protože nadměrná dávka kombinace IMAOs a SSRI způsobí serotoninový syndrom až u 50 % léčených. U řádně informovaného

pacienta je vyšší šance na včasnou diagnózu a následnou léčbu. Serotoninový syndrom může být vyvolán i v kombinaci s volně prodejnými léčivými přípravky, například s dextrometorfanem, který je složkou sirupu proti kašli (SÚKL, 2015, on-line).

Závěr

Lidské monoaminoxidasy jsou dodnes využívány jako terapeutický cíl při léčbě deprese. Zavedením skupiny RIMA, která cílí pouze na isoformu A, se podařilo výrazně zlepšit bezpečnostní profil této skupiny antidepresiv. Stejně tomu je i u selektivně účinkujících inhibitorů hMAO B, které mohou být využity v terapii Parkinsonovy choroby nebo demence. U těchto onemocnění se využívají pro neuroprotektivní účinky, které se nepodařilo prokázat u všech inhibitorů hMAO B a jejichž rozsah se mezi jednotlivými látkami liší. Dodnes není původ neuroprotektivního účinku jednoznačně objasněn. Nově nalezené inhibitory hMAO B by mohly přispět k řešení tohoto problému nebo by mohly být účinnější v neuroprotektce než současně používaná terapeutika. Mechanismus vzniku neuroprotektce nemusí být spojen pouze s inhibicí hMAO B a nové látky by tak mohly vést k vývoji léčiv s odlišným mechanismem účinku. Pro léčbu Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby nemáme stále v současné době dostatečně účinnou farmakoterapii, tudíž je vývoj dalších léčiv inhibujících isoformu B stále aktuální.

Literatura

- Anders M., Roth J. (2000) Deprese v neurologické praxi část druhá: obecné léčebné příznaky, Galén, Praha, 24 stran.
- Bortolato M., Chen K., Shih J. C. (2008) Monoamine oxidase inactivation: From pathophysiology to therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, 60, str. 1527-1533.
- Galter D., Buervenich S., Carmine A., Anvret M., Olson L. (2003) ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiology of disease*, 14, str. 637-647.
- Geha R. M., Rebrin I., Chen K., Shih J. C. (2001) Substrate and Inhibitor Specificities for Human Monoamine Oxidase A and B Are Influenced by a Single Amino Acid. *Journal of biological chemistry*, 276, str. 9877-9882.
- Green A. R., Mitchell B. D., Tordoff A. F., Youdim M. B. (1977) Evidence for dopamine deamination by both type A and B monoamine oxidase in rat brain in vivo and for the degree of inhibition of enzyme necessary for increased functional activity of dopamine and 5-hydroxytryptamine. *British journal of pharmacology*, 60, str. 343-349.
- Halliwell B. (1992) Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *Journal of neurochemistry*, 59, str. 1609-1623.
- Higgins J. P. T., Flicker L. (2009) Lecithin for dementia and cognitive impairment. *Cochrane collaboration*, 1, str. 1-25.
- Kaludercic N., Perez J. M., Paolocci N., Parini A., Lisa F. D. (2014) Monoamine oxidase as source of oxidants in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 0, str. 34-42.
- Klann E., Thiels E. (1999) Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 23, str. 359-376.
- Kumar B., Gupta V. P., Kumar V. (2017) A Perspective on Monoamine Oxidase Enzyme as Drug Target: Challenges and Opportunities. *Current drug targets*, 18, str. 87-97.

- Lamensdorf I., Eisenhofer G., Harvey White J., Nechustan A., Kirk K., Kopin I. J. (2000) 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde potentiates the toxic effects of metabolic stress in PC12 cells. *Brain research*, 868, str. 191-201.
- Lenders J. W. M., Eisenhofer G., Abelling N. G. G. M., Berger W., Murphy D. L., Konings C. H., Wagemakers L. M. B., Kopin I. J., Karoum F., van Gennip A. H., Brunner H. G. (1996) Specific Genetic Deficiencies of the A and B Isoenzymes of Monoamine Oxidase Are Characterized by Distinct Neurochemical and Clinical Phenotypes. *Journal of clinical investigation*, 97, str. 1010-1019.
- Norenberg M. D., Rama Rao K. V., Jayakumar A. R. (2004) Ammonia Neurotoxicity and the Mitochondrial Permeability Transition. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 36, str. 303-307.
- Rao T. S. S., Yeragani V. K. (2009) Hepertensive crises and cheese. *Indian journal of psychiatry*, 51, str. 65-66.
- Salomone S., Caraci F., Leggio G. M., Fedotova J., Drago F. (2011) New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *British journal of clinical pharmacology*, 73, str. 504-517.
- Sharma S. K., Carlson E. C., Ebadi M. (2003) Neuroprotective actions of Selegiline in inhibiting 1-methyl, 4-phenyl, pyridinium ion (MPP⁺)-induced apoptosis in SK-N-SH neurons. *Journal of neurocytology*, 32, str. 329-343.
- Shin M. H., Jang J. H., Surh Y. J. (2004) Potential Roles of NF- κ B and ERK1/2 in Cytoprotection against Oxidative Cell Death Induced by Tetrahydropapaveroline. *Free radical biology & medicine*, 36, str. 1185-1194.
- Simon L., Szilágyi G., Bori Z., Orbay P., Nagy Z. (2001) (-) -D-Deprenyl attenuates apoptosis in experimental brain ischaemia. *European journal of pharmacology*, 430, str. 235-241.
- Slezak J., Tribulova N., Pristacova J., Uhrík B., Thomas T., Khaper N., Kaul N., Singal P. K. (1995) Hydrogen peroxide changes in ischemic and reperfused heart. *Cytochemistry and biochemical and X-ray microanalysis*. *American journal of pathology*, 147, str. 772-781.
- SÚKL Farmakoterapeutické informace: Serotoninový syndrom [on-line]. Datum vytvoření 1/2015 [28.06.2020]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/sukl/2015>
- Tipton K. F., O'Sullivan J., Youdim M.B.H. (2004) Monoamine oxidase (MAO): function in the central nervous system (Encyclopedia of Neuroscience, Squire L. R.), Elsevier science & technology, London, 10500 stran.
- Weinreb O., Amit T., Bar-Am O., Youdim M. B. H. (2012) Ladostigil: A Novel Multimodal Neuroprotective Drug with Cholinesterase and Brain-Selective Monoamine Oxidase Inhibitory Activities for Alzheimer's Disease Treatment. *Current drug targets*, 13, str. 483-494.
- Weyler W., Hsu Y.P.P., Breakefield X.O. (1990) Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacology & therapeutics*, 47, str. 391-417.
- Yamada M., Yasuhara H. (2004) Clinical Pharmacology of MAO Inhibitors: Safety and Future. *Neurotoxicology*, 25, str. 215-221.
- Yang L., Omori K., Suzukawa J., Inagaki C. (2004) Calcineurin-mediated BAD Ser155 dephosphorylation in ammonia-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters*, 357, str. 73-75.
- Youdim M. B. H., Edmondson D., Tipton K. F. (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature reviews neuroscience*, 7, str. 295-309.

Antimikrobiální aktivita stříbrných nanočástic syntetizovaných pomocí odpadů ze zpracování technického konopí

J. Michailidu, A. Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Velkým tématem současnosti je rostoucí význam využití nanočástic kovů; jejich udržitelná a nákladově efektivní produkce je však stále předmětem výzkumu. Nejvýznamnější podíl studií v tomto kontextu se zabývá takzvanou biologickou syntézou nanočástic, tedy použitím biologických činitelů, které zde působí jako redukční a stabilizační činidla. V této studii byla sledována biologická produkce nanočástic stříbra za využití rostlinného extraktu, konkrétně byly využity odpady ze zpracování technického konopí. Následně byla sledována antimikrobiální aktivita produkovaných nanočástic proti suspenzním buňkám gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Bylo zjištěno, že konopný odpad lze použít k produkci nanočástic stříbra, které vykazují silnou inhibiční aktivitu vůči suspenzním buňkám *P. aeruginosa* již při použití nízkých koncentrací.

Úvod

Nanočástice kovů jsou definovány jako objekty se všemi rozměry v rozmezí 1 až 100 nm. Právě malé měřítko nanočásticím propůjčuje jejich výjimečné optoelektrické, katalytické či antimikrobiální vlastnosti. Nanočástice stříbra hrají v kontextu antimikrobiální aktivity prim, i díky své efektivitě proti patogenům rezistentním k tradičním antibiotikům (Siddiqi a kol., 2018).

Využitelnost stříbrných nanočástic v různých kontextech, od lékařských pomůcek až po domácí spotřebiče, je dnes již známým faktem. S jejich vzrůstající aplikací se však zvyšují také nároky na jejich produkci. V současnosti využívané metody syntézy jsou ekologicky či ekonomicky nevýhodné, a proto je zkoumání alternativních přístupů v současnosti věnována zvýšená pozornost (Schröfel a kol., 2014; Syafiuddin a kol., 2017).

Materiál a metody

Materiál pro biosyntézu

Odpad ze zpracování technického konopí, dusičnan stříbrný (Sigma aldrich), ethanol (40%), destilovaná voda.

Příprava extraktu

150 mg konopného odpadu bylo homogenizováno za použití kuchyňského mixéru a následně macerováno po dobu 24 h společně s 600 ml 40% ethanolu. Směs byla posléze filtrována přes laboratorní filtrační papír (8 µm) a následně přes filtr s porozitou 0.2 µm. Výsledný extrakt byl uchováván v temnu a chladu.

Biosyntéza nanočástic

Konopný extrakt byl smíchán s roztokem dusičnanu stříbrného tak, aby výsledná směs obsahovala 10 % extraktu a 1 mM dusičnanu stříbrného. Tato směs byla ponechána reagovat po dobu 24 h a následně byla provedena detekce nanočástic pomocí UV-VIS spektrofotometru.

Mikrobiální kmen a kultivační médium

Antimikrobiální účinky vytvořených nanočástic byly sledovány na gramnegativní oportunně patogenní bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145, DBM 3081, DBM 3777). Mikroorganismy byly prekultivovány po dobu 24 h v Luria Bertani (LB) médiu při 37 °C.

Sledování antimikrobiální aktivity proti suspenzním buňkám

Inhibice suspenzních buněk v přítomnosti nanočástic stříbra byla určena pomocí mikrokultivačního zařízení Bioscreen C. Buňky *P. aeruginosa* byly kultivovány po dobu 24 h v přítomnosti různých koncentrací stříbrných nanočástic (0,31; 0,63; 1,25; 1,88; 2,50; 3,13; 4,69 obj. %), přičemž každý experiment byl proveden v 10 paralelách.

Výsledky a diskuze

Biosyntéza nanočástic kovů za pomoci ethanolového extraktu z konopného odpadu byla potvrzena pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Spektra získaná z měření směsi po 24 h obsahovala charakteristický peak při vlnové délce 450 nm. Tento absorpční pás, jenž je

způsoben jevem zvaným lokalizovaná povrchová plasmonová resonance, je zmiňován také v dalších studiích sledujících možnosti biologické syntézy stříbrných nanočástic (Sadeghi a Gholamhoseinpoor, 2015; Khan a kol., 2014).

V této studii byla sledována i antimikrobiální aktivita připravených nanočástic proti suspenzním buňkám tří kmenů gramnegativní oportunně patogenní bakterie *P. aeruginosa* (ATCC 10145, DBM 3081, DBM 3777) (Tab. I). U všech sledovaných kmenů *P. aeruginosa* byla pozorována více než 90% inhibice již při použití 0.63 obj. % nanočástic stříbra. Ve studii Arokiyaraj a kol. (2017) byla studována antimikrobiální aktivita stříbrných nanočástic připravených pomocí kořenového extraktu *Rheum palmatum* a bylo zjištěno, že pro dosažení 90% inhibice bylo zapotřebí 15 mg/l nanočástic stříbra.

Tab. I

Mikroorganismus	Inhibice při 0.63 obj. % nanočástic (%)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	> 90
<i>P. aeruginosa</i> (DBM 3081)	> 90
<i>P. aeruginosa</i> (DBM 3777)	> 90

Závěr

Z výsledků této studie vyplývá, že konopný extrakt ze zemědělského odpadu je efektivním prostředkem pro produkci nanočástic stříbra. Produkované nanočástice navíc vykazovaly více než 90% inhibici proti suspenzním buňkám všech studovaných kmenů bakterie *P. aeruginosa*.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt A2_FPBT_2020_319882002.

Literatura

- Arokiyaraj, S., Vincent, S., Saravanan, M., Lee, Y., Oh, Y. K., Kim, K. H. (2017) Green synthesis of silver nanoparticles using *Rheum palmatum* root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45, str. 372-379.
- Khan, M., Khan, S. T., Khan, M., Adil, S. F., Musarrat, J., Al-Khedhairy, A. A., Al-Warthan, A., Siddiqui, M. R. H., Alkhatlan, H. Z. (2014) Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized using *Pulicaria glutinosa* plant extract as a green bioreductant. *International Journal of Nanomedicine*, 28, str. 3551-3565.
- Sadeghi, B., Gholamhoseinpoor, F. (2015) A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, str. 310-315.
- Schröfel, A., Kratošová, G., Šafařík, I., Šafaříková, M., Raška, I., Šor, L. M. (2014) Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – A review. *Acta Biomaterialia*, 10, str. 4023-4042.
- Siddiqi, K. S., Husen, A., Rifaqat, R. A. K. (2018) A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, str. 1-28.
- Syafiuddin, A., Salmiati, Salim, M. R., Kueh, A. B. H., Hadibarata, T., Hadi, N. (2017) A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 64, str. 732-756.

Antibakteriální aktivita zlatých nanočástic připravených pomocí extraktu z *Vitis vinifera*

A. Miškovská, A. Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Medicína v posledních letech čelí problémům, které jsou spojeny s hojným výskytem bakterií rezistentních k dostupným antibiotikům. Možné východisko by mohly nabízet přístupy využívající nanočástice kovů. Nanočástice obvykle definujeme jako mikroskopické objekty, jejichž všechny tři vnější rozměry spadají do intervalu 1–100 nm. Právě miniaturizace uděluje nanočásticím velmi zajímavé vlastnosti, mezi které patří také antimikrobiální aktivita. V současné době mohou být kovové nanočástice připravovány pomocí fyzikálních, chemických či biotechnologických metod. Biotechnologické přístupy bývají na rozdíl od ostatních zmíněných rychlé, šetrné k životnímu prostředí a ekonomicky nenáročné. Cílem studie byla biologická syntéza nanočástic zlata pomocí extraktu z vinné révy a následné stanovení jejich antibakteriální aktivity proti gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. V experimentech byl sledován vliv připravených nanočástic na růst suspenzních buněk dvou kmenů této bakterie a to *P. aeruginosa* ATCC 10145 a 15442. Výsledky ukázaly, že nanočástice zlata připravené pomocí extraktu z *V. vinifera* vykazují antibakteriální účinky proti oběma kmenům *P. aeruginosa*.

Úvod

Nanotechnologie využívající kovové nanočástice se v posledních letech stávají nedílnou součástí lidské činnosti. S velkým rozmachem tohoto odvětví souvisí současné možnosti průmyslové produkce nanočástic. Existuje mnoho přístupů k tomu, jak nanočástice připravovat. Je však nutné brát v úvahu udržitelnost těchto metod, a proto jsou hledány metody šetrné, rychlé a ekonomicky nenáročné. Mezi takové můžeme zařadit také metody biotechnologické, které využívají pro syntézu nanočástic kovů biologické činitele (rostliny, rostlinné extrakty, mikroorganismy, lyzáty) (Thakkar a kol., 2010).

Pro medicínu jsou nanočástice kovů mimo jiné zajímavé pro své antibakteriální účinky. K těmto účelům jsou nejčastěji používány a studovány nanočástice kovů jako jsou stříbro (Ag), zlato (Au), měď (Cu) a platina (Pt). Konkrétně zlaté nanočástice (AuNPs) poutají pozornost vědců a lékařů díky nízké toxicitě pro živočišné buňky (Lara a kol., 2011). Přestože je zlato jako kov shledáno jako bezpečné a chemicky inertní (Alkilany a Murphy, 2010), mohou

nanočástice vykazovat antibakteriální účinky (MubarakAli a kol., 2011). Bylo zjištěno, že míra antibakteriálních účinků zde závisí na způsobu funkcionalizace povrchu. Nanočástice zlata připravené biotechnologickými postupy často vykazují mnohem vyšší efektivitu vůči bakteriálním patogenům narozdíl od těch připravených chemicky či fyzikálně (Zhang a kol., 2015). Zvláštní pozornost zasluhují nanočástice zlata připravené pomocí rostlinných extraktů. Takto připravené AuNPs jsou často obklopeny a stabilizovány biomolekulami, které jsou v rostlinných extraktech přirozeně přítomné. Mezi další nesporné výhody této syntézy patří rychlost, jednoduchý scale-up, nízké nároky na spotřebu energie, šetrnost k životnímu prostředí a ekonomická nenáročnost (Geethalakshmi a Sarada, 2012).

Cílem této studie bylo připravit AuNPs pomocí extraktu z odpadních částí zemědělsky významné rostliny – vinné révy (*Vitis vinifera*) a posléze prozkoumat jejich antibakteriální aktivitu vůči obávané podmíněně patogenní bakterii *P. aeruginosa*. Nanočástice zlata byly připravovány konkrétně pomocí extraktu ze zdřevnatělých letorostů této rostliny. Antibakteriální efekty byly sledovány na suspenzních buňkách dvou kmenů *P. aeruginosa* (ATCC 10145, ATCC 15442).

Materiál a metodika

Příprava extraktu *V. vinifera*

Usušené letorosty vinné révy byly nejprve homogenizovány pomocí laboratorního mlýnku. Následně bylo 150 g homogenizovaných letorostů smícháno s 600 ml 40% ethanolu. Směs byla ponechána v temnu při laboratorní teplotě reagovat 24 hodin. Poté byl extrakt přefiltrován přes filtrační papír a mikrofiltr (0,22 μ m).

Biosyntéza nanočástic zlata

Nanočástice zlata byly připraveny smícháním 6 obj. % extraktu *V. vinifera* a kyseliny chlorozlatité tak, aby výsledná koncentrace HAuCl_4 v roztoku činila 2 mM. Směs byla ponechána reagovat v temnu při laboratorní teplotě 24 hodin. Po uplynutí dané doby byla provedena spektrofotometrická analýza vzorku v UV-VIS oblasti pomocí zařízení TECAN reader. Suspenze byla nadále uchovávána v chladu a temnu pro antimikrobiální experiment.

Sledování antibakteriálních účinků AuNPs pomocí mikrokultivačního zařízení BioscreenC

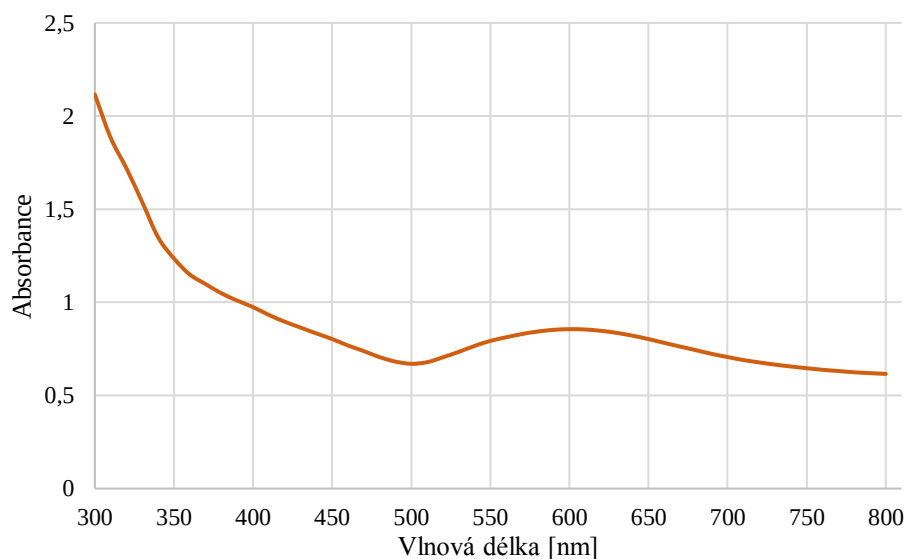
Bakterie uchovávaná v podobě kryokonzervy byla nejprve rozmrazena a asepticky zaočkována do 100 ml sterilního LB média. Buňky byly kultivovány na orbitální třepačce (37 °C, 150 rpm) po dobu 24 hodin. Následující den byla suspenze buněk odstředěna a pomocí spektrofotometru byla upravena optická denzita inokula na hodnotu $0,100 \pm 0,020$.

Do mikrotitrační destičky byly nejprve pipetovány AuNPs v rozsahu koncentrací 3,1–40,6 obj. % (vyjma kontroly). Poté byly jamky doplněny na objem 130 μl pomocí fosfátového pufru ($\text{pH} = 7,4$). Na závěr bylo do každé z jamek přidáno 160 μl sterilního LB média a 30 μl inokula. Veškeré výše popsané úkony byly prováděny v laminárním boxu a vliv jednotlivých koncentrací AuNPs byl sledován v 10 opakováních.

Připravená mikrotitrační destička byla umístěna do zařízení BioscreenC, jež každých 30 minut po dobu 24 hodin snímalo optickou denzitu (OD). Ze změny OD oproti kontrole (bez AuNPs) byl odečten vliv nanočástic zlata na růst suspenzních buněk bakterie.

Výsledky a diskuze

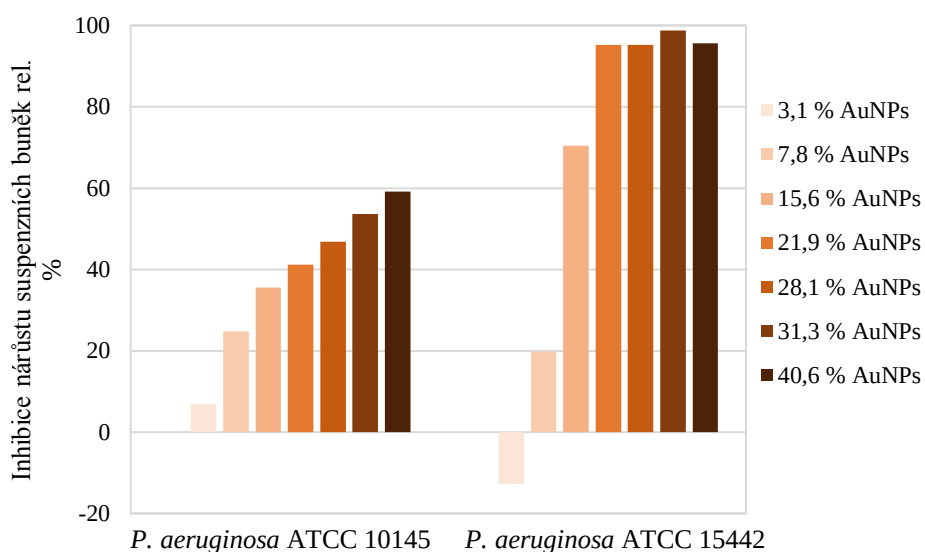
Pomocí extraktu z *V. vinifera* se nám podařilo biosyntetizovat nanočástice zlata. Absorpční spektrum připravených AuNPs v UV-VIS oblasti znázorňuje obrázek 1. Na obrázku je možné pozorovat oblý peak s maximem v oblasti 600 nm. Spektrum připravených nanočástic je charakteristické spíše pro větší částice zlata o rozměru ~ 100 nm a více (www.sigmaaldrich.com, 2020). Pro částice zlata těchto rozměrů je dle literatury rovněž charakteristické hnědo-oranžové zabarvení, které bylo možné pozorovat i na našem vzorku (Menon a Devadas, 2019).



Obr. 2 UV-VIS absorpční spektrum AuNPs připravených pomocí extraktu z letorostů *V. vinifera*

Výsledky antibakteriálního experimentu vyjádřené jako inhibice nárůstu planktonních buněk bakterie v relativních % vztažených ke kontrole (bez přidavku AuNPs) znázorňuje obrázek 2. Z obrázku je patrné, že AuNPs připravené pomocí extraktu z letorostů *V. vinifera* inhibují růst planktonních buněk obou testovaných kmenů *P. aeruginosa*. V případě kmene

P. aeruginosa ATCC 10145 byl nárůst suspenzních buněk nejvíce inhibován použitím nejvyšší koncentrace zkoumaného rozsahu AuNPs, přičemž inhibice činila téměř 60 rel. %. U kmene *P. aeruginosa* ATCC 15442 se podařilo zaznamenat MIC₉₀, která činila 21,9 obj. % AuNPs.



Obr. 2 Inhibice suspenzních buněk *P. aeruginosa* při testovaném rozsahu koncentrací (obj. %) nanočástic zlata vyjádřená v relativních % vzhledem ke kontrole (100 %, bez vlivu AuNPs)

Závěr

Práce byla zaměřena na studium ekologicky a ekonomicky šetrné přípravy AuNPs za využití letorostů zemědělsky významné rostliny *V. vinifera* a na stanovení antibakteriální aktivity takto připravených nanočástic. V rámci studie bylo zjištěno, že extrakt z *V. vinifera* je vhodným činidlem pro biosyntézu nanočástic zlata. Připravené AuNPs rovněž prokázaly antibakteriální aktivitu proti oběma kmenům *P. aeruginosa*. V případě *P. aeruginosa* ATCC 10145 bylo dosaženo inhibice téměř 60 rel. % (40,6 obj. % AuNPs), zatímco v případě *P. aeruginosa* ATCC 15442 bylo možné pozorovat MIC₉₀, jež se rovnala 21,9 obj. % AuNPs.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt A2_FPBT_2020_319882002.

Literatura

- Alkilany A. M., Murphy C. J. (2010) Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *Journal of nanoparticle research*, 12, str. 2313-2333.
- Geethalakshmi R., Sarada D. (2012) Gold and silver nanoparticles from *Trianthema decandra*: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *International journal of nanomedicine*, 7, str. 5375.
- Gold Nanoparticles: Properties and Applications, 2020. [sigmaaldrich.com. https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html](https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html) (accessed April 08, 2020).
- Lara Y., Nguyen T., Marilena L., Alexander M. (2011) Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today*, 6, str. 585-607.
- Menon D., Devadas M. S. (2019) Engaging preservice secondary science teachers in an NGSS-based energy lesson: A nanoscience context. *Journal of Chemical Education*, 96, str. 528-534.
- MubarakAli D., Thajuddin N., Jeganathan K., Gunasekaran M. (2011) Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85, str. 360-365.
- Thakkar K. N., Mhatre S. S., Parikh R. Y. (2010) Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6, str. 257-262.
- Zhang Y., Shareena Dasari T. P., Deng H., Yu H. (2015) Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 33, str. 286-327.

Zastoupení endofytů ve vinicích s odlišným přístupem pěstování

T. T. M. Nguyenová, M. Vrublevskaya, I. Kolouchová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Rostliny jsou neustále vystavovány biotickým a abiotickým stresům. Endofyty mohou podporovat jejich růst a zajistit lepší odolnost rostliny vůči nepříznivým podmínkám. Jedná se o asymptomatické mikroorganismy, které kolonizují rostlinná pletiva. Nejčastějšími kolonizátory rostlinných tkání jsou bakteriální a fungální mikroorganismy, jejichž zastoupení se liší například místem osídlení, stavem rostliny či způsobem pěstování. Metabolity produkované endofyty, mohou být potenciálním zdrojem nových látek, které by mohly najít uplatnění v různých průmyslových odvětvích jako je medicína či zemědělství.

Úvod

V současné době převažuje ve vinicích konvenční přístup. Konvenční zemědělství se vyznačuje používáním chemických hnojiv a různých syntetických pesticidů pro zajištění vysoké produkce, nevýhodou je však negativní dopad na životní prostředí (Barbosa a kol. 2015).

Další strategií může být ekologický postoj, který vede k dlouhodobě udržitelným půdám. Ekologické vinice nepoužívají syntetické herbicidy, pesticidy nebo minerální hnojiva, vinaři se spoléhají na přírodní látky v boji s plevelem a škůdci, do půdy dodávají živiny přirozeným hnojením (Zilber a kol. 2010). Biodynamické zemědělství spadá do ekologického a vyznačuje se navíc aplikací biodynamických přípravků.

Potenciálně možným způsobem ošetřování révy mohou být postřiky z endofytů. Endofyty jsou asymptomatické ubikvitní mikroorganismy, které jsou s rostlinami v symbiotickém vztahu, svými metabolity chránit rostlinu před biotickými a abiotickými stresy (Khan a kol. 2016).

ACC deaminasa je enzym běžně se vyskytující u mnoha půdních mikroorganismů (bakterie, houby), je zodpovědný za štěpení prekursoru ethylenu ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina) na amoniak a α -ketobutyrate (Glick a kol. 2007). Etylen se nachází ve všech vyšších rostlinách a má vliv na růst kořenů, listů, stonků, plodů a květů. Při vystavení biotickému, abiotickému stresu se produkce ethylenu zvyšuje, při vyšších koncentracích může docházet ke žloutnutí a vypadávání listů nebo až odumírání rostliny (Glick a kol. 2007).

Fosfor je limitujícím prvkem pro rostliny, neboť se vyskytuje v půdě v nerozpustných formách. Rostliny mohou absorbovat fosfor pouze v podobě H_2PO_4^- a HPO_4^{2-} iontů. Hlavním mechanismem solubilizace fosfátů v minerální půdě je snižování pH v okolí a chelatace kationtů kovů vázaných k fosforu mikrobiální produkcí organických kyselin a jejich solí. Mineralizace organických forem fosforu probíhá prostřednictvím kyselých fosfatů. Fosfatasy usnadňují přeměnu nerozpustných forem fosforu na rostlinou využitelné formy (Rajkumar a kol. 2009).

Konvenční zemědělství

Z 8 milionů hektarů viničních půd na celém světě je 90 % vedeno konvenčně, 9 % ekologicky a zbylé 1 % biodynamicky (Soustre-Gacougnolle a kol. 2018). „Konvenční“ nebo „moderní průmyslové zemědělství“ bylo historicky definováno jako pěstování plodin v půdě, či na čerstvém vzduchu, se zavlažováním a aktivním používáním živin, pesticidů a herbicidů. Mezi negativní dopady konvenčního zemědělství patří neefektivní využívání vody, vysoké koncentrace živin a pesticidů v odpadních vodách a degradace půdy doprovázená erozí (Barbosa a kol. 2015). Vyčerpaná půda se projevuje ztrátou struktury, zhuštěním a sníženým obsahem organického uhlíku. Půda má důležitou roli v globálních klimatických procesech regulací emisí oxidu uhličitého, oxidu dusného a methanu. Půda je v celosvětovém měřítku největším suchozemským zásobníkem uhlíku, a proto má velký vliv na koncentraci oxidu uhličitého v atmosféře (Houghton a kol. 2007).

S neustále rostoucí světovou populací musí být také přizpůsobena produkce potravin. Přibližně 38 % půdy a 70 % odebrané sladké vody je v současné době použito v zemědělství (Barbosa a kol. 2015). Dlouhodobě obdělávané konvenční půdy mohou být nákladnější na údržbu, poněvadž se do půdy musí dodávat větší množství chemikálií, které ale podporuje vyčerpání půdy. Ekologické farmy umožňují vlastníkům používat půdy po delší dobu (Zilber a kol. 2010), takové půdy mají vyšší množství organických látek a polysacharidů (Reganold a kol. 1987). Alternativní strategií pěstování plodin může být například integrovaný systém pěstování plodin, které kombinuje použití agrochemikálií, organických hnojiv a biologického řízení, zlepšuje hospodaření s půdou a vodou, což vede k udržitelnému zemědělství. Ke kontrole rostlinných patogenů se také dají používat biokontrolní činitelé, kteří mají minimální dopad na životní prostředí. Mezi biokontrolní agens patří například houby rodu *Agrobacterium*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, nepathogenní houby rodu *Fusarium*, *Petriella* a *Trichoderma*, nebo

také bakterie rodu *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* a *Streptomyces* (De Silva a kol. 2019).

Pesticidy v konvenčním zemědělství

Agrochemikálie se dají rozdělit do dvou velkých skupin, a to na chemická hnojiva (obsahující minerály jako je dusík, fosfor, draslík) a na pesticidy (insekticidy, fungicidy, herbicidy) (De Silva a kol. 2019).

Dlouhodobé používání organických a anorganických pesticidů ve vinicích způsobuje zvýšenou koncentraci polutantů v půdě. Kontaminace kovy a organickými látkami vedou k erozím a redukci kvality půdy, což představuje environmentální a toxikologickou hrozbu (Komárek a kol. 2010). Francie ročně aplikuje až 100 tisíc tun pesticidů, které mohou kontaminovat povrchové i spodní vody. Herbicidy jsou aplikovány přímo do půdy, fungicidy a insekticidy jsou smývány z rostlin dešťovými srážkami. Glyfosát patří mezi často používaný pesticid, jeho degradační produkt AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionová kyselina) má dlouhý poločas rozpadu (151 dní). Celková toxicita směsí pesticidů vyskytující se ve vodě může být vyšší než suma toxicit jednotlivých pesticidů (Gregoire a kol. 2010). Vyčerpané viniční půdy jsou náchylnější ke kontaminaci (Komárek a kol. 2010).

Největší ztráty ve sklizních jsou způsobeny fungálními patogeny (De Silva a kol. 2019). V evropských ekologických vinicích jsou zakázány syntetické organické fungicidy, zatímco fungicidy na bázi mědi ($\text{Cu}(\text{OH})_2$, $3\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuCl}_2$, CuSO_4 a Cu_2O) jsou povoleny do určitého množství. Používání fungicidů na vinicích vyvolává obavy veřejnosti z důvodů přítomnosti pesticidů ve vodě a ve vinařských produktech. Fungicidy na bázi mědi se také používají při pěstování chmele, kávovníku, jabloní, avokádových sadů nebo také při pěstování zeleniny jako jsou rajčata a brambory. Průměrná koncentrace mědi v půdě je 30 mg/kg a jeho rozpustnost je závislá na pH (rozpustnější je při hodnotách pod 6), v kyselých půdách způsobuje znečištění podzemní vody, neboť snadno migruje napříč půdními profily. Při pH nad 7,5 je měď solubilizována s půdní organickou hmotou a tvoří Cu-SOM komplexy (soil organic matter) (Komárek a kol. 2010).

Fungicidy se poprvé začaly aplikovat s objevením směsi Bordeaux v roce 1885, která je považovaná za první generaci fungicidů. Tato chemikálie se používala na révy napadené plísněmi. Následující generace fungicidů působí na povrchu rostlin nebo pronikají do rostlinné tkáně. Od 80. let minulého století až do současné doby se využívají fungicidy, které interferují s fungálním průnikem do hostitelských rostlin a aktivují rostlinou rezistenci. Pesticidy mají nepříznivé účinky jak na člověka, tak na ekosystém, způsobují znečištění prostředí,

potravinového řetězce, půdy a snižují úrodnost půdy. Některé fungicidy mohou ovlivňovat půdní mikrobiotu, a to zejména houby rodu *Penicillium* a *Trichoderma*. Dlouhodobé používání hnojiv s obsahem dusíku může způsobit kontaminaci zemské vody a amonná hnojiva mohou snižovat pH půd a zvyšovat četnost onemocnění způsobenými rodem *Fusarium* (De Silva a kol. 2019).

Ekologické zemědělství

Ekologické zemědělství přispívá k dlouhodobé ochraně půdy, vody, ovzduší, biotopů volně žijících rostlin a živočichů, a může zajišťovat jejich genetickou rozmanitost (Mander a kol. 1999). Produkty z ekologického zemědělství jsou speciálně označené a uznané „International Federation of Organic Agriculture Movements“ (IFOAM) (Mander a kol. 1999). Definice IFOAM zní: „Organické zemědělství je produkční systém, který podporuje zdraví půdy, ekosystému a lidí, spoléhá se na ekologické postupy, biodiverzitu a adaptační cyklus k okolním podmínkám než na používání látek s nepříznivými účinky. Organické zemědělství kombinuje tradici, inovaci a vědu k prospěchu prostředí a podpoře pocitovosti a dobré kvality života všech zúčastněných.“ Mezi členy IFOAM v České republice patří například Ekovín, svaz integrované a ekologické produkce hroznů a vína o.s., Česká technologická platforma pro ekologické zemědělství či PRO-BIO svaz ekologických zemědělců (IFOAM 2020).

Ochrana před škůdci a nemocemi rostlin je zajištěna střídáním plodin a mechanickým ošetřením. Ekologické zemědělství je obvykle charakterizováno výnosy, které jsou o 20 až 30 % nižší než výnosy získané intenzivním konvenčním zemědělstvím (Nielsen 2019).

Při přechodu z konvenčně ošetřované půdy na ekologické ošetření musejí být dodržovány ekologické postupy minimálně po dobu 3 let. Ekologické vinice nepoužívají herbicidy, pesticidy nebo chemická hnojiva, vinaři se spoléhají na přírodní látky v boji s plevelem a škůdci, do půdy dodávají živiny přirozeným hnojením. Vinice ošetřené pesticidy nemají podle Zilber a kol. vliv na zdraví konzumentů a zřejmě ani neovlivňují chuť vína. Často se ale tvrdí, že biovína mají v porovnání s konvenčními víny čistší chuť (Zilber a kol. 2010).

Oblasti s největšími ekologicky ošetřenými zónami jsou Oceánie (17,3 milionů ha, 40 % celosvětové ekologické zemědělské půdy), Evropa (11,6 milionů ha, 27 %) a Latinská Amerika (6,8 milionů ha, 15 %). Celkově představují ekologické vinice 4,5 % z celkového organického povrchu. Země s největšími ekologickými plochami jsou Španělsko (84 381 ha), Itálie (72 361 ha) a Francie (66 211 ha) (Castellini a kol. 2017).

Jedním z hlavních cílů ekologického zemědělství je optimalizovat zdraví a rozmanitost půdní mikrobiální komunity. V porovnání s konvenčně vedenými farmami, vykazují

ekologické postupy větší množství mikrobiálních populací v půdě, vyšší aktivitu a také různorodost, což pravděpodobně vede i ke zvýšené přítomnosti endofytů v rostlinných pletivech. Pozitivní ovlivnění mikrobiálních populací by mohlo přispět ke zvyšování příjmu živin rostlinami, potlačení výskytu rostlinných chorob a celkovému zlepšení zdraví rostlin pomocí mikrobiálně zprostředkovaných procesů (Xia a kol. 2015).

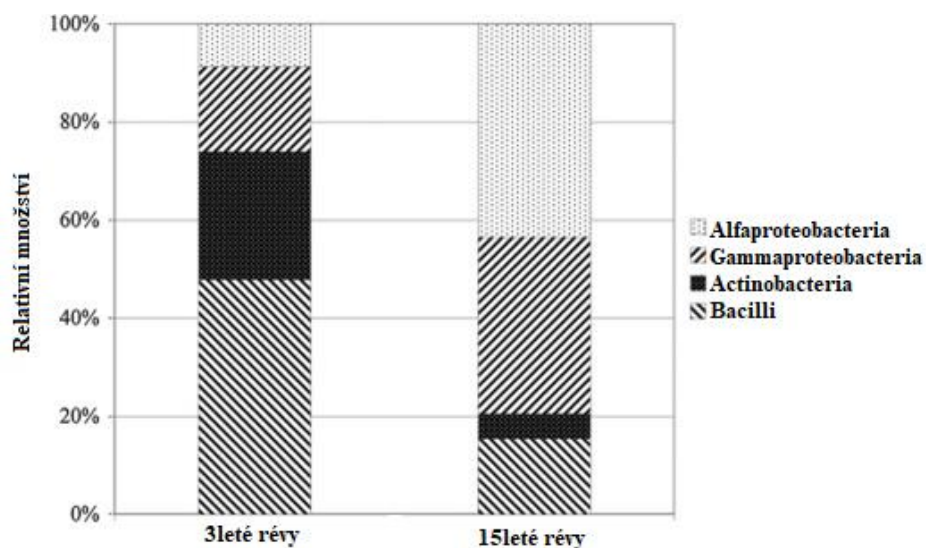
Nutriční kvalita ekologických a konvenčních plodin

Zda zemědělství ovlivňuje složení živin, nebo jestli je použití hnojiv v konvenčním zemědělství zodpovědné za snížený obsah živin v plodinách není zatím objasněné, a to z důvodu velké variability dat v zemědělství a proměnlivých faktorů jako je sluneční záření a déšť, které mohou ovlivnit obsah živin (Worthington 2001). Konzumenti jsou přesvědčeni, že organické potraviny jsou nutričně bohatší, prospěšnější pro zdraví, šetrnější k životnímu prostředí, a proto raději kupují výrobky, které pocházejí z organických farem (Jensen a kol. 2013). Pro srovnání nutriční kvality z organické a konvenční produkce neexistuje standardní metodologie, a z tohoto důvodu může být porovnání problematické a náročné (Wunderlich a kol. 2008). Ve studii Wunderlich a kol. se porovnávala nutriční hodnota v organické a konvenčně vypěstované brokolici v průběhu roku. Jako marker byl vybrán vitamín C, který používaly i jiné práce (Feldman a kol. 2006; Hazhin a kol. 2006). Obsah vitamínu v organických vzorků byl lehce vyšší než v konvenčních. Podobně tomu bylo i u jiných druhů zeleniny (Wunderlich a kol. 2008). Ve studii Worthington byly porovnány výsledky ze 41 prací, které se zabývaly složením živin v zelenině (mrkev, řepa, kapusta, brambory, špenát, rajčata, atd.), ve výsledku měly organické plodiny vyšší obsah železa, hořčíku, fosforu a vitamínu C a méně dusičnanů ve srovnání s konvenčními plodinami (Worthington 2001).

Zastoupení endofytů ve *Vitis vinifera*

Ve studii Bulgari a kol. byla zkoumána rozmanitost bakteriálních endofytů v listech vinné révy. Z vinic nacházejících se v Lombardii (severozápadní Itálie) byly shromážděny vzorky z odrůdy Barbera a byly nalezeny zástupci bakterií ze třídy *Gammaproteobacteria*, z nichž se nejčastěji vyskytovala čeleď *Enterobacteriaceae* a převážně rod *Pantoea*. Z grampozitivních bakterií pak kmen *Actinobacteria* a *Firmicutes* a rod *Bacillus* a *Enterococcus* (Bulgari a kol. 2009). Zastoupení endofytů se liší u divokých a šlechtěných rostlin, u rostlin s chorobami a u révy, která byla podrobena různým strategiím ochrany proti škůdcům. Zastoupení endofytů je také ovlivněno stářím rostliny nebo jejich rozložením v různých rostlinných orgánech. Studie Andreolliho a kol. se zabývala diverzitou bakteriálních endofytů

ve vinné révě u 3leté a 15leté révy (Obr. 1). U mladých rostlin tvořili největší podíl zástupci rodu *Bacillus* a *Actinobacteria* a u starších to byl rod *Alfaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria* (Andreolli a kol. 2016).



Obr. 1: Rozdíl mezi zastoupením endofytů u 3leté a 15leté vinné révy, upraveno podle Andreolli a kol., 2016

Při porovnání mikrobiální diverzity v divokých a šlechtěných révách byla vyšší diverzita zpozorována v divokých révách, endofyty ze šlechtěných rév ale lépe podporovaly růst rostlin svými metabolity, což naznačuje, že snížená taxonomická rozmanitost neznamená ztrátu významných vlastností využívaných v zemědělství (Campisano a kol. 2015)

Rozdíly zastoupení endofytů v závislosti na způsobu pěstování

Ve studii provedené Pancher a kol. se srovnávaly endofytní houby ve vinicích z odrůd Merlot a Chardonnay, které byly pěstovány ekologickým způsobem a v půdách, na které byla aplikována integrovaná ochrana proti škůdcům (IPM). Pozorování byla realizována v sedmi lokalitách z Trentina v Itálii s podobnými charakteristikami půdy a klimatu (Pancher a kol. 2012). IPM lze definovat jako sjednocený systém ochrany rostlin před všemi druhy škůdců (hmyzu, patogenů, plevelů, obratlovců) ekologicky a ekonomicky zdravým způsobem (Prokopy 2003). V obou vinicích převažoval rod *Alternaria*, *Epicoccum*, *Aureobasidium* a *Cladosporium*, u organických farem bylo zjištěna zvýšená četnost rodu *Alternaria* a *Epicoccum*, zatímco u IPM bylo zpozorováno vyšší zastoupení rodu *Aureobasidium* (Pancher

a kol. 2012). Podobná studie byla uskutečněna s bakteriálními endofyty. Ve všech vzorcích byl zjištěn vysoký výskyt bakterií rodu *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Burkholderia* a *Pseudomonas*. Fungální endofyty mohly být ovlivněny fungicidy používanými v IPM, zatímco bakteriální nikoliv, jelikož při testování vinic nebyla aplikována žádná baktericidní antibiotika. U IPM bylo oproti organickým farmám stanoveno výrazně vyšší zastoupení rodu *Staphylococcus* a pouze malý počet bakterií rodu *Ralstonia*. Zastoupení rodů *Burkholderia* a *Pseudomonas* se v obou půdách příliš nelišilo (Campisano a kol. 2014).

Rezistence rostlin vůči patogenům

Rostlinné choroby postihující zemědělské plodiny snižují celosvětovou produkci potravin přibližně o 10-16 %. Mezi původce těchto chorob patří například bakterie, hlístice, protozoa anebo viry, ale nejčastěji se jedná o fungální mikroorganismy, které mohou infikovat kořeny, stonky, listy, květy a plody. Abiotické faktory jako je teplota, záření, srážky, vlhkost a rychlost větru výrazně ovlivňují vývoj choroby a životní cyklus patogenů. Virulence může být zvýšena při nepříznivých podmínkách – nedostatek či naopak přebytek živin, vlhkosti, světla, nebo také přítomnost toxických sloučenin ve vzduchu či půdě (De Silva a kol. 2019).

Jako prevenci před napadením rostlin lze aplikovat agrochemikálie, přístup integrované ochrany proti škůdcům, biokontrolní agens, endofyty, nebo je také možné připravit transgenní rostliny a nové rezistentní kultivary. Integrovaná ochrana proti škůdcům je definována jako: „Šetrná produkce vysoce kvalitních plodin, upřednostňující ekologické a bezpečné metody pěstování plodin s minimálními nežádoucími vedlejšími účinky a s redukováním používáním přípravků na ochranu rostlin. Kombinace agrochemikálií, organických hnojiv, biologické kontroly a zlepšeného hospodaření s půdou, vodou vede k udržitelnému zemědělství.“ (De Silva a kol. 2019).

Lze také připravit nové rezistentní kultivary s vyšší výtěžností metodou hybridizace a genového inženýrství. Nevýhodou je možné riziko rozvoje nových patogenů, příkladem může být tritikale. Jedná se o hybrid žita a pšenice odolný vůči padlí (*Blumeria graminis*), *Blumeria graminis* f. sp. triticales je patogen, který roste na tritikale a pšenici, byl popsán jako hybrid plísně pšeničné (*B. graminis* f. sp. tritici) a plísně na žitě (*B. graminis* f. sp. secalis). U transgenních rostlin se běžně používají geny kódující chitinasy a glukanas. Nadměrnou expresí chitinasy vykazují rostliny zvýšenou odolnost vůči chorobám, tento enzym má schopnost trávit buněčnou stěnu hub (De Silva a kol. 2019)..

Biokontrola je popsána jako využití výhodných mikroorganismů, jejich genů či metabolitů, které redukují negativní účinky patogenů na rostliny limitací jejich propagace. Využití biokontrolních činitelů má minimální dopad na životní prostředí. Mezi biokontrolní agens patří například rod *Agrobacterium*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, nepatogenní *Fusarium*, *Petriella* a *Trichoderma*, dále rod *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* a *Streptomyces*. Vývoj této technologie je omezený, neboť existuje velmi málo úspěšných produktů (De Silva a kol. 2019).

Do fungálních endofytů se řadí rozmanité skupiny mikroorganismů, které lze rozdělit na základě evoluční příbuznosti, taxonomie, typu hostitelských rostlin a ekologické funkci, a to na paličkovité (čeleď *Clavicipitaceae*) a nepaličkovité (non-clavicipitaceae). Paličkovité endofyty, které kolonizují svého hostitele celý svůj životní cyklus, jsou často spojovány s čeledí lipnicovitých, příkladem je rod *Atkinsonella*, *Balansia*, *Balansiopsis*, *Echinodopsis*, *Epichloe*, *Myriogenospora*, *Neotyphodium* a *Parepichloe*. Do nepaličkovitých endofytů patří rod *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp. a *Xylaria* sp. Výzkumy jsou v současné době zaměřeny na nepaličkovité endofyty, které mají schopnost měnit životní cyklus (endofytní, saprotrfí, patogenní) (De Silva a kol. 2019).

Rostlinné patogeny mohou být rozděleny do tří kategorií na základě jejich životního stylu v hostitelských rostlinách – biotrof, nekrotrof, hemibiotrof. Biotrofové získávají pro svůj vývoj živiny z rostliny celý svůj život (Zhou 2016). Biotrofní patogeny jako jsou *Erysiphe necator* a *Plasmopara viticola*, infikují zelené tkáně révy, způsobují významné ekonomické ztráty a poškození životního prostředí z důvodů opakovaných aplikací fungicidy (Dufour a kol. 2013). *Botrytis cinerea* je příkladem nekrotrofa, který způsobuje plísňové onemocnění, po infekci okamžitě usmrcuje hostitelské tkáně a získává z nich živiny. Nekrotrofní patogeny usmrcují hostitelské buňky vylučováním toxinů a lytických enzymů, které rozkládají rostlinné pletivo. Třetí typ patogenů – hemibiotrofy, využívají biotrofní životní styl během počátečních fází infekce, ale později přechází na nekrotrofický životní styl. Patogenní houby jsou hlavními parazity révy vinné, ohrožují její pěstování a výnosy hroznů po celém světě (Zhou 2016). Patogenní houby jako *Fusarium* vstupují do rostliny přes kořeny a blokuji vaskulární systém, který způsobuje chřadnutí a následně odumírání rostliny (Cao a kol. 2005).

Endofyty působí protektivně přímo vylučováním sekundárních metabolitů proti antagonistům nebo způsobují rozpad poškozených buněk. Nepřímo vyvolávají obranné mechanismy rostlin. Produkci antibiotických nebo hydrolytických enzymů zabraňují endofyty kolonizaci rostlinnými patogeny a chrání tak hostitele před infekcemi; odpuzují hmyz a hlístice.

Rostliny jsou pak také rezistentní vůči kontaminované půdě a dokáží degradovat xenobiotika (Alvin a kol. 2014).

Poděkování za podporou GAČR v rámci projektu 18-26463S.

Literatura

- Alvin, A., Miller, K. I., Neilan, B. A. (2014) Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research*, 169, str. 483-495.
- Andreolli, M., Lampis, S., Zapparoli, G., Angelini, E., Vallini, G. (2016) Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiological Research*, 183, str. 42-52.
- Barbosa, G., Gadelha, F., Kublik, N., Proctor, A., Reichelm, L., Weissinger, E., Wohlleb, G., Halden, R. (2015) Comparison of land, water, and energy requirements of lettuce grown using hydroponic vs. conventional agricultural methods. *International journal of environmental research and public health*, 12, str. 6879-91.
- Bulgari, D., Casati, P., Brusetti, L., Quaglino, F., Brasca, M., Daffonchio, D., Bianco, P. A. (2009) Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *The Journal of Microbiology*, 47, str. 393-401.
- Campisano, A., Antonielli, L., Pancher, M., Yousaf, S., Pindo, M., Pertot, I. (2014) Bacterial endophytic communities in the grapevine depend on pest management. *PLOS ONE*, 9, str. e112763.
- Campisano, A., Pancher, M., Puopolo, G., Puddu, A., López-Fernández, S., Biagini, B., Yousaf, S., Pertot, I. (2015) Diversity in endophyte populations reveals functional and taxonomic diversity between wild and domesticated grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66, str. 12.
- Castellini, A., Mauracher, C., Troiano, S. (2017) An overview of the biodynamic wine sector. *International Journal of Wine Research*, 9, str. 1-11.
- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., Hyde, K. D. (2019) Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 32, str. 133-148.
- Dufour, M. C., Lambert, C., Bouscaut, J., Mérillon, J. M., Corio-Costet, M. F. (2013) Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 62, str. 370-382.
- Glick, B., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B. (2007) Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26, str. 227-242.
- Gregoire, C., Payraudeau, S., Domange, N. (2010) Use and fate of 17 pesticides applied on a vineyard catchment. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90, str. 406-420.
- Houghton, R. A., Butman, D., Bunn, A. G., Krankina, O. N., Schlesinger, P., Stone, T. A. (2007) Mapping Russian forest biomass with data from satellites and forest inventories. *Environmental Research Letters*, 2, str. 32-37.
- Khan, Z., Rho, H., Firrincieli, A., Hung, S. H., Luna, V., Masciarelli, O., Kim, S.-H., Doty, S. L. (2016) Growth enhancement and drought tolerance of hybrid poplar upon inoculation with endophyte consortia. *Current Plant Biology*, 6, str. 38-47.
- Komárek, M., Čadková, E., Chrástný, V., Bordas, F., Bollinger, J.-C. (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36, str. 138-151.

- Mander, Ü., Mikk, M., Külvik, M. (1999) Ecological and low intensity agriculture as contributors to landscape and biological diversity. *Landscape and Urban Planning*, 46, str. 169-177.
- Nielsen, K. M. (2019) Organic farming (*Encyclopedia of Ecology*), Elsevier, Oxford, str. 550-558.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I., Campisano, A. (2012) Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, str. 4308-4317.
- Prokopy, R. J. (2003) Two decades of bottom-up, ecologically based pest management in a small commercial apple orchard in Massachusetts. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 94, str. 299-309.
- Rajkumar, M., Ae, N., Freitas, H. (2009) Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77, str. 153-160.
- Reganold, J. P., Elliott, L. F., Unger, Y. L. (1987) Long-term effects of organic and conventional farming on soil erosion. *Nature*, 330, str. 370-372.
- Soustre-Gacougnolle, I., Lollier, M., Schmitt, C., Perrin, M., Buvens, E., Lallemant, J.-F., Mermet, M., Henaux, M., Thibault-Carpentier, C., Dembélé, D., Steyer, D., Leitao, C., Moneyron, A., Masson, J. (2018) Responses to climatic and pathogen threats differ in biodynamic and conventional vines. *Scientific Reports*, 8, str. 1-14.
- Zilber, S., Friel, D., Nascimento, L. (2010) Organic wine production: the case of Bodega Colomé in Argentina. *International Journal of Wine Business Research*, 22, str. 164-177.
- Worthington, V. (2001) Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 7, str. 161-73.
- Wunderlich, S. M., Feldman, C., Kane, S., Hazhin, T. (2008) Nutritional quality of organic, conventional, and seasonally grown broccoli using vitamin C as a marker. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, str. 34-45.
- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D., Williams, M. A. (2015) Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in Plant Science*, 6, str. 1-10.
- Zhou, J.-M. (2016) Plant pathology: a life and death struggle in rice blast disease. *Current Biology*, 26, str. 843-845.

Mikrobiologický profil geotermálnych a minerálnych prameňov

Z. Poliačiková, O. Maťátková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Česká republika sa radí medzi štáty s vysokým počtom liečivých minerálnych a termálnych prameňov vyskytujúcich sa takmer po celom jej území. Prevažná väčšina týchto prameňov má jedinečné chemické zloženie, čo je spoločné s ich termálnymi vlastnosťami využívanými na rehabilitačné a liečebné účely alebo aj ako pitný zdroj. Menej preskúmanou oblasťou ich významu je poznanie mikroorganizmov, ktoré sú súčasťou týchto prameňov a majú zaujímavé vlastnosti práve kvôli ich výskytu v týchto extrémnych prostrediach. Pramene sú často podrobené mikrobiologickým analýzám z pohľadu hygieny vody, avšak ich kompletne mikrobiologické zloženie nie je známe.

Prírodné minerálne a termálne pramene nie sú sterilným prostredím a často sa vyznačujú značnou druhovou rozmanitosťou mikroorganizmov. Štúdium mikrobiologického zloženia termálnych a minerálnych prameňov je stále vo vývoji, oproti tomu chemické zloženie takýchto prameňov je pomerne detailne preštudované.

Mikroorganizmy izolované z extrémnych prostredí sú zdrojom enzýmov stabilných v nepriaznivých podmienkach a tieto sú často využívané v priemyselných odvetviach ako sú potravinársky, kozmetický, farmaceutický, papierenský priemysel, spracovanie odpadu, či pri výrobe biopalív (Gupta a kol., 2014).

Mikrobiologický profil geotermálnych prameňov Malého Kaukazu

Termálne pramene, ktoré sa nachádzajú na Malom Kaukaze, stále predstavujú výzvu na skúmanie biodiverzity a hľadanie neopísaných biotechnologických zdrojov (Badalyan, 2000). Fyzikálne podmienky, najmä teplota, sú považované za kľúčový faktor pre mikroorganizmy a rozmanitosť prameňa. Horúce pramene na Malom Kaukaze môžu byť zoskupené do troch kategórií založených na vnútornej teplote: teplé pramene (20-37 °C), mierne horúce alebo mezotermálne pramene (37-50 °C) a horúce pramene (>50°C). Horúce pramene sú obývané rôznymi mikróbmami patriacimi do bakteriálnych a archaických domén, ktoré tolerujú extrémne podmienky (Antranikian a Egorova, 2007). V niektorých geotermálnych prameňoch na Malom Kaukaze bola charakterizovaná, pomocou metód molekulárnej genetiky, fylogenetická rozmanitosť prokaryotických spoločenstiev.

V Nagorno Karabakh (juhovýchodná časť Malého Kaukazu), viz Obr. 1, tiež Náhorný Karabach sa nachádzajú geotermálne pramene, nazývané Karvachar s teplotou 70 °C a Zuar s teplotou 42 °C, z ktorých bolo izolovaných celkom 23 termofilných tried *Bacilli* a ich analýzou sekvencií génov pre 16S rRNA sa uvádza ich vzťahy k deviatim druhom rozdelených do štyroch rodov: *Aeribacillus* (*A. pallidus*), *Anoxybacillus* (*A. flavithermus*, *A. suryakundensis*, *A. rupiensis*, *Anoxybacillus* sp.), *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. simplex*, *B. cereus*) a *Geobacillus* (*G. toebii*). Predstavitelia rodu *Anoxybacillus* dominovali v geotermálnom prameni Karvachar a tvorí ho až 67% všetkých detegovaných izolátov. V geotermálnom prameni Zuar sa nachádzalo najviac zástupcov *A. rupiensis* a *G. toebii* (Panosyan, 2017).



Obr. 1: Umiestnenie študovaných lokalít. Mapa Nagorno Karabakh s umiestnením študovaných geotermálnych prameňov 1 - Karvachar, 2 - Zuar (a); v blízkosti mapy sú fotografie zdrojových bazénov Karvachar (b) a Zuar (c) geotermálne pramene (Panosyan, 2017)

Mikrobiologický profil termálnych prameňov v Indii

V Indii je približne 400 geotermálnych prameňov (Zimik a kol., 2017). Analýza mikrobiálnej rozmanitosti horúcich prameňov v Indii bola prvýkrát zaznamenaná v devätnástom storočí. Drouet (1938) opísal 12 termofilných druhov získaných z Yale na severe Indie (Drouet, 1938).

Štúdia mikrobiálnej diverzity boli vykonané v horách Himachal Pradesh, menovite Tattapani (okres Mandi), Manikaran a Vashist (Okres Kullu) (Sharma a kol., 2013). Boli skúmané štyri tropické horúce pramene, ktoré sa nachádzajú v Atri, Athamallik, Taptapani a Tarabalo v štáte Odisha v Indii, viz Obr. 2 (Narayan a kol., 2010). Tieto pramene sa nachádzajú v dvoch odlišných regionálnych geologických líniách a vykazujú mierne variabilnú geochemickú odlišnosť (Mahala a kol., 2012). Teplota a pH štyroch teplých prameňov boli zaznamenané v rozmedzí 42-58 °C a 7,2-7,4. Najvyššia teplota bola zaznamenaná pri Atri (58 °C), potom Tarabalo (57 °C) a Athamallik (56 °C), zatiaľ čo najnižšia teplota bola zaznamenaná pri Taptapani (42 °C).

Bolo izolovaných celkom 101 mikrobiálnych kmeňov, medzi nimi len dve boli huby a zvyšné boli baktérie. Všetky izoláty môžu rásť pri alebo nad 50 °C. Výsledky farbenia podľa Grama ukázali, že len štyri izoláty boli gramnegatívne. Väčšina bakteriálnych tvarov boli tyčinky a zvyšok boli buď koky alebo kokobacily. Tieto izoláty majú schopnosť produkovať amylázu, celulózu a xylanázu (Sharma a kol., 2013).

Bolo získaných celkom 48 izolátov patriacich do čeľade *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pseudomonadaceae* a *Enterobacteriaceae*. Optimálna teplota pre rast týchto izolátov sa menila od 37 °C do 50 °C. Rod *Bacillus* prevažoval vo všetkých troch horúcich prameňoch (Atri, Taptapani a Tarabalo). Rod *Kurthia* bol izolovaný len v Atri. *Klebsiella* bola izolovaná iba v Taptapani. *Brevibacillus* bol izolovaný v Atri a Tarabalo (Sen a Maiti 2014).

Štúdia založené na kultivačných metódach viedli k identifikácii niekoľkých nových druhov baktérií z týchto teplých prameňov, ako sú *Comamonas thiooxydans*, *Gulbenkiania indica*, *Chelatococcus sambhunathii* a *Thiomonas bhubaneswarensis* (Narayan a kol., 2010). Porovnávacie taxonomické a funkčné profilovanie mikrobiálnych spoločenstiev v týchto horúcich prameňoch však nebolo vykonané.



Obr. 2: Geografické umiestnenie štyroch horúcich prameňov. Body A, B, C a D na mape predstavujú horúce pramene Athamallik, Taptapani, Tarabalo a Atri (Badhai a kol. 2015)

Štúdia Badhai a kol. (2015) opisuje mikrobiálnu rozmanitosť v týchto štyroch tropických horúcich prameňoch Indie (Obr. 2) reprezentujúcich mierne termofilné prostredie, ktorého teplotný rozsah je 40-58 °C a pH je 7,2-7,4 s oddelenou geochemickou analýzou. Údaje o metagénovej sekvencii ukázali dominanciu baktérií nad *Archaea*. Najpočetnejšími kmeňmi boli *Chloroflexi* a *Proteobacteria*, aj keď boli prítomné aj iné kmene, ako sú *Acetotermia*, *Nitrospirae*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae*, *Euryarchaeota*, *Verrucomicrobia*, *Ignavibacteriae*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Planktomycetes*, *Spirochaetes*, *Crenarchaeota* a *Aquificae*. Distribúcia hlavných rodov a ich štatistická korelačná analýza s fyzikálno-chemickými parametrami predpovedala, že teplota, vodné koncentrácie iónov (ako je sodík, chlorid, sulfát a bikarbonát), celková tvrdosť, rozpustené tuhé látky a vodivosť boli hlavné environmentálne premenné ovplyvňujúce mikrobiálne zloženie a rôznorodosť komunity (Badhai a kol., 2015).

Mikrobiologický profil minerálnych prameňov Českej republiky – Chebská kotlina

Na západe Českej republiky, blízko hraníc s Nemeckom sa nachádza Chebská kotlina. Je to plytká neogénna vnútrokontinentálna kotlina, kde sa nachádzajú minerálne pramene bohaté na oxid uhličitý (Bankwitz a kol. 2003; Fischer a kol., 2014). V štúdiách Krauze a kol. 2017 boli prešetrené štyri minerálne pramene, ktoré mali hodnoty pH v rozmedzí od 4,2-6,

nízky obsah rozpustného kyslíku, odlišnú koncentráciu organického uhlíka a aniónov/katiónov obsiahnutých prvkov. Po prvýkrát bol predstavený komplexný pohľad na mikrobiálnu štruktúru minerálnych vôd, ktoré sú ovplyvnené priechodom plynného CO₂. Prokaryotické komunity boli charakterizované pomocou kvantitatívnej PCR a sekvenovania génu kódujúceho 16S rRNA. Základnú komunitu tvorili chemolitotrofné, anaeróbne a mikroaerofilné organizmy spojené využitím síry (napríklad *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*) a železa (napríklad *Gallionella*, *Sideroxydans*). Okrem toho vody ovplyvnené CO₂ tvoria ekosystém, ktorý obsahuje mnoho taxónov, ktoré sa zvyčajne nachádzajú v morských alebo suchozemských podpovrchových ekosystémoch ako sú močiare, mokrade, slatiny a rašeliniská (Krauze a kol. 2017). Skúmané minerálne vody, mali hlbší pôvod, čo sa odrážalo na ich hydrochemických vlastnostiach. Tri minerálne vody mali plytký podpovrchový pôvod a boli získané z prameňa Mostek u Křižovatky, z prameňa minerálnej vody v blízkosti rieky Plesná a zo sladkovodnej pružiny Kopanina v blízkosti potoka. Štvrtá minerálna voda má hlbší pôvod a bola získaná z Cisárskeho prameňa v oblasti Soos (odlišná teplota 17,4 °C a vysoká koncentrácia iónov horčíka, vápnika, sodíka, mangánu, chloridu a síranu), viz Obr. 3.



Obr. 3: a) Kopanina, b) prameň pri rieke Plesná, c) Cisársky prameň, d) prameň Mostek u Křižovatky (Krauze a kol. 2017)

Všetky spomínané pramene Chebskej kotliny majú veľmi pestré mikrobiálne zastúpenie, no sú identické najmä obsahom mikróbov z kmeňov *Proteobacteria*

a *Actinobacteria*. Voda Cisárskeho prameňa pozostávala aj z kmeňov *Parcubacteria*, *Omnitrophica* a *Chloroflexi*. U podzemnej minerálnej vody u Mustku boli v mikrobiologickom profile zastúpené dokonca aj kmene *Firmicutes* a *Bacteroidetes* a najpočetnejšie zastúpenie mali rody *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Denitratisoma* a *Sulfurospirillum*. Unikátnym obsahom tejto vody bol výskyt mikroorganizmov z ríše archaea a to kmeň *Euryarchaeota* a rod *Methanoregula*. Minerálna pramenitá voda Plesná má výrazne menšie zastúpenie mikroorganizmov, dominuje najmä kmeň *Proteobacteria* a ďalšími kmeňmi sú *Sideroxydans* a *Bacteriovorax*. Mikrobiálna štruktúra povrchovej vody Kopanina bola podobná iným povrchovým vodám s vysokým výskytom kmeňov *Bacteroidetes* a *Parcubacteria*. Avšak na hlbšej taxonomickej úrovni, bolo pozorovaných niekoľko rozdielov v porovnaní s ostatnými vodami, kde najrozšírenejšími rodmi boli *Chromobacterium*, *Sulfurimonas*, *Sideroxydans* a *Ferritrophicum* (Krauze a kol. 2017).

Poděkování

Tato práce byla realizována v rámci projektu Grantové Agentury ČR, projekt 18-00036S.

LITERATÚRA

- Antranikian, G., Egorova, K. (2007) Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology. *Physiol. Biochem. Extremophiles*, str. 361–406.
- Badalyan, M. (2000) Geothermal features of Armenia: a country update. *Proceedings world geothermal congress, Kyushu-Tohoku, Japan*, str. 71–75.
- Badhai, J., Ghosh, T.S., Subrata, D. K. (2015) Taxonomic and functional characteristics of microbial communities and their correlation with physicochemical properties of four geothermal springs in Odish. *India. Front. Microbiol.*, 6, str. 1166.
- Bankwitz, P., Schneider, G., Kämpf, H., Bankwitz, E. (2003) Structural characteristics of epicentral areas in Central Europe: study case Cheb Basin (Czech Republic). *J. Geodyn.*, 35, str. 5–32.
- Drouet F. (1938) *Myxophyceae* of the Yale North India expedition, collected by G. E. Hutchinson. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 57, str. 127–131.
- Fischer, T., Horálek, J., Hrubcová, P., Vavrycuk, V., Bräuer, K., Kämpf, H. (2014) Intra-continental earthquake swarms in West-Bohemia and Vogtland: a review. *Tectonophysics*, 611, str. 1–27.
- Gupta, G.N., Srivastava, S., Khare, S.K., Prakash, V. (2014) Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *Int. J. Agric. Env. Biotechnol.*, 7, str. 371–380.
- Krauze, P., Kämpf, H., Horn, F., Liu, Q., Voropaev, A., Wagner, D., Alawi, M. (2017) Microbiological and geochemical survey of CO₂-dominated mofette and mineral waters of the Cheb basin, Czech Republic. *Front. Microbiol.*, 8, str. 2446.
- Mahala, S. C., Singh, P., Das, M., Acharya, S. (2012) Genesis of thermal springs of Odisha, India. *Int. J. Earth Sci. Eng.*, 5, str. 1572–1577.
- Narayan, K. D., Pandey, S. K., Das, S. K. (2010) Characterization of *Comamonas thiooxidans* sp. nov and the comparison of thiosulfate oxidation with *Comamonas testosteroni* and *Comamonas composti*. *Curr. Microbiol.* 61, str. 248–253.
- Panosyan, H. H. (2017) Phylogenetic diversity of thermophilic *Bacilli* isolated from geothermal springs of Nagorno Karabakh. *Proc. of the Yerevan State Univ. Chemistry and Biology*, 51, str. 179–185.
- Sen, R., Maiti, N.K. (2014) Genomic and functional diversity of bacteria isolated from hot springs in Odisha, India. *Geomicrobiol. J.*, 31, str. 541–550.
- Sharma, N., Vyas, G., Pathania, S. (2013) Culturable diversity of thermophilic microorganisms found in hot springs of northern Himalayas and to explore their potential for production of industrially important enzymes. *Sch. Acad. J. Biosci.*, 1, str. 165–178.
- Zimik, H.V., Farooq, S.H., Prusty, P. (2017) Geochemical evaluation of thermal springs in Odisha, India. *Environ. Earth. Sci.*, 76, str. 593.

Vliv extraktů *Vitis vinifera* na celkovou biomasu biofilmu vybraných zástupců bakterií gastrointestinálního traktu

M. Rollová, O. Maťátková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Tato práce se zabývá vlivem polyfenolových biologicky aktivních látek obsažených v extraktech z matolin, třapin a letorostů *Vitis vinifera* na zástupce probiotických a oportunně patogenních bakterií, úzce související s lidským trávicím traktem. V této práci byl sledován vliv extraktů z vedlejších odpadních produktů vinařského průmyslu na tvorbu a stabilitu biofilmu zástupců dvou probiotických (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus brevis* NCTC 13768) a čtyř oportunně patogenních bakterií (*Citrobacter freundii* DBM 3127, *Escherichia coli* DBM 3125, *Raoultella ornithinolytica* NCTC 14098 a *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* NCTC 13769). V rámci práce byla zjišťována vhodnost metody kvantifikace celkového obsahu biomasy biofilmu s použitím krystalové violeti pro sledování tvorby a stability biofilmu.

Úvod

Odpadní produkty vinařského průmyslu jsou dlouho opomíjenými materiály s potenciálem širokého farmaceutického a potravinářského využití. Vedlejší produkty vznikající při zpracování hroznů, tj. matoliny, třapiny a letorosty *Vitis vinifera*, jsou důležitým zdrojem biologicky aktivních látek – polyfenolů. V posledních letech jsou polyfenolové sloučeniny předmětem rostoucího vědeckého zájmu, zejména díky jejich významné roli v lidské stravě a jejich rozmanitosti potenciálních příznivých účinků v podobě doplňků stravy. Přírodní doplňky stravy jsou preferovány pro jejich minimální toxicitu, minimální vedlejší účinky, dobrou dostupnost a lepší odbouratelnost. V současné době je věnována velká pozornost studiu léčebných účinků spojených s rostlinami či rostlinnými extrakty. Využívají se jak extrakty z rostlin, tak i jejich jednotlivé složky, které tyto extrakty obsahují.

Klíčovou roli v biologické dostupnosti a tím ovlivněné biologické aktivitě polyfenolových látek má střevní mikroflóra (Cardona a kol., 2013). Polyfenoly s vysokou molekulovou hmotností jsou rozkládány mikroorganismy gastrointestinálního traktu do řady

lépe absorbovatelných nízkomolekulárních metabolitů, čímž je zlepšena jejich biologická dostupnost i účinnost (Selma a kol., 2009).. Biologická aktivita polyfenolových látek obsažených v potravě může ovlivňovat mikroorganismy vyskytující se v gastrointestinálním traktu, a to jak z hlediska jejich zastoupení, tak i působení jednotlivých druhů (Kumar Singh a kol., 2019).

Materiál a metody

Použité mikroorganismy

V rámci experimentální práce byl použit čtyři oportunně patogenní druhy bakterií a dva probiotické druhy bakterií. Oportunně patogenní bakterie *Citrobacter freundii* DBM 3127 a *Escherichia coli* DBM 3125 pochází ze sbírky Ústavu biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha. Použitá probiotická bakterie *Lactobacillus acidophilus* LA-5 pochází ze sbírky Ústavu mléka a tuků, VŠCHT Praha. V této práci klinické izoláty bakterií *Raoultella ornithinolytica* NCTC 14098 (oportunní patogen izolovaný z lidského břicha/*abdomen* před rokem 1941), *Yersinia enterocolitica* subsp. *palearctica* NCTC 13769 (oportunní patogen izolovaný z lidských exkrementů, Mnichov, Německo) a *Lactobacillus brevis* NCTC 13768 (probiotický druh izolovaný z lidských exkrementů) pochází z Národní sbírky typových kultur v Anglii (NCTC - The National Collection of Type Cultures), působící v rámci Public Health England (Wahl a kol., 2018).

Všechny použité mikroorganismy byly uchovávány v podobě kryokonzerv v 50% glycerolu při teplotě -70 °C v hlubokomrazicím boxu.

Složení kultivačních médií a roztoků

Složení kultivačního LB média pro oportunní patogeny: trypton 10 g, chlorid sodný 10 g a kvasničný extrakt 5 g v 1 l destilované vody.

Složení kultivačního MRS média pro probiotické bakterie: D-glukóza bezvodá 20 g, bakteriální pepton 10 g, masový extrakt 10 g, kvasničný extrakt 5 g, octan sodný 5 g, dihydrogenfosforečnan draselný 2 g, citrát amonný 2 g, heptahydrát síranu hořečnatého 0,2 g, monohydrát síranu manganatého 0,05 g, Tween 80 1 ml v 1 l destilované vody.

Složení fyziologického roztoku: chlorid sodný 9 g v 1 l destilované vody.

MRS médium bylo upraveno na hodnotu pH = 6,5; pH LB média bylo upraveno na hodnotu pH = 7. Dané hodnoty pH kultivačních médií byly upraveny pomocí 1M roztoku hydroxidu sodného, resp. 25% kyseliny sírové. LB médium, MRS médium a fyziologický roztok byly doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem a následně sterilovány v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 101,5 kPa po dobu 20 minut. Po sterilizaci byl do MRS média dodatečně přidán roztok glukózy (sterilovaný odděleně), tak aby její výsledná koncentrace v MRS médiu činila 20 g/l.

Použité roztoky extraktů z matolin, třapin a letorostů *Vitis vinifera* byly připraveny v laboratoři na Ústavu Biotechnologie, VŠCHT Praha. Matoliny, třapiny a zimní letorosty *Vitis vinifera* byly získány z vinice Grébovka na Praze 2.

Kultivace

Pro pre-kultivaci byly kryokultury bakterií zaočkovány do 250 ml Erlenmeyerových baněk se 100 ml sterilního média. Oportunně patogenní bakterie *Escherichia coli* DBM 3125, *Citrobacter freundii* DBM 3127, *Raoultella ornithinolytica* NCTC 14098 a *Yersinia enterocolitica* subsp. *polarctica* NCTC 13769 byly zaočkovány z kryokonzervy do 100 ml sterilního LB média. Probiotické druhy bakterií z rodu *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* LA-5 a *Lactobacillus brevis* NCTC 13768) byly zaočkovány z kryokonzervy do 100 ml sterilního MRS média. Pre-kultivace všech šesti zástupců bakterií probíhala na orbitální třepače při 150 min⁻¹ a teplotě 37 °C po dobu 24 h.

Sledování vlivu polyfenolových extraktů na tvorbu biofilmu bylo provedeno v 96jamkových polystyrenových mikrotitračních destičkách (TPP, Švýcarsko) stanovením celkového obsahu biomasy. Roztoky extraktů *Vitis vinifera* pro sledování ovlivnění tvorby biofilmu byly připraveny tak, aby výsledné koncentrace polyfenolů v jamkách mikrotitrační destičky byly 100, 300, 500, 700 a 900 mg_{GA}/l. Všechna měření byla uskutečněna v 8 paralelách.

Připravené preinokulum bylo nejprve odstředěno (10 min, 10 °C, 9000 min⁻¹) a následně byla upravena jeho optická densita na hodnotou OD_{600nm} = (0,800 ± 0,020). Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 210 μl takto upraveného inokula. Zásobní roztoky biologicky aktivních látek (extrakt z matolin, třapin a letorostů *Vitis vinifera*) a růstové médium byly přidávány v takovém množství, aby v jednotlivých jamkách bylo dosaženo

požadované koncentrace celkového obsahu polyfenolů ($\text{mg}_{\text{GA}}/\text{l}$). Maximální objem sledované biologicky aktivní látky přidávaný do jedné jamky činil 33 μl . Celkový objem jamky byl následně doplněn sterilním komplexním médiem na finální objem 280 μl . Jako kontrola byly sledovány experimenty bez přítomnosti biologicky aktivních látek (extraktů). Koncentrace rozpouštědla (40% ethanol (v/v)) v jamce nesměla překročit 5 %, aby nedošlo k ovlivnění růstu buněk (inhibici) samotným rozpouštědlem. Tato koncentrace byla pro všechny mikroorganismy součástí kontrolních experimentů a při její aplikaci nebylo pozorováno ovlivnění růstu.

Kultivace za účelem tvorby biofilmu pro *E. coli* DBM 3125, *C. freundii* DBM 3127 a *L. acidophilus* LA-5 probíhala na orbitální třepačce při 150 min^{-1} a teplotě 37°C po dobu 24 h. Kultivace klinických izolátů *R. ornithinolytica* NCTC 14098, *Y. enterocolitica* subsp. *polarctica* NCTC 13769 a *L. brevis* NCTC 13768 probíhala na orbitální třepačce při 150 min^{-1} a teplotě 37°C , po dobu 48 h.

Kvantifikace biofilmu pomocí krystalové violeti

Krystalová violet (N1,N1,N2,N2,N3,N3-hexamethylpararosanilin) se váže na negativně nabitě molekuly buněčné stěny, DNA a extracelulární polymerní látky jako jsou polysacharidy a proteiny, je tedy využívána pro sledování celkové biomasy biofilmu (Feoktistova a kol., 2016).

Postup kvantifikace biofilmu krystalovou violetí byl převzat a modifikován dle Sabaeifard a kol. (2014). Do každé jamky bylo po promytí fyziologickým roztokem pipetováno 200 μl 0,1% roztoku krystalové violeti. Jamky s biofilmem byly barveny po dobu 20 minut. Po 20 minutách následovalo vymývání jednotlivých jamek. Pomocí špiček s ustřiženými konci došlo celkem třikrát k odsátí obsahu jamek a jejich promytí fyziologickým roztokem. Poté bylo do jednotlivých jamek přidáno 200 μl 96% ethanolu. Po 10 minutách působení a následném promíchání pomocí pipety bylo z každé jamky přepipetováno 100 μl do mikrotitrační destičky. Na závěr byla spektrofotometricky změřena absorbance při vlnové délce 580 nm. Pro každou koncentraci bylo sledováno 8 paralel. Z každé série 8 paralel byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

Výsledky a diskuse

V rámci provedených pokusů, sledující vliv extraktů z matolin, třapin a letorostů *Vitis vinifera* na celkovou biomasu biofilmu vybraných zástupců mikroorganismů úzce souvisejících s gastrointestinálním traktem pomocí kolorimetrického stanovení s použitím krystalové violeti, byly zjištěny hodnoty celkové biomasy v zastoupení jednotlivých zástupců mikroorganismů (Tab. I), které odpovídají nárůstu uvedených parametrů. Tyto výsledky nejsou zcela v souladu s referenčními metodami, v mnoha případech nebyla nalezena korelace mezi kvantifikací pomocí krystalové violeti a metodami sledujícími metabolickou aktivitu buněk (výsledky neuvedeny).

Tab. I Vliv extraktu z matolin, extraktu z třapin a extraktu z letorostů *Vitis vinifera* na změnu celkového množství biomasy biofilmu vybraných mikroorganismů** - kvantifikace pomocí krystalové violeti

Koncentrace [mg _{GA} /l]		Extrakty <i>Vitis vinifera</i>		
(vztaženo na celkový obsah polyfenolů)		Matoliny	Třapiny	Letorosty
<i>L. acidophilus</i> LA-5	100	+	++	++
	500	+++	+++	+++
	900	+++	+++	++
<i>L. brevis</i> NCTC 13768	100	+	+	+
	500	+	++	++
	900	++	++	+
<i>E. coli</i> DBM 3125	100	++	++	+
	500	++	+++	+
	900	++	+++	+
<i>C. freundii</i> DBM 3127	100	+++	+++	++
	500	++	+++	++
	900	++	+++	++
<i>R. ornithinolytica</i> NCTC 14098	100	++	+	+++
	500	++	++	+++
	900	++	+++	+++
<i>Y. enterocolitica</i> subsp. <i>paleartica</i> NCTC 13769	100	++	+	+++
	500	++	++	+++
	900	++	+	+++

** Zhodnocení nárůstu celkového množství biomasy biofilmu vyjádřená v relativních procentech vztažených ke kontrole (bez vlivu biologicky aktivní látky),

nárůst: + nárůst 0-2x oproti kontrole,
 ++ nárůst 2x-10x oproti kontrole,
 +++ nárůst nad 10x oproti kontrole.

Závěr

V naší studii byla sledována antibiofilmová aktivita polyfenolových biologicky aktivních látek obsažených v extraktech z vedlejších produktů vinařského průmyslu. U použitých zástupců bakterií byl za pomoci metody barvení celkového obsahu biomasy biofilmu pomocí krystalové violeti sledován spíše nárůst celkového obsahu biomasy biofilmu. Použitím těchto extraktů došlo k nejvýznamnějšímu snížení celkového obsahu biomasy biofilmu

v případě *E. coli* DBM 3125 využitím extraktu z letorostů *Vitis vinifera*. Nejnižší antimikrobiální vliv na použité zástupce bakterií měl naopak extrakt z třepin *Vitis vinifera*, kde byl u většiny zástupců bakterií pozorován významný nárůst celkového obsahu biomasy. Nelze tedy jednoznačně považovat metodu kvantifikace pomocí krystalové violeti jako vhodnou pro sledování aktivity extraktů *Vitis vinifera* pro inhibici tvorby biofilmu u uvedených mikroorganismů. Pro sledování vlivu extraktů *Vitis vinifera* na růst a tvorbu biofilmu bude potřeba dalších měření využívajících jiné metody.

Poděkování

Tato práce byla realizována v rámci projektu Technologické agentury ČR číslo TH03030271.

Literatura

- Cardona F., Andrés-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F.J., Queipo-Ortuño M.I. (2013) Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(8), str. 1415-1422.
- Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. (2016) Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016, str. 343-247.
- Sabaeifard P., Abdi-Ali A., Soudi M. R., Dinarvand R. (2014) Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. *Journal of microbiological methods*, 105, str. 134-140.
- Selma M.V., Espin J.C., Tomas-Barberan F.A. (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), str. 6485-6501.
- Kumar Singh A, Cabral C, Kumar R, et al. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency (2019). *Nutrients*, 11(9):2216.
- Wahl D., Bernier M., Simpson S.J., de Cabo R., Le Couteur D.G. (2018) Future directions of resveratrol research. *Nutrition and Healthy Aging*, 4, str. 287-290.

Mikroorganismy rodu *Kocuria* izolované z extrémního prostředí

E. Timkina, O. Mařátková, I. Kolouchová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Rod *Kocuria* byl oddělen od rodu *Micrococcus* v roce 1995 na základě svých chemotaxonomických odlišností. Zástupci rodu *Kocuria* patří mezi gram–pozitivní koky, kolonie mohou mít na agaru žluté či červené zbarvení. Biochemické rysy jsou podobné i jiným rodům z třídy *Actinobacteria*, ale jejich kombinace je pro rod *Kocuria* unikátní (Stackebrandt a kol., 1995).

V současné době bylo identifikováno víc než 18 druhů *Kocuria* sp., které byly izolovány z rozmanitých lokalit, např. z mořského sedimentu, mořských organismů, z půdy kontaminované těžkými kovy nebo extrémně suchých lokalit, z povrchu nebo pletiv rostlin, z masa či ze savčí pokožky. Bakterie rodu *Kocuria* si vyvinuly účinné mechanismy adaptace na nepříznivé podmínky svých habitatů. Zájem vědců o zástupce rodu *Kocuria* je odůvodněn již zmíněnou adaptací na nepříznivé podmínky, jako jsou kontaminace těžkými kovy, radioaktivita a vysoké koncentrace soli (Gholami a kol., 2015).

Mezi další výhody bakterií rodu *Kocuria* sp. patří schopnost produkovat specifické sekundární metabolity, například barviva, biotenzidy, antibiotika a mnoho dalších (Samanta a kol., 2016; Nazina a kol., 2003).

Mechanismy adaptace mikroorganismů na extrémní podmínky

Mikroorganismy žijící v extrémním prostředí jsou často podrobeny působení několika stresových podmínek, například vysoušení, vysoké koncentrace solí, působení oxidačních činidel nebo ionizujícího záření. Pro přežití za daných podmínek jsou tyto mikroorganismy nuceny vyvíjet speciální mechanismy. Nejjednodušším způsobem zachování životaschopnosti mikroorganismu je udržet extrémní podmínky vně buňky. U mnoha organismů vyskytujících se v extrémně kyselém nebo alkalickém prostředí, rovněž u organismů žijících v prostředí kontaminovaném vysokými koncentracemi těžkých kovů byly popsány transmembránové pumpy pro přenos určitých iontů a následné udržení optimálních podmínek uvnitř buňky. V případě, že není možné udržet podmínky vně buňky, dochází k evolučnímu zesílení ochranných a opravných mechanismů. (Shukla a kol., 2007).

Z biologických molekul je nejvíce náchylná na vysoké teploty, ionizující záření, oxidativní stres a vysychání molekula DNA. Působením ionizujícího záření a UV dochází k poškození DNA buď přímým vlivem záření na molekulu DNA nebo nepřímo působením reaktivních forem kyslíku. Může docházet ke tvorbě modifikovaných nukleotidů nebo jedno či dvou řetězových zlomů, účinné mechanismy opravy podobných zlomů zapříčiňují vyšší adaptaci bakterií na působení ionizujícího záření. Největší vliv na rezistenci vůči působení ionizujícího záření má produkce účinných antioxidantů. Antioxidanty a enzymy katalasa a superoxid dismutasa chrání proteiny před oxidací reaktivními formami kyslíku, díky čemuž jsou potřebné enzymy při poškození DNA rychle dostupné a je umožněná rychlá oprava DNA. Vysychání vede k obdobným poškozením jako působení ionizujícího záření a aktivuje stejný mechanismus oprav poškozené DNA. Tvorba spor, produkce extracelulárních polysacharidů a intracelulární akumulace trehalosy a sukrosy jsou častými mechanismy obrany proti vysoušení a působení vysokých koncentrací solí (Shukla a kol., 2007).

Mikrobiální společenství v podzemních radonových pramenech

Mezi speciální a ve světě ojedinělé patří minerální radonové prameny. Pramen s názvem Franz-Josef-Quelle (FJQ) se nachází v lázeňském městě Bad Gastein, Rakousko. Celková mineralizace vody je okolo 350 mg/l, průměrná teplota 45,6 °C a pH 8. Voda vytéká z umělého vrtu s celkovým množstvím ^{222}Rn 296 kBq/m³. Doba zdržení vody dle metody ^{14}C je v rozmezí 3600 – 3800 let, v blízkosti vrtu dochází ke smíchání podzemní termální vody s 10 % studené podpovrchové vody (Weidler a kol., 2007).

Mikroorganismy, které pokrývají ponořené povrchy kamenů do vody, se vyskytují ve dvou formách. Starší biofilm z kolonizační fáze je pevně srostlý s povrchem kamene, kdežto druhá vrstva se jeví jako bělavý sliz a je méně připevněná na povrch (Weidler a kol., 2007).

Při analýze mikrobiálního společenství metodou sekvenování 16S rRNA genů a zpracování získaných dat postupy metagenomiky bylo celkem nalezeno 415 unikátních klonů, z nichž 283 bylo původem z domény Archaea a 132 z domény Bacteria. Na základě získaných sekvencí byly vyčleněny 4 skupiny Archaea a 14 skupin Bacteria, podobnost genomu v skupinách přesahovala 99 %. Většina bakterií a archea nalezených ve vzorcích vody z pramene FJQ nebyly kultivovatelné v laboratoři. Porovnáním sekvencí získaných z pramene se sekvencemi publikovanými v literatuře byla zjištěná podobnost genomu tří skupin s genomy bakterií nebo archea izolovaných z prostředí kontaminovaného uranem. Několik dalších skupin bylo nejvíce podobno bakteriím z prostředí kontaminovaného polutanty nebo

z bioremediačních zařízení. U některých skupin byla pozorována sada genů pro oxidaci dusičnanu na dusitany a anaerobní oxidaci amoniaku. Předpokládá se, že v pramenu probíhá celý cyklus koloběhu dusíku. V bakteriálním společenství pramene FJQ převládá kmen *Proteobacteria*, hlavně δ -*Proteobacteria* (*Nitrospira* sp., *Nitrospina* sp.) a β -*Proteobacteria*. V Tab. I jsou uvedeny nejvíce podobné kmeny některých získaných izolátů (Weidler a kol., 2007).

Tab. I. Některé kmeny nejvíce podobné získaným sekvencím. Podobnost sekvence minimálně 95 % (Weidler a kol., 2007)

Nejvíce podobná sekvence z databáze	Původ mikroorganismu	Podobnost (%)
Nekultivovatelný bakteriální kmen P3OB-49 (AF414580)	Sediment z uranového dolu	99,42
Nekultivovatelný bakteriální kmen G19 (AF407702)	Velká artéská pánev	98,23
Nekultivovatelný β -proteobacterium kmen ccs265 (AY133064)	Lokalita kontaminována tetrachlorethenem	98,58
Nekultivovatelný bakteriální kmen TSAC04 (AB186880)	Bioremediační zařízení	95,64
Nekultivovatelný bakteriální kmen AKAU3482 (DQ125521)	Půda kontaminována uranem	97,48
Nekultivovatelný bakteriální kmen 1-13 (AY548937)	Kal ze zařízení pro anaerobní oxidaci amoniaku	98,35
Nekultivovatelný crenarchaeote kmen Gitt-GR-39 (AJ535120)	Rezidua po zpracování uranu	98,54

Výskyt rodu *Kocuria* v životním prostředí

Druhy rodu *Kocuria* jsou původem ze širokého spektra různých habitatů. Bakterie rodu *Kocuria* jsou všudypřítomné v životním prostředí, včetně lidského hltnu a pokožky. Příkladem výskytu rodu *Kocuria* může být maso (*K. carniphila*, *K. varians*, a *K. kristinae*), mléko (*Kocuria* spp.), savčí pokožka (*K. kristinae*, *K. varians*), mořský sediment (*K. marina*) a povrchová voda (*K. rosea*, *K. varians*), studená (*K. himachalensis*), mírná (*K. rosea*) a pouštní (*K. aegyptia*) půda, kolonie cyanobakterií (*K. polaris*), a fyto sféra (*K. palustris*) (Stackebrandt a kol., 1995). Infekce způsobené primárně zástupci rodu *Kocuria* nejsou obvyklé. Při nalezání v klinickém materiálu většinou doprovázejí hematologická onemocnění,

maligní nádory nebo metabolické poruchy u již nakažených jedinců (Stackebrandt a kol., 1995).

Jednotlivé kmeny mohou být izolovány z rhizosféry rostlin, například *K. rhizophila*, kterou ve své práci izolovali Takarada a kol. (2008) z rhizosféry orobince úzkolistého. Při izolaci bakterií z vnitřních pletiv rostlin, takzvaných endofytů, Xia a kol. (2015) našli kmen *K. kristinae*, který se nacházel převážně v kořenech sladkého hrášku, rajčat, melounu a kapie. Někteří zástupci rodu *Kocuria* byli izolováni z prostředí kontaminovaného těžkými kovy. *K. arsenatis* byla poprvé izolována z kořenů naditce (*Prosopis laegivata*) v San Luis Potosi, Mexiko. V půdě byly naměřeny následující koncentrace těžkých kovů: As > 8420 mg/kg, Pb > 754 mg/kg, Cu > 1154 mg/kg a Zn > 1386 mg/kg (Román-Ponce a kol., 2016).

Dále byly bakterie z rodu *Kocuria* izolovány z mořských sedimentů a mořských korálů. Palermo a kol. (2016) ve své práci provedli sekvenaci a analýzu genomu kmene *Kocuria* sp. SM24M – 10 a našli genetické sekvence, které svědčí o adaptaci bakterie na mořské prostředí a velké množství nutrientů, které poskytují koráli.

Bakterie *Kocuria* sp. se vyskytují i v prostředí s vysokou úrovní ionizujícího záření. *K. rosea* kmen MG2 byl izolován z radioaktivního pramene Ab-e-Siah, ve městě Ramsar v Íránu. Působením UV záření (celková dávka 25 J/cm²) došlo ke snížení životaschopností o 13 %, v případě *E. coli* o 49 %, z čeho vyplývá, že *K. rosea* kmen MG2 má vysokou schopnost snášet vliv UV záření (Gholami a kol., 2015).

Významné metabolity rodu *Kocuria*

Biotenzidy

Biogenní povrchově aktivní látky jsou produkovány bakteriemi, archaea, kvasinkami a mikromycetami. Biotenzidy mají hydrofobní (nepolární) část molekuly a hydrofilní (polární) část. Mají sklon se mezi sebou spojovat, interagovat s povrchy o různé polaritě, adsorbovat se na rozhraní voda – vzduch nebo voda – olej, čímž způsobují smáčení hydrofobních povrchů. Vytvářejí struktury podobné lipidovým filmům nebo membránám a snižují povrchové napětí kapalin. V buňce jsou biotenzidy zodpovědné za transport hydrofobních látek dovnitř buňky, tvorbu biofilmů, adhezi buněk na různé povrchy, zvyšují přežívání mikroorganismů ve společenství a jsou faktorem patogenity. Bakterie schopné oxidovat uhlovodíky vždy produkují biotenzidy, protože vyžadují speciální nástroj pro transport živin do buňky (Nazina a kol., 2003).

Analytické metody FTIR, TLC a GC-MS analýza prokázaly, že biotenzidy, izolované z bakterií *Kocuria* mají povahu lipopeptidů. Výsledky testů ukázaly, že izolovaný biotenzid je schopen emulgovat jak alifatické, tak i aromatické hydrofobní látky (Sarařin Y. a kol., 2014). Kmen *K. erythromyxa* 32f vykazoval při růstu na komplexním médiu o vysokém obsahu n-alkanů dobrou schopnost emulgovat roztok, což svědčí o tvorbě biotenzidů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při kultivaci na glukose a dodekanu, přičemž při kultivaci na C16 – C24 uhlovodících byl účinek až třikrát nižší (Nazina a kol., 2003). Vysokou emulgační aktivitu vykazoval také kmen *K. marina* BS-15 (Sarařin a kol., 2014).

Biotenzidy hrají důležitou roli při biodegradaci pesticidů. Díky emulgačním vlastnostem zvyšují biodostupnost nepolárních polutantů a tím urychlují jejich odbourávání. Kmen *K. turfarensis* J vykazoval vysokou schopnost emulgovat neonikotinoidní insekticid imidokloprid při širokém rozmezí pH od 2 do 11. Schopnost emulgovat organofosfátový insekticid monokrotofos byla nižší ve srovnání s imidoklopridem, emulgační vlastnosti jsou totiž závislé i na chemické struktuře pesticidu. Biotenzidy z *K. turfarensis* byly stabilní při teplotách v rozmezí 30 – 120 °C, přičemž nejvyšší aktivita byla dosažena při 60 °C. Vliv koncentrace NaCl na aktivitu biotenzidů byl poměrně malý v koncentračním rozmezí 5 – 15 % (Dubey a kol., 2012).

Siderofory

Železo působí jako kofaktor několika enzymů zodpovědných za přenos elektronů, zúčastňuje se biosyntézy DNA a ATP. V přírodě se za aerobních podmínek železo vyskytuje převážně v oxidačním stavu +3. Při neutrálním nebo zásaditém pH tvoří ionty Fe^{+3} nerozpustné polymerní oxo – hydroxo komplexy, které nejsou vhodným zdrojem živin pro mikroorganismy ani rostliny. Řešením tohoto problému je u bakterií syntéza a vylučování vysoce afinitních chelotonů nazývaných siderofory, které váží železo, z buněk do extracelulárního prostředí. Vazba a odstranění železa z prostředí může mít mimo jiné i antibiotický účinek (Challis, 2005). Siderofory jsou molekuly s malou molekulovou hmotností v intervalu 400 – 1000 kDa s vysokou afinitou k železu. Siderofory jsou rozpustné ve vodě a ve většině případů jsou vylučovány z buňky do okolního prostředí. Na základě toho, která část molekuly je donorem kyslíkového ligandu pro chelataci železa, lze siderofory rozdělit do tří skupin (Saha a kol., 2012):

- catecholaty nebo fenolaty, například enterobactin (*Streptomyces*), vibriobactin (*Vibrio cholera*) a pyochelin (*Pseudomonas aeruginosa*), převládají v prostředí s nízkým nebo neutrálním pH
- hydroxymaty nebo carboxyly, například alcaligin (*Alcaligenes denitrificans*), staphyloferrin (*Staphylococcus* sp.), převládají v prostředí s nízkým pH
- smíšený typ, například mycobactin (*Mycobacterium tuberculosis*) a petrobactin (*Bacillus anthracis*)

Produkce sideroforů byla sledována u některých kmenů *Kocuria* pomocí chrom azurol S (CAS) testu. Ve své práci Haidar a kol (2018) zkoumali endofyty izolované z rostliny juty a izolovali kmen *Kocuria* sp. MBL_B19, který produkoval siderofory. Goswami a kol. (2014) popisuje tvorbu sideroforů u *Kocuria turfanensis* 2M4, kde aktivita dosáhla 53 % ve srovnání s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Dle Retamal-Morales a kol. (2018), *K. rosea* produkuje siderofory, které váží železo s účinností 100 % ve srovnání s EDTA a jsou také schopny vázat arzen s účinností 80 %.

Pigmenty

Využití bakteriálních pigmentů místo syntetických pigmentů je v současné době žádané z několika důvodů. Jedním z nich je vyšší možnost biodegradace a lepší slučitelnost přírodních pigmentů s životním prostředím ve srovnání se syntetickými barvivy, která jsou často pro člověka a životní prostředí toxická. Průmyslově se v současné době vyrábějí některé bakteriální pigmenty pro aplikaci v potravinářství, farmacii, kosmetice a textilním průmyslu (Venil a kol., 2013).

Kolonie *Kocuria* sp. mají na agaru zbarvení od béžového, přes žluté až po červené. Několik studií se zabývalo izolací a identifikací bakteriálních pigmentů. Vora a kol. (2015) ve své práci zkoumali oranžové a žluté pigmenty produkované kmeny *Kocuria* sp. KM243757 a *Kocuria* sp. JO1 KM216829, které byly izolovány ze vzorku půdy z krajiny Kharaghoda, Gujarat. Na základě retenčních hodnot a absorpčního maxima byly oranžové a žluté pigmenty charakterizovány jako karotenoidy.

Spektrum extraktu karotenoidů z kmene *K. marina* DAGII bylo porovnáno se spektrem karotenoidů z indického manga a papáji. Hlavní složkou karotenoidních pigmentů z *K. marina* kmen DAGII je β -kryptoxantin (Samanta a kol., 2016).

V posledních letech roste poptávka i po přírodních antioxidantech. Karotenoidní látky mají dobré antioxidační vlastnosti a jsou rozšířené v přírodě. Antioxidanty mohou zastavit radikálové reakce, které by vedly k poškození buněk. Reaktivní formy kyslíku vznikají v organismech při reakcích s využitím kyslíku. Tyto volné radikály způsobují peroxidaci lipidů, poškození DNA a denaturaci bílkovin. Antioxidační aktivita β -kryptoxantinu izolovaného z kmene *K. marina* DAGII byla zkoumána v práci Samanta a kol. (2016). β -kryptoxantin vykazoval lepší výsledky testu s použitím 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylu (DPPH) a lepší schopnost inhibovat autooxidaci kyseliny linoleové než β -karoten. Výsledky svědčí o možnosti použití β -kryptoxantinu jako potenciálního nutraceutika, doplňku stravy v potravinářském průmyslu a v mnoha dalších odvětví průmyslu (Samanta a kol, 2016).

Extracelulární polysacharidy

Většina bakteriálních kmenů je schopna produkovat extracelulární polysacharidy (EPS). EPS vykazují potenciální biologickou aktivitu, například imunomodulace, protizánětlivý účinek, antivirotický účinek, působí proti rakovině a mají antioxidační aktivitu (Kumar a Sujitha, 2014). Kumar a Sujitha (2014) izolovali a charakterizovali EPS produkované kmenem *K. rosea* BS - 1. Výsledek analýzy svědčí o tom, že izolovaná látka pojmenovaná kocuran je heteropolysacharid kyselé povahy, skládá se z 91 % monosacharidů, hlavně glukopyranosy, mannopyranosy, galaktopyranosy a glukuronové kyseliny, a z 9 % močoviny. Maximální produkce (731 mg/l) kocuranu bylo dosaženo po 48 hodinách kultivace po dosažení stacionární fáze, rychlost produkce byla konstantní po dobu dalších 48 hodin. Kocuran vykazoval lepší antioxidační aktivitu než kyselina askorbová. *In vitro* testy ukazují na imunosupresivní vlastnosti izolovaného EPS (Kumar a Sujitha, 2014).

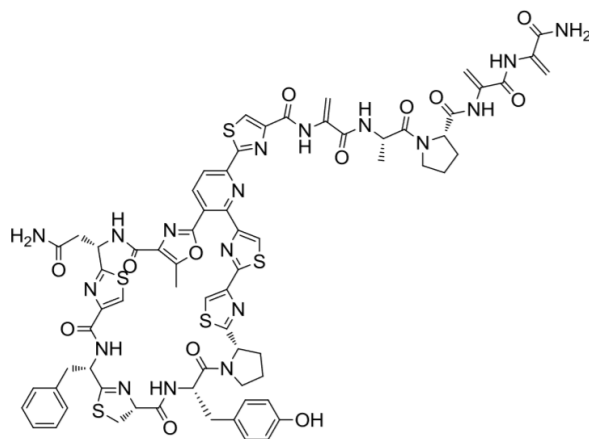
Antibiotika

Antibiotika jsou důležité látky při léčbě mikrobiálních infekcí lidí a hospodářských zvířat. Intenzivní používání antibiotik vede k zvýšení výskytu kmenů rezistentních k jednotlivým druhům látek. Hledání a vývoj nových antibiotických látek je podstatné pro udržitelnou léčbu infekcí.

Některé mikroorganismy žijící na povrchu mořských řas produkují zajímavé metabolity s různými molekulárními strukturami, některé i s antimikrobiálními účinky, jejichž cílem je zabránit sekundárnímu osídlení povrchu. Kmen *K. marina* CMG S2 byl izolován z povrchu hnědých mořských řas v okolí pláže Sonmiani, Karáčí, Pákistán. Z biomasy *K. marina* CMG

S2 byly izolovány sekundární metabolity, mezi kterými byla jedna UV – aktivní látka. Po provedení NMR analýzy byla navržena struktura: 4-[(Z)-2- fenylethenyl]benzoová kyselina, později byl látce přiřazen název kocumarin. Antimikrobiální aktivita kocumarinu byla zkoumána na několika patogenních mikroorganismech včetně bakterií a plísní. Účinek sledované látky byl velice rychlý a způsoboval především změny buněčné stěny. Byla dokonce sledována vysoká aktivita vůči problematickému methicilin rezistentnímu kmenu *Staphylococcus aureus* MRSA (Uzair a kol., 2017).

Další látka s antibiotickou aktivitou byla izolována z kmenu *K. marina* F-276,310. Místem výskytu daného kmene jsou mořské houbovice. Bioaktivní látka má povahu thiazolilového peptidu, kterému byl přiřazen název kocurin (Obr.). Nejvyšší produkce kocurinu byla dosažena ve stacionární fázi růstu, po 24 hodinách od přechodu do stacionární fáze růstu (Palomo a kol., 2013). Kocurin má podobný účinek a mechanismus působení jako jiné thiozylové peptidy, účinně blokuje proteosyntézu u gram–pozitivních bakteriích, zatímco vůči gram–negativním bakteriím nevykazuje aktivitu. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro *Staphylococcus aureus* MRSA se pohybovala v rozmezí 0,25 – 0,5 µg/ml (Palomo a kol., 2013).



Obr. 1 Chemická struktura kocurinu (Palomo a kol., 2013)

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu GAČR 18-00036S.

Literatura

Dubey K. V., Charde P. N., Meshram S.U., Shendre L.P., Dubey V.S., Juwarkar A.A. (2012) Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanesis* strain-J at extreme environmental conditions. Bioresource Technology, 126, str. 368-374.

Gholami M., Etemadifar Z., Bouzari M. (2012) Isolation a new strain *Kocuria rosea* capable of tolerating extreme conditions. *Journal of Environmental Radioactivity*, 144, str. 113-119.

Challis G. L. (2005) A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*, 6, str. 601-611.

Nazina T. N., Sokolova D. Sh., Grigor'yan A. A., Xue Y-F., Belyaev S.S., Ivanov M. V. (2003) Production of oil-releasing compounds by microorganisms from the daqing oil field, China. *Microbiology*, 72 (2), str. 173–178.

Palermo B. R. Z., Castro D. B. A., Pereira L. B., Cauz A. C. G., Magalhães B. L., Carlos C., Costa F, Scagion G. P., Higa J. S., Almeida L. D., Neves M., Cordeiro M. A., Prado P., Silva T., Balsalobre T. W., Paulino L. C., Vicentini R., Ferraz L., Ottobonia L. (2016) Draft genome sequence of *Kocuria* sp. SM24M-10 isolated from coral mucus. *Genome data*, 7, str. 121-123.

Román-Ponce B., Wang D., Soledad Vásquez-Murrieta M., Feng Chen W., Estrada-de Los Santos P., Hua Sui X., Tao Wang E. (2016) *Kocuria arsenatis* sp. nov., an arsenic-resistant endophytic actinobacterium associated with *Prosopis laegivata* grown on high-arsenic-polluted mine tailing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66 (2), str. 1027-1033.

Saha R., Saha N., Donofrio R. S., Bestervelt L. L. (2012) Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53 (4), str. 303-317.

Samanta A. K., Chaudhuri S., Duttasamanta D. (2016) Antioxidant efficacy of carotenoid extract from bacterial strain *Kocuria marina* DAGII. *Materials today: Proceedings*, 3 (10), str. 3427-3433.

Sarfin Y., Donio M. B., Velmurugan S., Michaelbabu M., Citarasu T. (2014) *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21 (6), 511-519.

Shukla M., Chaturvedi R., Tamhane D., Vyas P., Archana G., Apte S., Bandekar J., Desai A. (2007) Multiple-stress tolerance of ionizing radiation-resistant bacterial isolates obtained from various habitats: correlation between stresses. *Current Microbiology*, 54, str. 142–148.

Stackebrandt, Koch, Gvozdiak, Schumann (1995) *Kocuria* (Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria), Online © 2015 Bergey's Manual Trust, str. 1-15.

Takarada H., Sekine M., Kosugi H., Matsuo Y., Fujisawa T., Omata S., Kishi E., Shimizu A., Tsukatani N., Tanikawa S., Fujita N., Harayama S. (2008) Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *Journal of Bacteriology*, 190 (12), str. 4139-4146.

Venil C. K., Zakaria Z. A., Ahmada W. A. (2013) Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48, str. 1065–1079.

Vora J. U., Jain N. K., Modi H. A. (2015) Identification and characterization of pigment producing strain *Kocuria* KM243757 & JO1 KM216829 from Kharaghoda soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4 (9), str. 850-859.

Xia Y., DeBolt S., Dreyer J., Scott D., Williams M. (2015) Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontier in Plant Science*, 6, článek 490.

Vliv postřiků na fyziologický stav révy

A. Vasyliuk, M. Vrublevskaya, I. Kolouchová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Réva vinná patří mezi nejdéle pěstované kulturní plodiny a tedy i plodiny, které jsou nejdéle systematicky zemědělsky ošetřovány. V současné době je několik možných přístupů ve vedení a zejména ošetřování révy různými typy postřiků. Nejpoužívanější přístup je konvenční, s využitím syntetických hnojiv a postřiků proti škůdcům. Ale stále více se rozvíjí ekologický přístup, tedy s využitím organického odpadu ke hnojení a ochranných postřiků z rostlin.

Úvod

Polyfenolové sloučeniny hrají klíčovou roli v organoleptických vlastnostech vín. Vinařská technologie ovlivňuje obsah polyfenolů v hroznech a víně, a tím nepřímo určuje jejich kvalitu, barvu, chuťové a čichové vlastnosti a potenciál stárnutí vína. Kromě toho byl zjištěn pozitivní dopad umírněné konzumace vína na zdraví. Obsah polyfenolů ve víně je závislý na chemickém složení hroznů révy vinné, které je zase ovlivněno mnoha faktory, včetně podmínek prostředí, vinařských postupů nebo způsobů růstu révy (Downey a kol., 2006) a také různých technik aplikovaných ve sklepním hospodářství a následných technologických úpravách, které probíhají během procesu výroby vína (Sacchi a kol., 2005). Mezi možné způsoby ovlivnění složení hroznů a vína patří hnojení půdy (Bell a Henschke, 2005). Předchozí studie ukázaly, že vysoká dodávka dusíku může vést k větší velikosti bobulí nebo ke změnám v metabolismu révy, což následně způsobuje snížení obsahu polyfenolových sloučenin (Hilbert a kol., 2003).

Celkový obsah polyfenolových sloučenin pro jednotlivé odrůdy se může snížit z 5 000 mg/kg sušiny (nezralé hrozny) na 104 mg/kg sušiny (období sklizně). Byl také potvrzen rozdílný obsah polyfenolových sloučenin v různých částech hroznů (semena, slupka a dužina), mezi jednotlivými odrůdami révy vinné a také mezi modrými a bílými odrůdami (Jančářová a kol., 2013).

Vznik a produkce polyfenolových látek révou úzce souvisí s endofytickou populací révy vinné (Pancher a kol., 2012). Bakteriální endofyty byly izolovány z mnoha různých rostlin. Byly nalezeny v řadě hostitelských rostlin, včetně evropských listnatých a jehličnatých stromů (Izumi a kol., 2008), topolů (Ulrich a kol., 2008), oliv (Prieto a Mercado-Blanco, 2008) a v rýži (Sun a kol., 2008). Ale je relativně málo poznatků o obsahu endofytů v révě vinné. Dosavadní

studie se zabývaly výlučně bakteriálními endofyty, které byly kultivovány v laboratoři. Vývoj molekulárních technik také dovolil zkoumání nekultivovatelných bakteriálních endofytů, což dovoluje vytvoření profilu celé bakteriální populace.

Vliv organického a biodynamického zemědělství na kvalitu produktu

Mechanismus účinku biodynamických přípravků není stále zcela jasný. Protože jsou přípravky aplikovány ve velmi malém množství, přímé účinky na výživu jsou nepravděpodobné. Jedním z možných způsobů působení je účinek na zastoupení epifitních a endofitních bakterií, protože bakterie jsou schopné reagovat na extrémně nízkou koncentraci signálních molekul v jejich prostředí a biodynamické přípravky mohou takové molekuly obsahovat (Reeve a kol., 2010). Podle Giannattasio a kol. (2013) jsou koncentrace účinných látek i v mikromolárních koncentracích, ve kterých jsou biodynamické přípravky aplikovány, schopny vyvolávat metabolickou aktivitu půdních bakterií a také mají potenciál podporovat mikrobiální proliferaci a tedy větší rhizoférickou aktivitu (Spaccini a kol., 2012). Botelho a kol. (2015) zjistil, že biodynamicky a organicky pěstované hrozny ve srovnání s konvenčně pěstovanými hrozny dosahovaly lepších kvalitativních znaků a vína z nich vyrobená obsahovala např. nižší výskyt a obsah kyseliny octové. Všechny výsledky vedou k závěru, že je třeba detailnějších studií o účinku specifických preparátů používaných v biodynamickém zemědělství (Meißner a kol., 2019). V několika studiích byly porovnány různé aspekty kvality hroznů a vín vyrobených organickým, biodynamickým a konvenčním přístupem. Tintunen a Lehtonen (2001), používali kombinovanou analýzu ultrafialových viditelných spekter a měření fenolických sloučenin neodlišili ekologicky vyráběná vína od konvenčních; i když v organicky pěstované révě byl zjištěn vyšší obsah resveratrolu. Tassoni a kol. (2013a) nezjistili žádné rozdíly v obsahu biogenních aminů, antokyanů, polyfenolů nebo antioxidační aktivitě mezi víny z organických, biodynamických a konvenčních produkcí. Naopak Kokornaczyk a kol. (2014) odlišil organická vína od biodynamických, a to pomocí metody DEM (droplet evaporation method - metoda odpařování kapiček), na základě chemického složení červených vín, a obsahu polyfenolových látek. Laghi a kol. (2014) srovnával organická a biodynamická vína pomocí metabolického přístupu a našel rozdíly v obsahu některých aminokyselin, alkoholů a polyfenolů. Granato a kol. (2015) byl schopen rozlišit organické a biodynamické vzorky hroznové šťávy od konvenčních na bázi chuťového profilu, antioxidační aktivity, chemického složení; nebyl však schopen rozlišit mošt z organických hroznů od biodynamických.

Co se týká srovnání organických a konvenčních vín, lze nalézt různé informace v literatuře, které se zaměřují především na různé ekonomické nebo kvalitativní aspekty. Některé nejčastěji uváděné rozdíly ve složení mezi organickými a konvenčními víny jsou shrnuty v Tab. I. Většina zveřejněných údajů potvrdila, že organické hrozny a vína měly vyšší antioxidační aktivitu než jejich konvenční protějšky, a tento účinek pozitivně souvisí s celkovým obsahem polyfenolů (Bunea a kol., 2012, Machado a kol., 2011, Mulero a kol., 2009,).

Tab. I Rozdíly mezi organickými a konvenčními vinami (výsledky uvedeny pro organická vína) (Tobolková a kol., 2014)

Zvyšuje se	Antioxidační aktivita
	Koncentrace enzymu polyfenoloxidázy
	Obsah biogenních aminů (putrescin)
	Obsah fenolů, polyfenolů a resveratrolu v hroznech
Bez rozdílů	Obsah <i>trans</i> -resveratrolu a p-kumarové kyseliny
	Obsah biogenních aminů
Snižuje se	Obsah vanilové kyseliny
	Celkový obsah antokyanů v hroznech

Vliv postřiků na obsah polyfenolů

Složení hroznů závisí na sérii interakcí mezi genetickými charakteristikami, podmínkami prostředí a postupy pěstování (Bourn a Prescott, 2002). Během konvenčního zemědělství se používají hnojiva obsahující draslík a anorganický dusík. Hnojiva se snadno rozpouštějí v půdní vodě, což vede k vysokým obsahům dusíku a draslíku v rostlinách (Worthington, 2001). To by mohlo vysvětlit vyšší obsah dusíku v konvenčních, než v organických extraktech (Tab. II).

Tab. II Chemická charakteristika konvenčních a organických extraktů hroznové slupky (Corrales a kol., 2010)

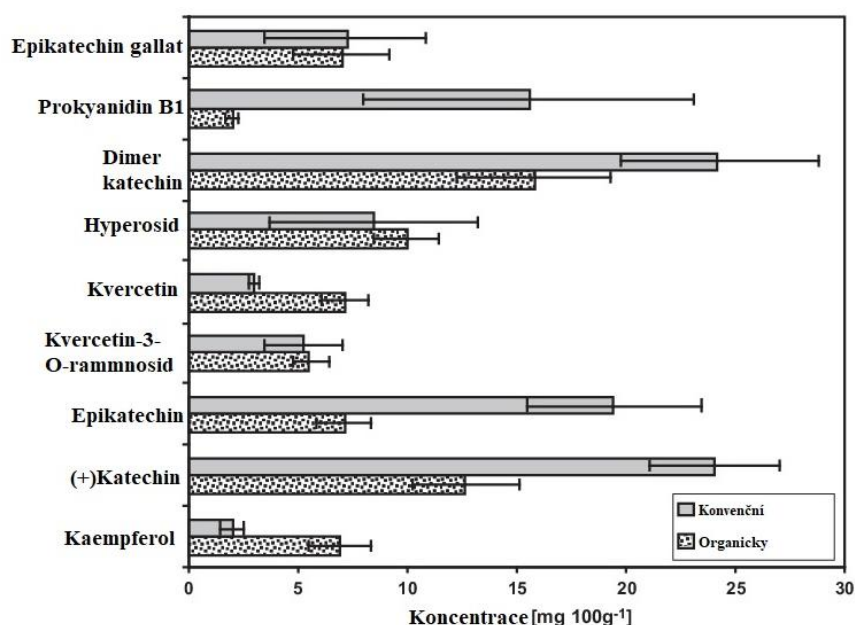
Parametr	Konvenční hrozny	Organické hrozny
Dusík (g kg ⁻¹ suché váhy slupky)	1.11±0.11	1.06±0.02
Draslík (g kg ⁻¹ suché váhy slupky)	2.26±0.48	1.80±0.03

°Brix	16.6±0.82	16.83±0.63
Popel (%)	5.78±0.11	4.80±0.26

Tyto výsledky jsou shodné se studií (Garde-Cerdan a kol., 2009), kde byl zaznamenán vyšší obsah amoniového, aminového a asimilovaného dusíku v konvenčních modrých hroznech odrůdy Monastrell ve srovnání s organickými hrozný. Kromě toho je draslík zapojen do mnoha rostlinných fyziologických reakcí, včetně osmoregulace, syntézy proteinů a aktivací enzymů, což může vést k jeho vysokému obsahu v popelu v konvenčních extraktech (Corrales a kol., 2010).

Polyfenolové sloučeniny hrají klíčovou roli v mechanismech přirozené obrany rostlin proti býložravcům, biotickému stresu a UV záření (Harborne a Williams, 2000).

Byly provedeny experimentální studie (Corrales a kol., 2010) na složení jednotlivých sekundárních metabolitů v extraktech organicky a konvenčně pěstovaných hroznech odrůdy Riesling. Úrovně kvercetinů a kaempferolů byly v organických vzorcích statisticky významně vyšší. Naproti tomu, obsah flavonoidů, katechinů, epikatechinů a prokyanidinu B1 byl vyšší v konvenčním hrozně (Obr.1). Podle toho byla antioxidační kapacita v konvenčních vzorcích ($26,8 \pm 0,7 \text{ mmol TE g}^{-1}_{\text{extrakt}}$) vyšší než v organických ($15,93 \pm 3,46 \text{ mmol TE g}^{-1}_{\text{extrakt}}$). Toto potvrzuje výsledky Dani a kol. (2007), které prokázaly vyšší antioxidační kapacitu konvenčně pěstovaného hrozně odrůdy Nibakteriologický agara. Nicméně, při porovnávání obsahu flavonoidů v organických a konvenčních hroznech, nejsou studie konzistentní. Někteří autoři naměřili vyšší obsah flavonoidů u konvenčních hroznů (Vian a kol., 2006) zatímco jiní v organických (Malusà a kol., 2004).



Obr. 2 Srovnání obsahu flavonolů v extraktech slupek organických a konvenčních hroznů (Riesling *Vitis vinifera* L.) a) ($P < 0.05$) významné rozdíly, b) nevýznamné rozdíly ($P > 0.05$) (Corrales a kol., 2010)

Výsledky (Corrales a kol., 2010) ukázaly, že antioxidační kapacita a obsah polyfenolů konvenčních a organických extraktů přímo nekorelovala. Antioxidační kapacita extraktů slupek konvenčně pěstovaných hroznů byla významně vyšší než u organických vzorků, ale na rozdíl od celkového obsahu polyfenolů, který byl v konvenčních extraktech ($31,27 \pm 4,71$ GAE g⁻¹) nižší, než u organických ($48,14 \pm 0,04$ GAE g⁻¹). Další sloučeniny, a konkrétně specifické flavonoidy nebo dokonce i rezidua pesticidů, by mohly být zodpovědné za vyšší antioxidační kapacitu konvenčních extraktů. Podobný trend byl popsán ve studiích (Dani a kol., 2007) konvenčně a organicky pěstované hroznové šťávy z odrůdy Nibakteriologický agary. Studie od Oliva a kol. (2009) naznačují, že některé zbytky pesticidů v potravinářských výrobcích mohou vykazovat antioxidační účinek. Prokázali, že přítomnost famoxadonu, kresoximmetylu a kvinoxifyfenu zvyšuje antioxidační kapacitu hroznů. Nicméně citlivost antioxidační kapacity k pesticidům stále ještě není úplně prostudována a je potřeba dalšího výzkumu (Corrales a kol., 2010).

Flavonoidy určují úroveň náchylnosti nebo tolerance vůči houbovým infekcím a škůdcům v rostlinách (Usenik a kol., 2004). Jejich přítomnost v extraktech z hroznových slupek může předznamenat jejich antibakteriální účinky. Hrozny obsahují nejen vysokou koncentraci

flavonoidů ve slupkách a peckách, ale také cukry, živiny a vodu v dužině, což je příčinou jejich vysoké náchylnosti ke kontaminaci mikromycetami, většinou houbou *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp. a *Cladosporium* spp. a méně často také *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* a *Ulocladium* spp. (Tournas a Katsoudas, 2005). V konvenčním zemědělství se v boji proti tomuto mikrobiálnímu napadení obvykle používají pesticidy, které mohou zůstat ve vedlejších produktech z hroznů, jako výchozí sloučeniny nebo jako jejich degradační produkty. Antibakteriální aktivita pesticidů a jejich degradačních produktů se liší mezi různými druhy pesticidů (Corrales a kol., 2010, Virag a kol., 2007).

Vliv postřiků na výsledný produkt

Většina z vypěstovaných hroznů (66 % světové produkce) se dále používá k výrobě vína (Soleas a kol., 1997). Víno a jeho vedlejší produkty, rmut a mošt, mohou být následně destilovány za účelem získání alkoholu nebo alkoholických nápojů (brandy, grappa a koňak). Hrozny mohou být konzumovány jako čerstvé, jako hrozinky a také jako šťáva. Pro obdržení kvalitních produktů, musí být hrozny chráněny během zrání před napadením škůdci. Hlavními škůdci révy vinné jsou obaleč mramorovaný (*Lobesia botrana*), plíseň revová (*Plasmopora viticola*), padlí révové (*Uncinula necator*) a plíseň šedá (*Botrytis cinerea*). Pro kontrolu těchto škůdců, se používají insekticidy a fungicidy a proto je možné během sklizně najít jejich rezidua na hroznech, které se pak mohou objevit ve zpracovaných produktech v závislosti na technologických procesech (Cabras a Angioni, 2000).

Většina studií o reziduích pesticidů se zabývá přeměnou hroznů na víno, zatímco jen málo studií se věnuje ovocné šťávě, hrozinkám nebo destilátům. První studie o víně a použití fungicidů byla provedena v roce 1975 (Lemperle, 1975) a byla poté opakována v několika jiných studiích (Cabras a kol., 1987, Zironi, 1991). Tyto články se zabývají především fungicidy EBCD, acylalaniny, ftalimidy, dichlofluanid, cymoxanil, bezimidazoly, thiofanáty, dikarboximidy. Výsledky ukázaly jejich osud během vinifikace a vliv každého technologického kroku na množství reziduů (Cabras a Angioni, 2000).

Dlouhodobé a opakované použití těchto fungicidů způsobilo resistenci, čímž snížilo jejich účinnost. Proto došlo k vývoji a používání nových molekul, které působí různými mechanismy. V devadesátých letech bylo nabízeno několik nových fungicidů patřících do nových chemických tříd (strobiluriny, anilinopyrimidiny, dinitroaniliny, fenylpyroly), které vykazovaly dobrou aktivitu vůči houbovému napadení (Cabras a Angioni, 2000).

V produkčním cyklu vína jsou dva fermentační procesy: alkoholová fermentace a malolaktická fermentace, i když druhá zmíněná není vždy nutná. Alkoholová fermentace probíhá díky činnosti kvasinek, malolaktická pomocí mléčných bakterií. Činnost těchto mikroorganismů může být ovlivněna přítomností reziduí pesticidů. První fungicidy, které se používaly k zabránění namnožení vláknitých hub (folpet a kaptan) ukázaly pozoruhodnou antiseptickou aktivitu na kvasinky (Cabras a kol., 1987). Další dva fungicidy, captafol a dichlofluanid, které byly později zavedeny na trh vykazovaly podobné chování. Inhibice fermentace bylo také pozorováno v přítomnosti fungicidů thiofanát-methyl a fenarimol (Zironi, 1991).

Dnes je možné obchodovat s novými pesticidy pouze po průkazu jejich neúčinnosti na fermentativní mikroflóru. V některých případech přítomnost pesticidů může stimulovat kvasinky, zejména *Kloeckera apiculata*, k produkci vyššího množství alkoholu (Cabras a kol., 1999). Pokud mohou pesticidy ovlivnit aktivitu kvasinek, mohou kvasinky také snížit obsah reziduí pesticidů. Kvasinky ukázaly schopnost degradovat některé pesticidy patřící ke třídě pyrethroidů (Fatichenti a kol., 1983, Fatichenti a kol., 1984). Kvasinky, které produkují H_2S a SO_2 mohou rozkládat některé insekticidy (chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, parathion, kvinalphos), které patří do třídy thiofosfátů. Navíc, kvasinky adsorbují některé pesticidy a přispívají tím k jejich odstranění z vína na konci kvašení (Cabras a Angioni, 2000).

Účinek pesticidů na malolaktickou fermentaci je zkoumán méně. Bylo zjištěno, že mankozeb a methylmetiram inhibují aktivitu mléčných bakterií. S výjimkou tohoto případu, ani původní pesticidy, ani nové, nevykazovaly negativní účinky na malolaktickou fermentaci. Mléčné bakterie nerozkládají hlavní fungicidy, které se používají ve vinařství (Cabras a Angioni, 2000).

Alkoholová fermentace může být prováděna buď v přítomnosti slupek (technologie výroby červeného vína) nebo bez slupek (technologie výroby bílého vína). V prvním případě bude víno vyrobeno se všemi rezidui z hroznů; v druhém případě procesu výroby bílého vína bude mošt obsahovat pouze zbytky, které přešly do moštu. Po fermentaci jsou hladiny reziduí pesticidů ve víně vždy nižší než v hroznech, s výjimkou těch pesticidů, které neměly přednostní rozdělení mezi kapalnou a pevnou fází (azoxystrobin, dimethoát a pyrimethanil), tyto jsou přítomné ve víně ve stejných koncentracích jako v hroznech. V některých případech (mepanipyrim, fluazinam a chlorpyrifos) nebyla detekována žádná rezidua na konci fermentace (Cabras a Angioni, 2000).

Vliv postřiků na endofyty v hroznech

Mikrobiální komunity v rostlinách jsou ovlivněny četnými environmentálními a antropogenními faktory, včetně ošetření půdy a výskytem škůdců (Campisano a kol., 2014). Mikroorganismy spojené s révou vinnou, zejména bakterie, byly zkoumány v nedávných studiích (Bokulich a kol., 2014, West a kol., 2010), které zdůraznily některé základní aspekty ve variabilitě mikroorganismů i vzhledem k části rostliny.

Rostliny révy vinné mohou být infikovány a kolonizovány několika typy patogenů, které způsobují významné ztráty ve vinařském průmyslu. Ve vinicích je v současné době používáno množství pesticidů, ale dlouhodobé používání chemických produktů během posledních několika desetiletí vedlo k akumulaci jejich reziduí a ke kontaminaci životního prostředí, které mají v konečném důsledku vliv na lidské zdraví (Maheshwari, 2017).

Campisano a kol. (2014) zkoumali dopad konvenčních a ekologických přístupů pěstování révy na složení endofytických komunit, což odhalilo významné rozdíly ve struktuře bakteriálních populací. Ve skutečnosti rody *Mesorhizobium* a *Staphylococcus* byly více zastoupené v rostlinách z vinic řízených ekologickým zemědělstvím, zatímco rod *Ralstonia* byl více zastoupen v konvenčních hroznech. Proto se dá předpokládat, že jsou populace bakteriálních endofytů ovlivněny antropogenními faktory, jako je způsob pěstování (Campisano a kol., 2014).

Alternativní přístup k omezení používání pesticidů ve vinicích zahrnuje použití některých bakterií jako biokontrolních agents. Některé bakterie mohou přispívat k růstu rostlin snížením účinků fytopatogenů přímým nebo nepřímým způsobem. Například mohou bakterie soutěžit s patogeny o živiny, syntetizovat allelochemikálie, jako jsou biocidy, antibiotika nebo lytické enzymy nebo zasahovat do patogenního „quorum sensing“. Navíc interakce mezi některými prospěšnými bakteriemi a hostitelskou rostlinou může zvýšit odolnost hostitele vůči určitým patogenním bakteriím, houbám a virům pomocí mechanismu známého jako indukovaná systémová rezistence (ISR) (Maheshwari, 2017).

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu TAČR TH04030109

Literatura

Bell, S.-J., Henschke, P.A. (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian journal of grape and wine research* 11(3), 242-295.

- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A.** (2014) Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the national academy of sciences* 111(1), E139-E148.
- Botelho, R., Roberti, R., Tessarin, P., Garcia-Mina, J., Rombolà, A.** (2015) Physiological responses of grapevines to biodynamic management. *Renewable agriculture and food systems* -1, 1-12.
- Bourn, D., Prescott, J.** (2002) A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical reviews in food science and nutrition* 42(1), 1-34.
- Bunea, C.-I., Pop, N., Babes, A., Matea, C.-T., Francisc, D., Bunea, A.** (2012) Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry central journal* 6, 66.
- Cabras, P., Meloni, M., M Pirisi, F.** (1987) Pesticide fate from vine to wine. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 99, 83-117.
- Cabras, P., Angioni, A.** (2000) Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 967-973.
- Corrales, M., Fernandez, A., Vizoso Pinto, M.G., Butz, P., Franz, C.M., Schuele, E., Tauscher, B.** (2010) Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. *Food and chemical toxicology* 48(12), 3471-3476.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., Henriques, J.A.** (2007) Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food and chemical toxicology* 45(12), 2574-2580.
- Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., Krstic, M.P.** (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American journal of enology and viticulture* 57(3), 257-268.
- Garde-Cerdan, T., Lorenzo, C., Lara, J.F., Pardo, F., Ancin-Azpilicueta, C., Salinas, M.R.** (2009) Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(6), 2410-2419.
- Giannattasio, M., Vendramin, E., Fornasier, F., Alberghini, S., Zanardo, M., Stellan, F., Concheri, G., Stevanato, P., Ertani, A., Nardi, S.** (2013) Microbiological features and bioactivity of a fermented manure product (preparation 500) used in biodynamic agriculture. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(5), 644-651.
- Granato, D., Margraf, T., Brotzakis, I., Capuano, E., van Ruth, S.M.** (2015) Characterization of conventional, biodynamic, and organic purple grape juices by chemical markers, antioxidant capacity, and instrumental taste profile. *Journal of food science* 80(1), C55-C65.
- Harborne, J.B., Williams, C.A.** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6), 481-504.
- Hilbert, G., Soyer, J.-P., Molot, C., Giraudon, J., Milin, S., P Gaudillere, J.** (2003) Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis -Geilweilerhof* 42.
- Izumi, H., Anderson, I.C., Killham, K., Moore, E.R.** (2008) Diversity of predominant endophytic bacteria in European deciduous and coniferous trees. *Canadian journal of microbiology* 54(3), 173-179.

- Jančářová, I., Jančář, L., Náplavová, A., Kubáň, V.** (2013) Changes of organic acids and phenolic compounds contents in grapevine berries during their ripening, *Central European journal of chemistry*, 1575.
- Kokornaczyk, M.O., Parpinello, G.P., Versari, A., Rombolà, A.D., Betti, L.** (2014) Qualitative discrimination between organic and biodynamic *Sangiovese* red wines for authenticity. *Analytical methods* 6(18), 7484-7488.
- Laghi, L., Versari, A., Marcolini, E., Parpinello, G.P.** (2014) Metabonomic investigation by ¹H-NMR to discriminate between red wines from organic and biodynamic grapes. *Food and nutrition sciences* 2014.
- Lemperle, E.** (1975) Residus de pesticides dans les mouts et les vins. 4 *Symp d'Oenol*, 453 pp.
- Machado, M.M., Franciele Feyh dos Santos Montagner, G., Boligon, A., Linde Athayde, M., Rocha, M., Barrio, J., Belló, C., Da cruz, I.** (2011) Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*Vitis Labrusca*) from conventional and organic crops. *Quimica nova* 34, 798-803.
- Maheshwari, D.** (2017) Endophytes: Biology and Biotechnology, *Springer International Publishing*.
- Malusà, E., Laurenti, E., E, G., Rolle, L.** (2004) Influence of organic and conventional management on yield and composition of Grape cv. 'Grignolino'. *Acta horticulturae* 640, 135-141.
- Meißner, G., Athmann, M., Fritz, J., Kauer, R., Stoll, M., Schultz, H.** (2019) Conversion to organic and biodynamic viticultural practices: impact on soil, grapevine development and grape quality. *Oeno One* 53.
- Mulero, J., Pardo, F., Zafrilla, P.** (2010) Antioxidant activity and phenolic compounds in conventional and organic red grapes (var. *Monastrell*). *CYTA - Journal of food* 8, 185-191.
- Oliva, J., Mulero, J., Paya, P., Camara, M.A., Barba, A.** (2009) Influence of several fungicides on the antioxidant activity of red wines (var. *Monastrell*). *Journal of environmental science and health part B pesticides food contaminants and agricultural wastes* 44(6), 546-552.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E., Longa, C.M.O., Yousaf, S., Pertot, I., Campisano, A.** (2012) Fungal endophytic communities in grapevines *Vitis vinifera* respond to crop management. *Applied and environmental microbiology* 78(12), 4308-4317.
- Prieto, P., Mercado-Blanco, J.** (2008) Endophytic colonization of olive roots by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *FEMS Microbiological ecology* 64(2), 297-306.
- Reeve, J.R., Carpenter-Boggs, L., Reganold, J.P., York, A.L., Brinton, W.F.** (2010) Influence of biodynamic preparations on compost development and resultant compost extracts on wheat seedling growth. *Bioresource technology* 101(14), 5658-5666.
- Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D.O.** (2005) A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American journal of enology and viticulture* 56(3), 197-206.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M.** (1997) Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of clinical laboratory analysis* 11(5), 287-313.
- Spaccini, R., Mazzei, P., Squartini, A., Giannattasio, M., Piccolo, A.** (2012) Molecular properties of a fermented manure preparation used as field spray in biodynamic agriculture. *Environmental science and pollution research international* 19, 4214-4225.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., Song, W.** (2008) Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial ecology* 55(3), 415-424.

- Tassoni, A., Tango, N., Ferri, M.** (2013a) Comparison of biogenic amine and polyphenol profiles of grape berries and wines obtained following conventional, organic and biodynamic agricultural and oenological practices. *Food chemistry* 139(1-4), 405-413.
- Tintunen, S., Lehtonen, P.** (2001) Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of concentrations of phenolic compounds and spectral data. *European food research and technology* 212(3), 390-394.
- Tournas, V.H., Katsoudas, E.** (2005) Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International journal of food microbiology* 105(1), 11-17.
- Ulrich, K., Ulrich, A., Ewald, D.** (2008) Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology ecology* 63(2), 169-180.
- Usenik, V., Mikulic-Petkovsek, M., Solar, A., Stampar, F.** (2004) Flavonols of leaves in relation to apple scab resistance. *Zeitschrift fur pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz* 111, 137-144.
- Vian, M.A., Tomao, V., Coulomb, P.O., Lacombe, J.M., Dangles, O.** (2006) Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(15), 5230-5235.
- Virag, D., Naar, Z., Kiss, A.** (2007) Microbial toxicity of pesticide derivatives produced with UV-photodegradation. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 79(3), 356-359.
- West, E.R., Cothier, E.J., Steel, C.C., Ash, G.J.** (2010) The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Canadian journal of microbiology* 56(3), 209-216.
- Worthington, V.** (2001) Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *The journal of alternative and complementary medicine* 7(2), 161-173.
- Zironi, R.F., G. A.; Cabras, P.; Fatichenti, F.** (1991) Pesticide residues from vine to wine. *Atti - accademia italiana della vite e del vino* 43, 351-369.

**Sborník souhrnů a plných textů konference
KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2020**

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Editor: Olga Mařátková, Irena Kolouchová

Rok vydání: 2020

Počet stran: 100

Jedná se o elektronickou verzi publikace ve formátu PDF.