



Sborník souhrnů a plných textů konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2021

15. dubna 2021

Editor: Olga Maťátková, Irena Kolouchová

Praha 2021

Pořádající instituce:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Patronát: Česká společnost chemická

Přípravný a organizační výbor:

doc. Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

doc. Ing. Olga Maťátková, Ph.D.

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

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2021

ISBN 978-80-7592-096-6

Obsah

Brázdová L.: Metoda pro vyhledávání nových metabolitů s 4-alkyl-L-prolinovou jednotkou odvozenou z L-tyrosinu.....	5
Heřmanová K.: Vliv furfuralu na <i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B-598	14
Jung R.: Vývoj metody pro stanovení těkavých fenolů v nakuřovaných sladech a sladínách. 24	
Kulišová M.: Potravinové kontaminanty z řad mikromycet a produkce mykotoxinů těmito rody.....	26
Maršík D.: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – patogenita a současně dostupná léčba infekcí	34
Miškovská A.: Vliv reakčních podmínek na syntézu nanočástic stříbra.....	41
Nguyenová T. T. M.: Role střevního mikrobiomu v onemocnění	47
Plechátá M.: Antimikrobní účinky pigmentů houby <i>Monascus</i>	54
Rollová M.: Vliv polyfenolových extraktů na zástupce mikroorganismů gastrointestinálního traktu.....	61
Timkina E.: Mikroorganismy a oxidativní stres – působení na buňky a mechanismy adaptace	68

SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ

Metoda pro vyhledávání nových metabolitů s 4-alkyl-L-prolinovou jednotkou odvozenou z L-tyrosinu

Method for a search of new metabolites with 4-alkyl-L-proline moiety derived from L-tyrosine

L. Brázdová^{1,2}, N. Céspedes³, Z. Kameník², S. Kadlčík, J. Janata², J. Masák¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha; ²Mikrobiologický ústav AV ČR; ³Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia

Abstrakt

4-alkyl-L-prolinové deriváty (APD) jsou skupinou mikrobiálních specializovaných metabolitů, které mají společnou APD jednotku, ale rozdílnou finální strukturu metabolitu a odlišnou biologickou aktivitu. Tyto metabolity jsou biosyntetizovány Aktinobakteriemi z L-tyrosinu nebo L-leucinu. Tato práce je zaměřena na metabolity s APD jednotkou odvozenou z L-tyrosinu, mezi které se řadí například linkosamidy (skupina antibiotik), pyrrolbenzodiazepiny (látky s protinádorovou aktivitou) nebo hormaomycin (bakteriální signální molekula). Všechny tyto metabolity mají ve své struktuře zabudovaný APD motiv, který přispívá k lepším biologickým vlastnostem a proto by vyhledávání nových APD metabolitů mohlo být přínosem pro současnou medicínu, kdy je léčba bakteriálních infekcí stále komplikovanější kvůli rezistenci patogenních bakterií k dosud používaným antibiotikům. Cílené vyhledávání nových APD látek je však složité, a proto jsme v naší laboratoři vyvinuli metodu, která využívá izotopově značenou L-DOPA (intermediát biosyntézy APD prekurzorů) pro snadnější identifikaci nového APD metabolitu. ¹³C₂, ¹⁸O-L-DOPA je přidávána do produkčního média a na základě porovnání MS spekter získaných pro média s a bez ¹³C₂, ¹⁸O-L-DOPA lze APD látku odlišit od všech ostatních metabolitů. Pomocí této metody byl objeven nový APD metabolit, o kterém lze po analýze biosyntetického genového klastru říci, že je zcela odlišný od dosud známých metabolitů s APD jednotkou.

Abstract

4-alkyl-L-proline derivatives (APD) are a group of microbial specialized metabolites with a common APD moiety, but diverse final structures of metabolite and different biological activity. These metabolites are biosynthesized from L-tyrosine or L-leucine by actinobacteria. This study focuses on metabolites with APD moiety derived from L-tyrosine that are incorporated into for instance lincosamides (the group of antibiotics), pyrrolbenzodiazepines

(antitumor agents) and hormaomycin (a bacterial signalling molecule). All of these metabolites contain the APD motif that contributes to the better biological activity of metabolites. New APD metabolites can extend the group of clinically used compounds and help us to fight multidrug-resistant pathogenic bacteria. However, the search for new APD metabolites is complicated, therefore our laboratory has developed a method for easier detection of new APD metabolites. The method is based on feeding culture with isotopic labelled L-DOPA (an intermediate of the biosynthetic pathway of APD precursors). When we compare MS spectra for extracts of culture with and without $^{13}\text{C}_2$, ^{18}O -L-DOPA, then we can detect new APD metabolites. We have discovered a new APD metabolite by this method. In addition, we have analyzed the biosynthetic gene cluster of the new APD metabolite. This analysis has shown us that the new APD metabolite is distinct from known compounds with APD moiety derived from L-tyrosine (lincosamides, pyrrolbenzodiazepines, hormaomycin).

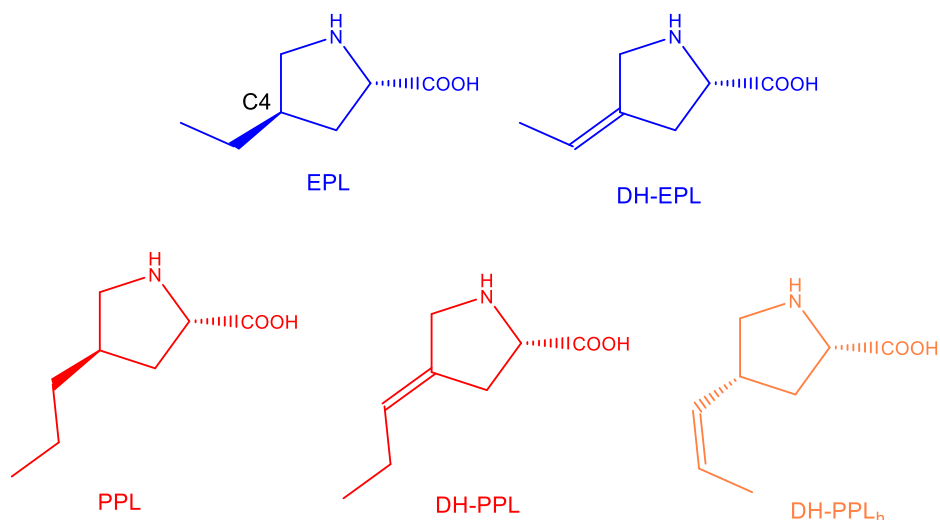
Klíčová slova: Aktinobakterie, specializované metabolity, 4-alkyl-L-prolinové deriváty

Keywords: actinobacteria, specialized metabolites, 4-alkyl-L-proline derivatives

4-alkyl-L-prolinové deriváty

4-alkyl-L-prolinové deriváty (dále jen APD) jsou skupinou specializovaných metabolitů, které jsou produkovány jak půdními tak i mořskými mikroorganismy. Hlavními producenty těchto specializovaných metabolitů jsou Aktinobakterie zejména pak rod *Streptomyces*, který produkuje okolo dvou třetin všech klinicky používaných antibiotik (Manteca a Yagüe, 2019). APD prekurzory mohou být biosyntetizovány z L-tyrosinu (Janata a kol., 2018) nebo z L-leucinu (Lukat a kol., 2017). Tato studie se zaměřuje na APD odvozené z L-tyrosinu a dále v textu bude popisována pouze tato skupina látek.

APD prekurzory (Obr. 1) jsou velmi podobné proteinogenní aminokyselině L-prolin, ale na pozici C4 mají postranní alkylový řetězec, který může být různě dlouhý (dvou- nebo tří-uhlíkatý) a také různě satureovaný (Janata a kol., 2018). Takovýto prekurzor je následně inkorporován do různých struktur, které mají rozdílnou biologickou aktivitu. Jedná se například o linkosamidy, skupinu antibiotik (Spizek a kol., 2004), dále jsou to pyrrolbenzodiazepiny, velká skupina látek s protinádorovými vlastnostmi (Gerratana, 2012), a v neposlední řadě se k těmto metabolitům řadí i hormaomycin, bakteriální signální molekula (Zlatopolskiy a kol., 2004).



Obr. 1: Struktury APD prekurzorů odvozených z 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.

Předpokládá se, že APD jednotka je oproti L-prolinové jednotce evolučně pokročilejší a produkčnímu kmenu dodává jistou evoluční výhodu. Ukázalo se, že linkosamidy a pyrrolobenzodiazepiny s inkorporovanou APD jednotkou vykazují lepší biologickou aktivitu oproti jejich analogům nesoucí pouhý L-prolin (Janata a kol., 2018). Jako jeden z příkladů lze uvést linkomycin A (APD jednotka – PPL) a celesticetin (L-prolin), kde celesticetin vykazuje zhruba 25 – 50 % biologickou aktivitu linkomycinu A (Magerlein, 1971). Další významný rozdíl v aktivitě lze pozorovat u linkomycinu A, který má zabudovaný APD s tříuhlíkatým postranním řetězcem a linkomycinu B s dvouuhlíkatým postranním řetězcem. Linkomycin B disponuje pouze 25 % biologickou aktivitou linkomycinu A (Pang a kol., 2015). V případě pyrrolobenzodiazepinů je kromě délky postranního řetězce APD důležitá také přítomnost dvojných vazeb na APD jednotce. Látky s dvojnou vazbou mají vyšší protinádorovou aktivitu ve srovnání s plně saturovaným APD (Gregson a kol., 2000). Na základě pozorování těchto dvou skupiny, kdy oba zástupci mají zcela odlišné biologické cíle i způsoby působení, lze usoudit, že vliv přítomnosti, délky i saturace postranního řetězce APD jednotky na biologickou aktivitu je obecnější, a proto by mohla tato skutečnost mít potenciál ve využití v klinické praxi (Janata a kol., 2018).

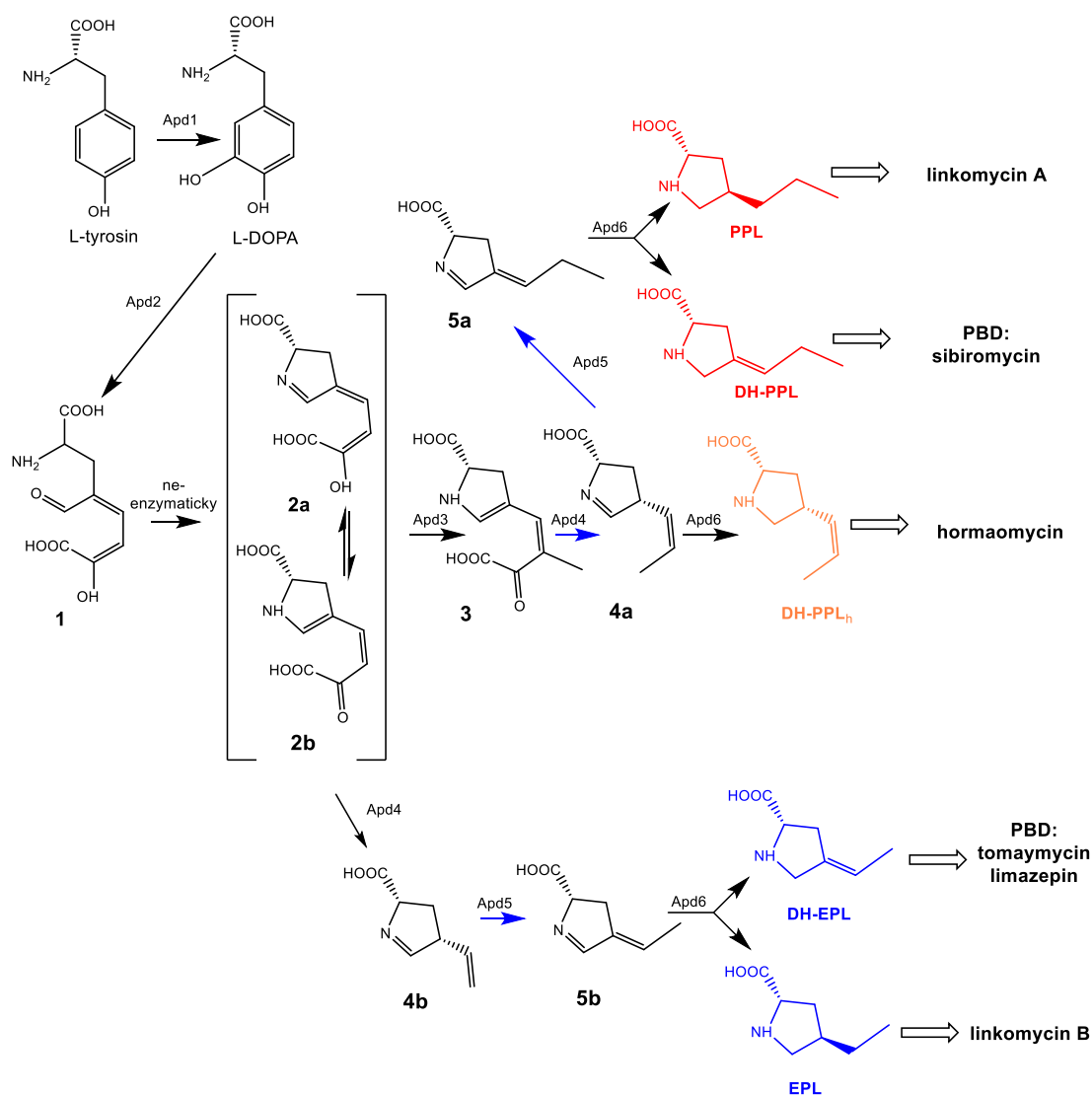
Biosyntéza APD odvozených z L-tyrosinu

Nejlépe je dosud popsána biosyntetická dráha APD prekurzorů odvozených z L-tyrosinu, která je kódována až šesti geny *apd1* – *apd6* (Janata a kol., 2018). Na Obr. 2 lze pak vidět schéma této dráhy. V prvních dvou katalyzovaných krocích biosyntézy je L-tyrosin přeměněn na L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) a následně na intermediát **1**, který podléhá spontánní cyklizaci a vzniká dikarboxylová kyselina **2** (Novotná a kol., 2004; Colabroy, 2016; Jirasková a kol., 2016). Zde se biosyntetická dráha dělí a vzniká buď APD s dvouuhlíkatým (2C) nebo tříuhlíkatým (3C) postranním řetězcem. 3C APD vyžaduje jeden krok navíc, kdy intermediát **2** je methylován pomocí C-methyltransferázy Apd3 na postranním řetězci za vzniku intermediátu **3** (Jirasková a kol., 2016). Pomocí Apd4 dochází k odštěpení oxalátu z intermediátu **2** popřípadě intermediátu **3** za vzniku intermediátu **4**, u kterého však nebyla dosud prokázána přesná struktura (Jirasková a kol., 2016; Zhong a kol., 2017). Také pořadí kroků katalyzovaných enzymy Apd3 a Apd4 je stále diskutované (Zhong a kol., 2017; Kameník a kol., 2018). V případě APD prekurzorů, které jsou inkorporovány do linkosamidů a PBD, se předpokládá, že intermediát **4** je pomocí isomerázy Apd5 přeměněn na intermediát **5**, který byl již dříve navržen v biosyntéze linkosamidů (Jirasková a kol., 2016). V dalším kroku opět společným pro všechny typy APD prekurzorů je intermediát **5** popřípadě intermediát **4** substrátem reduktázy Apd6 (Janata a kol., 2018; Steiningerová a kol., 2020), která v případě PBD redukuje pouze endocyklickou dvojnou vazbu, kdežto u linkosamidů dochází k redukci jak endo- tak exo-cyklické dvojně vazby a vzniká plně saturovaný postranní řetězec (Steiningerová a kol., 2020).

Suplementace produkčního média $^{13}\text{C}_2$, ^{18}O -L-DOPA

Vyhledávání nových metabolitů s APD jednotkou je značně složité pokud neznáme strukturu nebo fyzikální či chemické vlastnosti, proto jsme v naší laboratoři vyvinuli metodu, která by detekci nových APD látek usnadnila. Tato metoda je založena na znalosti biosyntetické dráhy APD prekurzorů a využívá jednoho z intermediátů, který je společný pro všechny typy APD prekurzorů odvozených od L-tyrosinu. Jedná se o L-DOPA, která je izotopově značená $^{13}\text{C}_2$, ^{18}O -L-DOPA a přidávána do produkčního média Aktinobakterií nesoucích biosyntetické genové klastry pro biosyntézu APD prekurzorů. Na Obr. 3 je pak znázorněné schéma biosyntézy APD prekurzorů, kde jsou vyznačeny zabudované $^{13}\text{C}_2$ (^{18}O je během biosyntézy APD eliminován) při obohacování $^{13}\text{C}_2$, ^{18}O -L-DOPA (Brázdová, 2019). Tato metoda byla

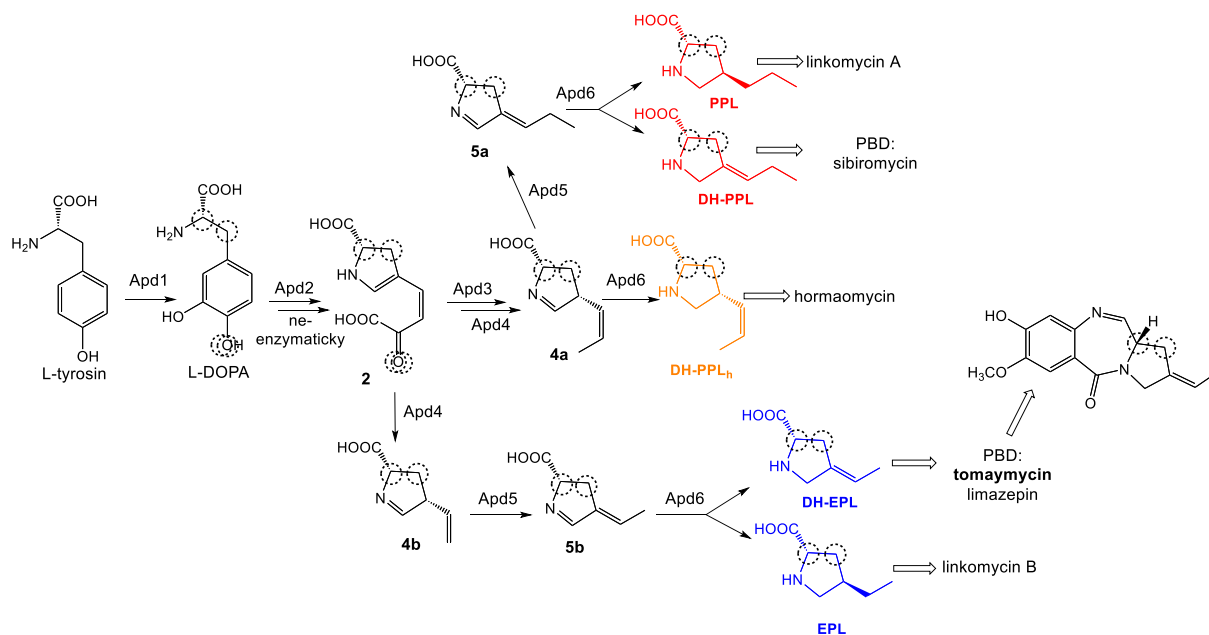
nejprve testována na kmeni *Streptomyces purpureus*, který produkuje již známý PBD tomaymycin (Palánová, 2017). Při zabudování izotopově značených atomů do celkové struktury metabolitu lze pozorovat v MS spektrech (Obr. 4) rozdílný poměr iontů 291,1 a 293,1 odpovídajících tomaymycinu v médiu s a bez obohacení intermediátem $^{13}\text{C}_2$, ^{18}O - L-DOPA (Brázdová, 2019).



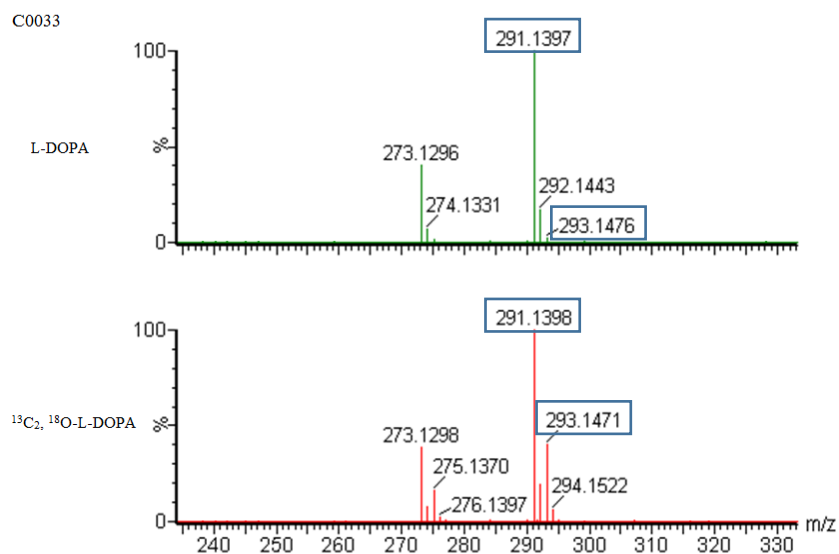
Obr. 2: Schéma biosyntetické dráhy APD precursorů odvozených z L-tyrosinu. Prokázané kroky biosyntézy jsou označeny černými šipkami, hypotetické kroky pak modrými. 3C APD (PPL – propyl-L-prolin, DH-PPL – 4-propyliden-L-prolin, DH-PPL_h – 4-propen-1-yl-L-prolin) jsou označeny červeně a oranžově, 2C APD (EPL – 4-ethyl-L-prolin, DH-EPL – 4-ethyliden-L-prolin) jsou znázorněny modře.

Lze tedy konstatovat, že metoda byla účinná, a proto jsme se rozhodli aplikovat ji na ostatní kmeny s biosyntetickým genovým klastrem pro biosyntézu APD precursoru,

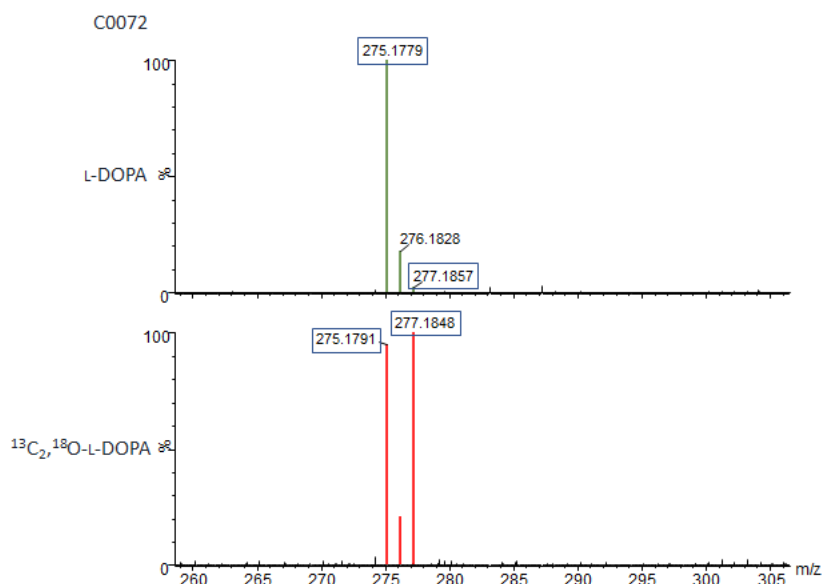
u kterých prozatím nebyla APD látka popsána. Pomocí této metody byl u kmene C0072 identifikován nový APD metabolit. Detekce nového metabolitu proběhla na základě porovnání MS spekter pro extrakty produkčního média s a bez značené L-DOPA. Jak lze vidět na Obr. 5, rozdíl v poměr iontů 275,1 a 277,1 je výrazný, z čehož lze usoudit, že tento metabolit nese APD jednotku.



Obr. 3: Zjednodušené schéma biosyntézy APD prekurzorů s vyznačenými zabudovanými atomy $^{13}\text{C}_2$ (^{18}O) při obohacování produkčního média intermediátem $^{13}\text{C}_2$, ^{18}O -L-DOPA.



Obr. 4: MS spektra pro extrakty produkčního média *S. purpureus* DSM 43360 (C0033) s přidavkem a bez přidavku $^{13}\text{C}_2$, ^{18}O - L-DOPA (převzato a upraveno z Brázdová, 2019).



Obr. 5: MS spektra pro extrakty produkčního média kmene C0072 bez přidavku a s přidavkem $^{13}\text{C}_2$, ^{18}O - L-DOPA.

Závěr

V naší laboratoři se podařilo vyvinout novou metodu pro snadnější vyhledávání nových metabolitů s APD jednotkou odvozenou od L-tyrosinu. Pomocí této metody, která je založená na suplementaci produkčního média izotopově značenou L-DOPA ($^{13}\text{C}_2$, ^{18}O - L-DOPA), se podařilo detekovat novou APD látku produkovanou kmenem C0072. Na základě analýzy genového klastru kódujícího biosyntézu této APD látky lze konstatovat, že se jedná o látku zcela odlišnou od již popsanych APD metabolitů (linkosamidy, PBD, hormaomycin, APD metabolity odvozené od L-leucinu). V současné době je tato nová látka předmětem zkoumání z hlediska její struktury a biologické funkce.

Literatura

- Birkenmeyer R. D., Kagan F.** (1970) Lincomycin. XI. Synthesis and structure of clindamycin, a potent antibacterial agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 13, str. 616 – 619.
- Brázdová L.** (2019) Charakterizace produktů bakteriálních kmenů kódujících biosyntézu alkylprolinových derivátů, VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, 60 stran.
- 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.

- Gregson S. J., Howard P. W., Barcella S., Nakamya A., Jenkins T. C., Kelland L. R., Thurston D. E.** (2000) Effect of C2/C3-endo unsaturation on the cytotoxicity and dna-binding reactivity of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, str. 1849-1851.
- 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.
- Magerlein B. J.** (1971) Modification of Lincomycin. *Advances in Applied Microbiology* Volume 14, str. 185-229.
- Manteca A., Yagüe P.** (2019) Streptomyces as a Source of Antimicrobials: Novel Approaches to Activate Cryptic Secondary Metabolite Pathways. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, DOI: 10.5772/intechopen.81812.
- Matzov D., Eyal Z., Benhamou R. I., Shalev-Benami M., Halfon Y., Krupkin M., Zimmerman E., Rozenberg H., Bashan A., Fridman M., Yonath A.** (2017) Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*, 45, str. 10284-10292.
- Novotna J., Honzatko A., Bednar P., Kopecky J., Janata J., Spizek J.** (2004) L-3,4-Dihydroxyphenyl alanine-extradial cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 271(18), str. 3678-3683.
- Palánová L.** (2017) Identifikace sekundárních metabolitů u bakterií, které obsahují biosyntetické genové shluky pyrrolobenzodiazepinů, VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, 74 stran.
- 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., Rezanka T.** (2004) Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 56, str. 121-154.
- 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.
- 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.

Zlatopolskiy B. D., Loscha K., Alvermann P., Kozhushkov S. I., Nikolaev S. V., Zeeck A., de Meijere A. (2004) Final Elucidation of the Absolute Configuration of the Signal Metabolite Hormaomycin. *Chemistry-A European Journal*, 10, str. 5568-5568.

Vliv furfuralu na *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598

Influence of furfural on *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598

K. Heřmanová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Cílem práce bylo sledovat vliv furfuralu, jednoho z inhibitorů vznikajících během předúpravy lignocelulózové biomasy, jež je využívána jako substrát pro aceton-butanol-ethanolovou fermentaci, na produkční kmen *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598. Byla zjištěna inhibice buněčného růstu i produkce rozpouštědel již při 0,5 - 1 g/l. Pro podrobnější sledování účinku furfuralu na kulturu byly sledovány změny v genových expresích vybraných genů, jež nepotvrdily zapojení genů *AKR* a *SDR* do redukce furfuralu na furfurylalkohol, ani zapojení genů jiné detoxifikační dráhy furfuralu – genů *hmfA* a *hmfD*. Sledováním změn v expresi dvou genů zapojených glykolýzy – genů *gap* a *gapN* byla zjištěna jejich souvislost s buněčným růstem, v případě zastavení růstu bylo pozorováno utlumení genu *gap*, a naopak zvýšení exprese genu *gapN*.

Abstract

The aim of this work was to study the effect of furfural, one of the inhibitors formed during pretreatment of lignocellulosic biomass, which is used as a substrate for acetone-butanol-ethanol fermentation, on the production strain *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598. Inhibition of cell growth and solvent production occurred at 0.5 - 1 g/l. To further monitor the effect of furfural on culture, changes in gene expression of selected genes were monitored, which didn't confirm the involvement of *AKR* and *SDR* genes in furfural reduction to furfuryl alcohol, nor the involvement of other furfural detoxification pathway genes - *hmfA* and *hmfD* genes. By monitoring the changes in the expression of two genes involved in glycolysis - the *gap* and *gapN* genes, their correlation with cell growth was found.

Klíčová slova: aceton-butanol-ethanolová fermentace, *Clostridium*, furfural, biotransformace furfuralu

Keywords: acetone-butanol-ethanol fermentation, *Clostridium*, furfural, biotransformation of furfural

Úvod

Solventogenní bakterie rodu *Clostridium* dokážou v procesu známém jako aceton-butanol-ethanolová fermentace (ABE fermentace) produkovat rozpouštědla – aceton, butanol, ethanol (Jones a Woods, 1986). Pro tento proces jsou schopné využívat širokou škálu substrátů od potravinářských plodin až po zemědělské odpady, přičemž jedním z nejperspektivnějších obnovitelných materiálů je lignocelulózová biomasa. Problémem u lignocelulózy je tvorba vedlejších inhibičních produktů vznikajících během její nezbytné předúpravy, které snižují efektivitu celého procesu. Jedním z významných inhibitorů je furfural, vznikající z celulózy a hemicelulózy, vyskytující se běžně v hydrolyzátech v koncentračním rozmezí 0,5-11 g/l (Zhang a kol., 2012). V poslední době je věnována pozornost biotransformačním drahám furfuralu, jejichž znalost může být využita k modifikaci jednotlivých kmenů klostridií umožňující jim odstranění furanu in situ.

Materiál a metodika

Mikroorganismus a médium

V práci byl využit kmen *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598. Kmen byl uchováván v destilované vodě ve formě sporové konzervy při 4° C.

Jako kultivační médium bylo využito TYA médium obsahující následující složky: glukóza – 20 g/l, kvasničný extrakt – 2 g/l, trypton – 6 g/l, KH_2PO_4 – 0,5 g/l, octan amonný – 3 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 g/l. pH média bylo pomocí 1 M roztoku NaOH upraveno na 6,8. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

Kultivace v kapalném médiu

Před zaočkováním byla sporová konzerva zahřata po dobu 2 minut na 80 °C a promíchána na vortexu. Poté byl obsah asepticky převeden do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml kultivačního média a kultura byla kultivována v anaerobní komoře po dobu 24 hodin a 37 °C.

Stanovení nárůstu kultury

Celkový nárůst kultury byl stanoven spektrofotometricky při 600 nm pomocí spektrofotometru Varian Cary 50 (Variant Cary, USA).

Analýza metabolitů a furfuralu

Vzorky byly odstředěny při 2000 x g po dobu 2 minut a přefiltrovány přes filtr s velikostí pórů 0,2 μm do vialek. Následně byly analyzovány na kapalinových chromatographech Agilent (Agilent technologies, USA). Pro HPLC byla použita kolona Watrex IEX H, refraktometrický detektor a mobilní fáze byla 5 mM kyselina sírová (průtok 1 ml/min). Pro UHPLC byla použita kolona ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, DAD detektor a mobilní fáze byl acetonitril a 0,025 % roztok H_3PO_4 (průtok 1,5 ml/min). Objem nástriku byl 20 μl .

Izolace RNA a reverzní transkripce

Vzorky určené k izolaci RNA byly odstředěny (10000 x g, 2 minuty), pelety byly promyty destilovanou vodou, resuspendovány a naředěny na $\text{OD} \approx 1$ (600 nm). 1 ml této suspenze byl znovu odstředěn (10000 x g, 2 minuty) a peleta byla uchovávána při -70°C v hlubokomrazicím boxu pro následnou izolaci RNA. Pro samotnou izolaci RNA byly vzorky rozmrazeny na ledu a celková RNA byla izolována pomocí komerčního kitu High Pure RNA Isolation Kit (Roche Life Science, Švýcarsko) dle instrukcí výrobce. Koncentrace RNA byla změřena na nanodropu. Následná reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Life Science, Švýcarsko) dle instrukcí výrobce.

RT-qPCR

Všechny RT-qPCR reakce byly provedeny v cykleru QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, USA) s použitím reakčního premixu 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonsko). Reakční směs (20 μl) byla připravena dle instrukcí výrobce s použitím primerů (Tab. I) ve výsledné koncentraci 200 nM. Teplotní profil reakce byl zvolen dle instrukcí výrobce, annealingová teplota byla zvolena jako 61°C , při níž RT-qPCR reakce se všemi sadami primerů probíhaly s efektivitou v rozmezí 90-110 % (efektivita byla stanovena provedením několika RT-qPCR reakcí s různými ředěními cDNA). Vyloučení kontaminace v reakci bylo ověřeno provedením reakcí s nt a noRT kontrolou. Relativní změny v genových expresích byly vypočítány pomocí tzv. $\Delta\Delta\text{Ct}$ metody (Schmittgen a Livak, 2008). Jako kontrola vždy složil vzorek bez přídavku furfuralu odebraný ve stejný čas jako vzorky určené pro sledování změn v relativní genové expresi s přídavkem furfuralu.

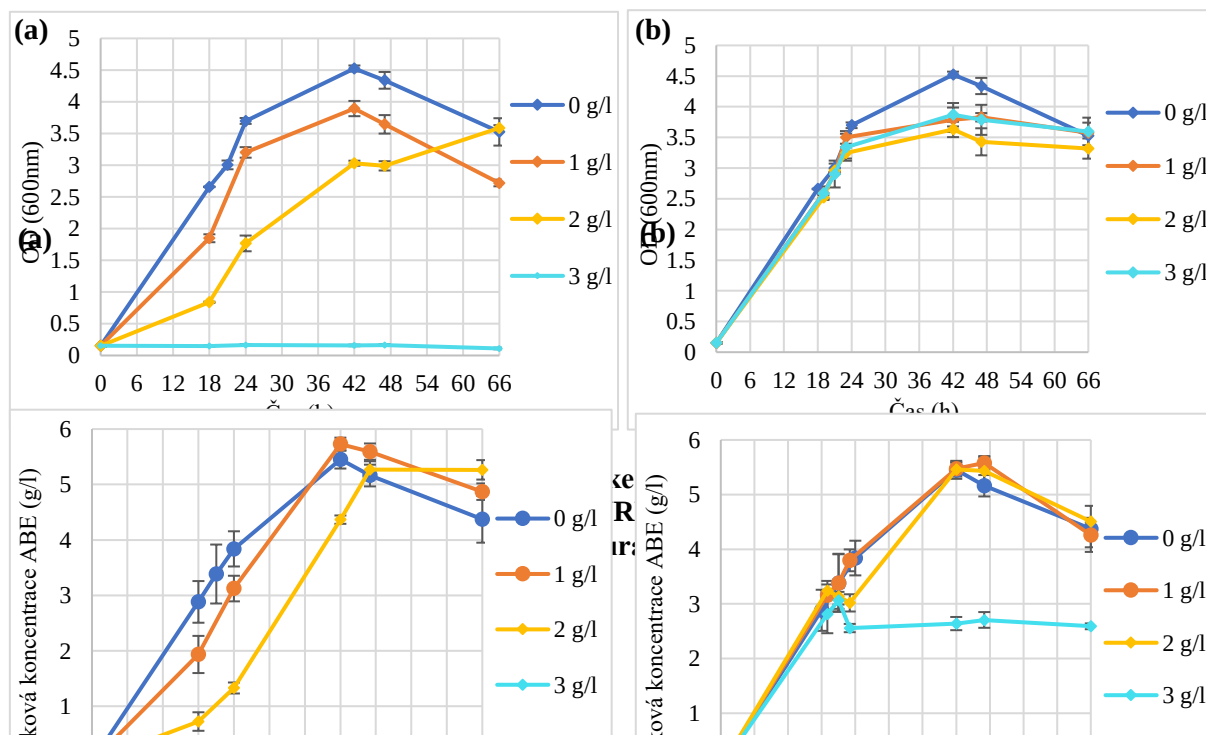
Gen	Sekvence forward primeru (5' - 3')	Sekvence reverse primeru (5' - 3')
-----	------------------------------------	------------------------------------

<i>AKR</i>	AGCCGGATAAAGGTGGATGG	CAGCTAAGCGCCATTTGAGC
<i>SDR</i>	CAGCTACAAAAGGCGCGGT	TTTATTGGACCGGGTGCTACAG
<i>hmfA</i>	TACAAGGACAGATGCAGGGC	TAGCTCACCTGCACCCTTTG
<i>hmfD</i>	GATATGTGGCTCAGGCAGGA	GCAGTTGCTTCAGTTTGTCCA
<i>gap</i>	TGCTCCACACAGAAAAGGTGA	GGAACCTCTTTGAGCACCACCA
<i>gapN</i>	AGCTTGTGGTCGGAAATCCA	CTCTTCCCATGCAAGCCTCA
<i>greA</i>	GCAGAAGCGGA CCCTATGAA	TCCGTCTGGA ACTGTTACCTC

Výsledky a diskuse

Vliv furfuralu na buněčný růst a produkci rozpouštědel

Pro sledování vlivu furfuralu na buněčný růst a produkci rozpouštědel *C. beijerinckii* NRRL B-598 byly provedeny vsádkové kultivace s přidavkem furfuralu v koncentračním rozmezí 0-3 g/l (koncentrační rozsah byl zvolen na základě experimentů, které zde nejsou uvedeny, a které prokázaly úplnou inhibici růstu i produkce při 4 g/l přidaného furfuralu). Byly vytvořeny dvě sady, do první sady byl inhibitor přidán před začátkem kultivace (v 19. hodině kultivace), do druhé sady byl furfural přidán až k rostoucí kultuře, aby bylo možné pozorovat, zda se vliv furfuralu bude lišit na základě toho, kdy bude do média přidán.

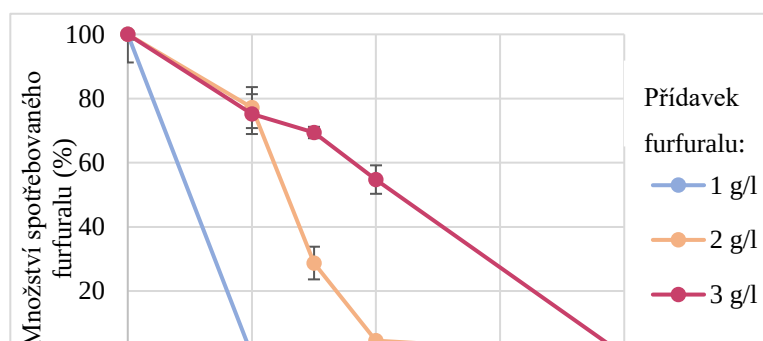


Obr. 2: Vliv přidavku furfuralu před začátkem kultivace (a) a k rostoucí kultuře (v 19.h kultivace) (b) na celkovou produkci ABE *C. beijerinckii* NRRL B-598. Jednotlivé křivky znázorňují celkové koncentrace ABE v čase pro různé přidané koncentrace furfuralu

Z Obr. 1-(a) a 2-(a) je vidět, že přidavek furfuralu před začátkem kultivace způsobil inhibici buněčného růstu i produkce ABE již od nejnižší testované koncentrace 1 g/l. Jedná se ale spíše o prodlouženou lag fázi, která je patrná zejména u vzorku s přidavkem 2 g/l furfuralu. U tohoto vzorku bylo i přes počáteční inhibici dosaženo podobné maximální optické density i celkové produkce ABE jako u kontrolního vzorku, což je efekt často uváděný v literatuře (Yao a kol., 2017). Přidavek 3 g/l již způsobil úplnou inhibici buněčného růstu i produkce ABE. Přidavek furfuralu k již rostoucí kultuře způsobil mírnou inhibici buněčného růstu v celém testovaném koncentračním rozsahu 0-3 g/l (Obr. 1-(b)), výsledné hodnoty optických densit po 66 hodinách kultivace jsou ale srovnatelné s kontrolním vzorkem bez přidavku furfuralu. Co se týče produkce rozpouštědel, u vzorků s přidavkem 1 g/l a 2 g/l furfuralu nebyla inhibice pozorována, 2 g/l sice způsobil na krátkou dobu v okamžiku přidání inhibitoru ke kultuře zastavení produkce rozpouštědel, poté ale produkce pokračovala (Obr. 2-(b)). Přidavek 3 g/l k rostoucí kultuře způsobil úplnou inhibici produkce rozpouštědel stejně jako jeho přidavek před začátkem kultivace, buněčný růst ale nadále po přidání inhibitoru pokračoval, což je efekt pozorovaný i v práci Zhang a Ezeji (2013), ve které 3 g/l furfuralu přidaného během solventogenní fáze způsobil zastavení produkce rozpouštědel, buněčný růst *C. beijerinckii* NCIMB 8052 ale inhibován nebyl.

Spotřeba furfuralu během fermentace

Aby bylo zjištěno, zda je furfural během fermentace buňkami spotřebováván, byly ze sady s přidavkem furfuralu k rostoucí kultuře (19. hodina kultivace) odebrány vzorky k analýze na UHPLC. Z Obr. 3 je vidět, že 1 g/l přidaného furfuralu byl spotřebován během 2 hodin, téměř všechny furfural byl ve vzorku s 2 g/l furfuralu spotřebován po 4 hodinách, 3 g/l furfuralu byly ve stejnou dobu spotřebovány ale jen z 55 %.



Obr. 3: Spotřeba furfuralu během fermentace. Jednotlivé křivky znázorňují změny v množství spotřebovaného furfuralu v čase pro různé přidané koncentrace furfuralu

Výběr genů pro RT-qPCR

Aby byly blíže objasněny pozorované jevy furfuralu na kulturu *C. beijerinckii* NRRL B-598, byly vybrány některé geny, jejich změny v expresi byly dále sledovány. Protože byla během fermentace pozorována spotřeba furfuralu buňkami, byly vybrány geny, jež by mohly být v odbourávání furfuralu zapojeny. Těmito geny byly geny pro AKR (aldo/keto reduktáza) a SDR (dehydrogenáza/reduktáza s krátkým řetězcem) – enzymy podílející se dle literatury na redukcii furfuralu na furfurylalkohol. Tyto geny byly vytipovány na základě aminokyselinových podobností jejich produktů s geny popsány v literatuře pro *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (Okonkwo a kol., 2019; Zhang a Ezeji, 2013; Zhang a kol., 2015).

Dále byly vybrány dva geny jiné detoxifikační dráhy furfuralu, jež byla zatím popsána jen pro aerobní mikroorganismy – geny *hmfA* (xanthin dehydrogenáza) a *hmfD* (AMP-vázající protein). Homology těchto genů popsány v literatuře pro *Cupriavidus basilensis* HMF14 (Koopman a kol., 2010) byly dle aminokyselinových podobností jejich produktů nalezeny i u kmene *C. beijerinckii* NRRL B-598.

Aby bylo zjištěno, zda má furfural vliv na zpomalení toku centrálním metabolismem, poslední dva geny vybrané pro sledování změn v expresi byly geny zapojené do centrálního metabolismu – geny *gap* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) a *gapN* (NADP⁺ dependentní glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Jsou to geny zapojené do glykolýzy, přičemž dehydrogenáza kódovaná *gapN* zároveň produkuje NADPH potřebné pro redukcii furfuralu pomocí AKR a SDR.

Jako referenční gen byl vybrán gen *greA*, jehož exprese byla pro zde studovaný kmen *C. beijerinckii* NRRL B-598 ověřena jako nejstabilnější (Jureckova a kol., 2021).

Změny v genové expresi vybraných genů

Pro sledování změn v relativní expresi vybraných genů byly odebrány dva vzorky, vzorek ze sady s přidavkem furfuralu před začátkem kultivace (odebraný v 18. hodině kultivace) a vzorek ze sady s přidavkem furfuralu k rostoucí kultuře (odebraný ve 21. hodině kultivace neboli 2 hodiny po přidavku furfuralu). V obou vzorcích se jednalo o přidavek 1 g/l furfuralu. Vypočítané změny v relativních genových expresích zobrazuje Tab. II.

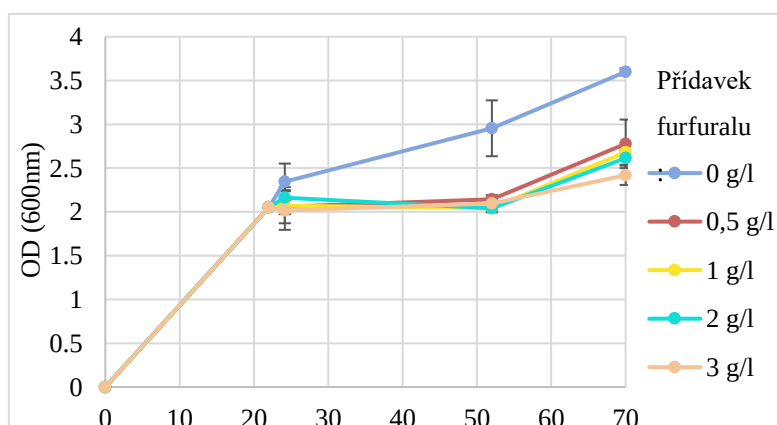
Tab. II: Změny v relativních genových expresích vybraných genů. Fur_1 vzorek s přidavkem furfuralu před začátkem kultivace, Fur_2 vzorek s přidavkem furfuralu k rostoucí kultuře (odebrán 2 h po přidavku furfuralu). Změna gen. exprese u kontroly bez furfuralu =

Gen	Fur_1	Fur_2
<i>AKR</i>	0,87	1,02
<i>SDR</i>	n.d.	n.d.
<i>gap</i>	1,99	1,21
<i>gapN</i>	0,95	0,57

n.d. - změny v relativní gen. expresi nebylo možné stanovit

U genu *SDR* byla použitou metodou zjištěna tak nízká exprese u vzorku s přidavkem furfuralu i u vzorku bez přidavku, že u tohoto genu nebylo možné relativní změny v expresi stanovit. U genu *AKR* byla relativní exprese nižší či srovnatelná s kontrolním vzorkem bez furfuralu, což naznačuje, že ani jeden z těchto genů nebyl do biotransformace furfuralu u kmene *C. beijerinckii* NRRL B-598 zapojen. Relativní exprese genu *gap* byla v obou vzorcích vyšší, naopak exprese genu *gapN* nižší nežli u kontrolního vzorku.

Pro ověření těchto výsledků byl navržen další experiment, během kterého byly navíc sledovány dva další geny zapojené do jiné biotransformační dráhy furfuralu – geny *hmfA* a *hmfD*. Byly provedeny vsádkové kultivace s přidavkem 0-3 g/l furfuralu k rostoucí kultuře (ve 22.hodině kultivace), během níž byly zároveň odebrány vzorky pro spektrofotometrické stanovení nárůstu kultury (Obr. 4) a analýzu na HPLC. Pomocí analýzy na HPLC bylo během tohoto experimentu dokázáno, že furfural je buňkami opravdu redukován na furfurylalkohol (výsledky zde neuvedeny).



Obr. 4: Vliv přidavku furfuralu k rostoucí kultuře (ve 22. h kultivace) na buněčný růst *C. beijerinckii* NRRL B-598. Jednotlivé křivky znázorňují změny OD v čase pro různé přidané koncentrace furfuralu

Pro sledování relativních změn v genové expresi byly z tohoto experimentu vybrány dva vzorky, první byl odebrán 0,75 h po přidavku furfuralu, druhý 1,5 h po přidavku. Relativní změny v expresi genu *SDR* opět nebylo možné díky velmi nízké expresi ve vzorcích stanovit a stejně tomu bylo u genu *hmfD*, což naznačuje že ani jeden z těchto genů opravdu nebyl do biotransformace furfuralu zapojen. U genů *AKR* a *hmfA* byly sice malé změny v relativních expresích pozorovány (Tab. III), vzhledem ale k očekávanému mnohonásobnému zvýšení jejich exprese je předpokládáno, že se ani jedna ze zde vybraných drah degradace furfuralu u *C. beijerinckii* NRRL B-598 neúčastní. Analýzou na HPLC bylo zjištěno, že se furfural redukuje na furfurylalkohol, do této redukce budou tedy u zde zkoumaného kmene pravděpodobně zapojeny jiné dehydrogenázy, kterých je v genomu *C. beijerinckii* NRRL B-598 mnoho (Pataková a kol., 2019).

Expresí genu *gap* zapojeném do glykolýzy byla v tomto experimentu u obou vzorků utlumena, což odpovídá skutečnosti, že furfural po přidavku na dlouhou dobu zastavil buněčný růst (Obr. 4). Snížená expresí *gap* po přidavku furfuralu ústící v pozastavení buněčného růstu byla pozorována i v práci Liu a kol. (2019). Relativní expresí genu *gapN* byla v obou vzorcích naopak zvýšena, možným vysvětlením je skutečnost, že dehydrogenáza kódovaná *gapN* vytváří “bypass“ v jedné části glykolýzy a zároveň produkuje NADPH. Je tedy možné, že v případě pozastavení buněčného růstu (vyvolaném utlumením genu *gap*) byla zapojena tato dehydrogenáza pro produkci nedostatkového NADPH z centrálního metabolismu.

Tab. III: Změny v relativních genových expresích vybraných genů. Fur_0,75h vzorek odebraný 0,75 h po přidavku furfuralu, Fur_1,5h vzorek odebraný 1,5 h po přidavku furfuralu. Změna gen. exprese u kontroly bez furfuralu = 1.

Gen	Fur_0,75h	Fur_1,5h
<i>AKR</i>	0,79	1,07
<i>SDR</i>	n.d.	n.d.
<i>gap</i>	0,81	0,36
<i>gapN</i>	1,36	1,18
<i>hmfA</i>	1,25	0,73
<i>hmfD</i>	n.d.	n.d.

n.d. - změny v relativní gen. expresi nebylo možné stanovit

Závěr

Během kultivačních experimentů byla pozorována inhibice jak buněčného růstu, tak produkce rozpouštědel kmene *C. beijerinckii* NRRL B-598 po přidavku furfuralu do média. Bylo vyloučeno zapojení genů *AKR* a *SDR* do redukce furfuralu na furfurylalkohol i genů jiné detoxifikační dráhy furfuralu – *hmfA* a *hmfD*. Dále bylo dokázáno, že je furfural buňkami *C. beijerinckii* NRRL B-598 redukován na furfurylalkohol, jen budou v této biotransformaci zapojeny jiné geny než zde sledované. Rovněž byla pozorována souvislost buněčného růstu s geny *gap* a *gapN* zapojenými do centrálního metabolismu, v případě pozastavení buněčného růstu po přidavku furfuralu bylo pozorováno utlumení genu *gap* zapojeného do glykolýzy, a naopak zapojení dehydrogenázy kódované *gapN* pravděpodobně pro generování nedostatkového NADPH z centrálního metabolismu.

Literatura

Jones, D. T., Woods, D. R. (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiological reviews, 50, str. 484-524.

Jureckova K., Raschmanova H., Kolek J., Vasylikivska M., Branska B., Patakova P., Provaznik I., Sedlar K. (2021) Identification and validation of reference genes in *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 for RT-qPCR using RNA-Seq data. Frontiers in microbiology, 12, str. 1-10.

Koopman F., Wierckx N., de Winde J. H., Ruijsenaars H. J. (2010) Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl) furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 107, str. 4919-4924.

Liu H., Zhang J., Yuan J., Jiang X., Jiang L., Zhao G., Liu B. (2019) Omics-based analyses revealed metabolic responses of *Clostridium acetobutylicum* to lignocellulose-derived inhibitors furfural, formic acid and phenol stress for butanol fermentation. Biotechnology for biofuels, 12, str. 1-20.

Okonkwo C. C., Ujor V., Ezeji T. C. (2019) Chromosomal integration of aldo-ketoreductase and short-chain dehydrogenase/reductase genes in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 enhanced tolerance to lignocellulose-derived microbial inhibitory compounds. Scientific reports, 9, str. 1-18.

Pataková P., Branská B., Sedlar K., Vasylikivska M., Jureckova K., Kolek J., Koscova P., Provaznik I. (2019) Acidogenesis, solventogenesis, metabolic stress response and life cycle changes in *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 at the transcriptomic level. Scientific reports, 9, str. 1-21.

Schmittgen T.D., Livak K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature protocols, 3, str. 1101-1108.

Yao D., Dong S., Wang P., Chen T., Wang J., Yue Z.-B., Wang Y. (2017) Robustness of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* for acetone-butanol-ethanol production: Effects of lignocellulosic sugars and inhibitors. Fuel, 208, str. 549-557.

Zhang Y., Ezeji T. C. (2013) Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 to elucidate role of furfural stress during acetone butanol ethanol fermentation. Biotechnology for biofuels, 6, str. 1-17.

Zhang Y., Han B., Ezeji T. C. (2012) Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. New biotechnology, 29, str. 345-351.

Zhang Y., Ujor V., Wick M., Ezeji T. C. (2015) Identification, purification and characterization of furfural transforming enzymes from *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. Anaerobe, 33, str. 124-131.

Vývoj metody pro stanovení těkavých fenolů v nakuřovaných sladech a sladinách

Development of a method for the determination of volatile phenols in smoked malts and worts

R. Jung, M. Karabín

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Nakuřované slady, které jsou využívány při výrobě alkoholických nápojů (nakuřovaných pív a whisky), jsou vyhledávány pro svá specifická kouřová a uzená aroma, způsobené především těkavými fenoly a furfuraly. Tyto látky vznikají termickou degradací ligninu, konkrétně z p-kumarylalkoholu (prekurzor fenolů), koniferylalkoholu (prekurzor guajakolů), sinapylalkoholu (prekurzor syringolů) a termickou degradací celulózy a hemicelulózy (furfuraly).

V této práci byly markery nakuřování izolovány z vodného extraktu rozemletého sladu prostřednictvím HS-SPME a následně analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Pro tuto metodu byla stanovena opakovatelnost, vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou, jejíž hodnoty se pohybovaly v rozmezí 2-10 % s výjimkou ethylguajakolu, jehož odchylka přesahovala 12 %. Následně byl pomocí modelu CCD zjišťován vliv parametrů (pH, teplota a doba izolace) na míru extrakce látek, přičemž bylo prokázáno, že vliv těchto parametrů na extrakci je velmi nízký.

U šesti komerčně dostupných sladů bylo zjištěno, že obsah markerů nakuřování je ovlivněn typem spalovaného materiálu (dřevo, rašelina) a technologií nakuřování. U kongresních sladin, vyrobených ze sladů nakuřovaných rašelinou, bylo stanoveno, že během rmutování přechází do sladin v rozmezí od 10 % rel. do 70 % rel. všechny těkavé fenoly. Obdobně také u sladin vyrobených ze sladů nakuřovaných dřevem dochází k přechodu všech těkavých fenolů a to v rozmezí od 10 do 60 % rel. s výjimkou p-, m-kresolu, který v případě sladu nakuřovaného bukovým dřevem přecházel do sladin téměř úplně (96 %). V případě furanových derivátů (furfural a 4-methylfurfural) bylo potvrzeno, že obsah těchto látek se může během rmutování zvyšovat vlivem Maillardových reakcí. V budoucnu bude metoda aplikována na stanovení těkavých fenolů v meziproduktech výroby piva a ke zjištění přítomnosti dalších markerů nakuřování v nakuřovaných sladech.

Klíčová slova: Nakuřované slady, těkavé fenoly, furanové deriváty, HS-SPME, GC-MS, rašelina, dřevo

Abstract

Smoked malts, which are used for the production of alcoholic beverages (smoked beers and whiskies), are sought after for their specific smoky and burnt aroma, caused mainly by volatile phenols and furfurals. These substances are formed by the thermal degradation of lignin, specifically from p-coumaryl alcohol (precursor of phenols), coniferyl alcohol (precursor of guaiacols), sinapyl alcohol (precursor of syringols) and the thermal degradation of cellulose and hemicellulose (furfurals).

In this work, the markers of smoking were isolated from the aqueous extract of ground malt by HS-SPME and then analyzed by gas chromatography coupled to mass detection. Repeatability, expressed as relative standard deviation, was determined for this method, with values ranging from 2 to 10 %, except for ethylguaiacol, whose deviation exceeded 12 %. Subsequently, the effect of the parameters (pH, temperature and isolation time) on the extraction rate of the compounds was investigated using the CCD model and it was shown that the effect of these parameters on the extraction was very low.

For six commercially available malts, the content of markers of smoking was found to be influenced by the type of burnt material (wood, peat) and the smoking technology. For congress worts made from peat-smoked malts, it was determined that all volatile phenols are transferred to the worts during mashing in the range from 10 %rel. to 70 %rel.. Similarly, in the case of worts made from wood-smoked malts are all volatile phenols transferred between 10 % and 60 %rel.. The only exception was transfer of p-/m-cresol mixture from beechwood-smoked malt to the wort, which was virtually complete (96 %).

In the case of furan derivatives (furfural and 4-methylfurfural), it was confirmed that their content could increase during mashing due to the Maillard reactions. In the future, the method will be applied for the determination of volatile phenols in brewing technology intermediates and for the detection of other markers of smoking in smoked malts.

Keywords: Smoked malts, volatile phenols, furan derivates, HS-SPME, GC-MS, peat, wood

Potravinové kontaminanty z řad mikromycet a produkce mykotoxinů těmito rody

Micromycete food contaminants and production of mycotoxins by these genera

M. Kulišová, I. Kolouchová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Mykotoxiny přitahují celosvětovou pozornost kvůli jejich dopadu na lidské zdraví, bezpečnost potravin a širokým ekonomickým ztrátám. Tyto sekundární metabolity syntetizované řadou mikroskopických vláknitých hub (rody *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*) mohou kontaminovat široké spektrum potravin a krmiv. Ačkoliv je identifikováno více než 400 mykotoxinů (Cinar a Onbasi, 2019), výzkum se zabývá zejména studiem aflatoxinů, ochratoxinu A, fumonisinů, zearalenonu a trichothecenů, vzhledem k jejich největšímu dopadu na bezpečnost potravin.

Abstract

Mycotoxins attract worldwide attention due to their impact on human health, food safety and widespread economic losses. These secondary metabolites synthesized by a number of microscopic filamentous fungi (genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*) can contaminate a wide range of foods and feeds. Although more than 400 mycotoxins have been identified (Cinar a Onbasi, 2019), the research focuses on aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, zearalenone and trichothecenes due to their greatest impact on food safety.

Klíčová slova

mikromycety, fungální kontaminace, potravinářský průmysl, mykotoxiny

Key words

micromycetes, fungal contamination, food industry, mycotoxins

Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou fungální sekundární toxické metabolity s širokou škálou chemických struktur (Turnera a kol., 2009). Jsou považovány za druh obranného systému hub proti hmyzu, dalším mikroorganismům a zvířatům (Etzal, 1999). Mykotoxiny mohou kontaminovat potraviny a zemědělské produkty v jakékoli fázi výroby, zpracování, přepravy a skladování (Ferrao a kol., 2017). Faktory, které ovlivňují růst mikromycet a produkci mykotoxinů, jsou teplota, vlhkost vzduchu, nutriční faktory, zeměpisná poloha, genetické požadavky a řada dalších (Tola a kol., 2016).

Jedna čtvrtina zemědělských produktů je každoročně celosvětově kontaminována mykotoxiny (Tola a kol., 2016). Nejběžnějšími druhy mikromycet, které jsou schopny produkce mykotoxinů, jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* a *Alternaria*. Podle výsledků studií drůbeže a savců mohou mít mykotoxiny karcinogenní, mutagenní, teratogenní, hepatotoxické, nefrotoxické, imunosupresivní a embryotoxické účinky (Maia a kol., 2014). Mykotoxikóza je souhrnný pojem pro toxicitu vyskytující se po konzumaci produktu kontaminovaného mykotoxiny (Peraica a kol., 1999). Mykotoxiny způsobují různé stupně toxicity podle doby expozice, množství mykotoxinu, fyziologického stavu a citlivosti organismu lidí a zvířat (Ferra a kol., 2017).

Mykotoxiny se vyskytují téměř ve všech druzích krmiv a produktů pro zvířata jako jsou pšeničné otruby, hrachové slupky, kukuřičná zrna, mléko, maso a rovněž v řadě produktů lidské konzumace jako jsou obiloviny, ovoce, zelenina, koření a další (Tola a kol., 2016). Konzumace těchto produktů vytváří vážná zdravotní rizika u všech zvířat a člověka. Příjem mykotoxinů prostřednictvím krmiv či potravin způsobuje spíše chronickou intoxikaci než akutní příznaky. Akutní toxicita je pozorována při krátkodobé expozici vysokým dávkám mykotoxinů. Příznaky tohoto druhu toxicity zahrnují selhání jater a ledvin, hepatitidu, zvracení či gastrointestinální krvácení. Chronická toxicita se vyskytuje při dlouhodobé expozici nízkým dávkám mykotoxinů a způsobuje vážné poškození jater, ledvin a imunitního systému. Kvůli tomu hraje dlouhodobá expozice mykotoxinům výraznou roli při vzniku rakoviny zmíněných orgánů (Etzal, 1999). Kromě rizika pro veřejné zdraví způsobují mykotoxiny významné ekonomické ztráty pro potravinářský průmysl v důsledku snížených výnosů plodin, ztrát příjmů z obchodu a nemocí hospodářských zvířat (Abrunhosa a kol., 2016). Metody používané pro stanovení obsahu mykotoxinů jsou vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (GC-MS), enzymová imunoanalýza (ELISA) a screeningové metody založené na biosenzorech (Bueno

a kol., 2015). Detekce je však komplikovaná kvůli omezením v analytické metodice (Murphy a kol., 2006). Díky tomu je prevence fungální kontaminace a syntézy mykotoxinů nezbytná pro udržení bezpečnosti potravin v potravinářském průmyslu.

Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou skupinou mykotoxinů produkovaných vláknitými houbami rodu *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus parasiticus*). V přírodě se vyskytuje více než 14 různých chemických forem aflatoxinů, nejnebezpečnějšími jsou však aflatoxiny B1, B2, G1 a G2. Zvolené názvosloví je založeno na barvě, kterou aflatoxiny vykazují pod ultrafialovým zářením (B – modrá, G – zelená) (Anfossi a kol., 2012). Aflatoxin B1 je nejtoxičtějším přirozeně se vyskytujícím mykotoxinem, vykazuje hepatokarcinogenní a hepatotoxické účinky (Payne a Brown, 1998). Aflatoxiny kontaminují zejména kukuřici, bavlnu, sóju, arašidy a ořechy (Perrone a Gallo, 2017). Přirozené rozmnožování hub produkujících aflatoxiny je ovlivněno řadou faktorů, včetně podmínek prostředí (vysoká teplota, relativní vlhkost), přítomnosti oxidu uhličitého a kyslíku, mechanického poškození produktu a dalších. Ze zmíněných faktorů je pro tvorbu aflatoxinů nejdůležitější zejména teplota a relativní vlhkost. *Aspergillus flavus* prokázal optimální růst při teplotě od 29 do 35 °C a maximální produkce aflatoxinů bylo dosaženo při 24 °C. Naopak při teplotách pod 13 °C nebo nad 42 °C a relativní vlhkosti nižší než 70 % nebyly aflatoxiny produkovány vůbec (Campagnollo a kol., 2016). Tepelné zpracování, jako je vysokotepelné ošetření (UHT), pasterizace, a také skladování v chladu neovlivňují množství aflatoxinů v potravinách, protože jsou tyto látky poměrně stabilní a odolné (Picinin a kol., 2013).

Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA) patří mezi mykotoxiny produkované převážně fungálními rody *Aspergillus* a *Penicillium*. Produkce probíhá za optimálních podmínek prostředí a při skladování, zejména v tropických a subtropických oblastech, jako je východní a jižní Evropa a jižní Amerika (Yeni a kol., 2016). Existují tři typy ochratoxinů - A, B, a C. OTA je nejběžnějším a nejvýznamnějším pro zdraví lidí a zvířat. Důsledkem kontaminace OTA krmiv a potravin vznikají obrovské ekonomické ztráty, zejména v živočišné výrobě. Expozice OTA může způsobit renální dysfunkci, další účinky jsou zejména nefrotoxické, dále pak karcinogenní, embryotoxické a hepatotoxické. Hlavními potravinovými zdroji OTA jsou kukuřice, pšenice, rýže, hroznové víno, luštěniny, káva, pivo, hrozinky, ořechy, koření a další (Leitao, 2019). První detekce přítomnosti OTA v lidské krvi se datuje na rok 1970 na Balkáně. V rešerši Malir a kol. byly nashromážděny údaje o obsahu OTA ve vzorcích lidské krve

zdravých osob a v několika zemích byly nalezeny hodnoty překračující 1,0 g/l (Malir a kol., 2016).

Fusariové mykotoxiny

Fusariové toxiny jsou sekundární metabolity syntetizované toxigenními druhy *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium graminearum* a dalšími (Caldwell a kol., 1970). Fumonisin, zearalenon a trichotheceny jsou nejčastějšími skupinami mykotoxinů rodu *Fusarium* (Ferrigo a kol., 2016). Fusariové mykotoxiny mají širokou škálu jak akutních, tak chronických účinků na zdraví člověka a zvířat. Limity těchto mykotoxinů jsou podle Evropské komise (Nařízení Komise č. 1126/2007, Nařízení Komise 576/2006) stanoveny v nezpracovaných obilovinách, mlecích produktech a produktech z obilovin na 200-1750 µg/kg pro deoxynivalenol, 20-400 µg/kg pro zearalenon a 200-4000 µg/kg pro součet fumonisinů B1 a B2.

Fumonisin

Fumonisin byly objeveny v roce 1988 v jižní Africe a jsou produkovány různými fungálními druhy jako jsou *Fusarium verticillioides* a *Fusarium proliferatum* či *Aspergillus niger* (EFSA, 2005). Nachází se nejčastěji v kukuřici a výrobcích z ní, rýži, pivu, fazolích, chřestu a sóje. V současné době je identifikováno 28 typů fumonisinů, které jsou rozděleny do čtyř skupin – fumonisin A (A1, A2, A3), fumonisin B (B1, B2, B3), fumonisin C (C1, C3, C4) a fumonisin P (P1, P2, P3). Nejdůležitější je skupina B, která zahrnuje fumonisin B1 (FB1), který je podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) řazen mezi potenciálně karcinogenní látky pro člověka (skupina 2B). Studie dále uvádí, že FB1 způsobuje zvýšenou prevalenci rakoviny jícnu a jater u lidí (Ueno a kol., 1997). Tento mykotoxin má také toxické účinky na řadu orgánů (nervový a kardiovaskulární systém, játra, plíce, ledviny) u zvířat (Bertero a kol., 2018).

Zearalenon

Zearalenon (ZEA), známý jako estrogení mykotoxin, je metabolitem produkovaným druhy *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium crookwellense* a *Fusarium semitectum* (Gadzala-Kopciuch a kol., 2011). Hlavními zdroji kontaminace ZEA jsou potraviny na bázi obilovin, jako je kukuřice, čirok, pšenice, rýže, ječmen, oves a také ořechy, sója, sezam (Abia kol., 2013). Na základě in vivo studií bylo zjištěno, že ZEA narušuje hormonální rovnováhu díky své podobnosti s přirozeně se vyskytujícími estrogeny. ZEA má vysokou afinitu k estrogenovým receptorům, což způsobuje

poruchy reprodukce a plodnosti u savců. Jeho účinky jsou také hepatotoxické, imunotoxické, karcinogenní a nefrotoxické (Rai a kol., 2018).

Trichotheceny

Trichotheceny jsou velkou skupinou fusariových mykotoxinů, i když jsou produkovány rovněž jinými fungálními rody jako jsou *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium* a *Cylindrocarpon* (Chilaka a kol., 2017). Trichotheceny jsou dále rozděleny do čtyř typů (A-D). Typy A a B jsou nejběžněji obsaženy v obilovinách. Trichotheceny typu A, jako jsou toxiny T-2 a HT-2, diacetoxyscirpenol, monoacetoxyscirpenol a neosolaniol jsou syntetizovány převážně druhy *Fusarium sporotrichioides* a *Fusarium langsethiae*. Trichotheceny typu B, mezi které patří nejtoxičtější metabolit z řad trichothecenů deoxynivalenol (DON), jsou produkovány nejčastěji rody *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum* (Vogelsang a kol., 2019). Mechanismus účinku trichothecenů je založen na inhibici syntézy bílkovin u eukaryot. Tyto mykotoxiny ovlivňují peptidyltransferázový enzym vážící se na ribozomální podjednotku 60S, což způsobuje inhibici translace proteinu (Sudakin, 2003). Skupina trichothecenů má významný dopad na produkci obilovin a obilí kvůli zdravotním rizikům pro lidskou konzumaci, krmení hospodářských zvířat či sladování. Podle zprávy FDA se ekonomické ztráty spojené s mykotoxiny v USA pohybují v rozmezí od 0,5 milionu USD do více než 1,5 miliardy USD. Ztráty jsou způsobeny z největší části aflatoxiny (kukuřice, arašídý), fumonisiny (kukuřice) a deoxynivalenolem (pšenice) (Villafana a kol., 2019). Kontrola těchto mykotoxinů je tudíž nezbytná z hlediska zdraví lidí a zvířat, rovněž jako z ekonomických důvodů.

Závěr

Výskyt mykotoxinů v zemědělských produktech, potravinách a krmivech je celosvětovým problémem, jelikož téměř všechny komodity jsou za vhodných podmínek náchylné ke kontaminaci. Producenty mykotoxinů jsou zejména rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* a *Alternaria*, i když se schopnost syntézy mykotoxinů u jednotlivých druhů výrazně liší. Důraz je kladen zejména na sledování obsahu aflatoxinů, ochratoxinu A, fumonisinů, zearalenonu a trichothecenů. Účinky těchto mykotoxinů se mohou projevit akutně či chronicky a zahrnují zejména hepatotoxicitu, nefrotoxicitu, imunogenicitu, karcinogenezi a mutagenezi.

Literatura

- Abia W.A., Warth B., Sulyok M., Krska R., Tchana A.N., Njobeh P.B., Dutton M.F., Moundipa P.F. (2013). Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control*, 31, str. 438-453.
- Abrunhosa L., Morales H., Soares C., Calado T., Vila-Cha A.S., Pereira M., Venancio A. (2016). A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and estimation of probably daily intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (2), str. 249-255.
- Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., D'Arco G., Passin C., Giraudi G. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. *Food Control*, 25, str. 125-130.
- Bertero A., Moretti A., Spicer L.J., Caloni F. (2018). *Fusarium* molds and mycotoxins: Potential species-specific effects. *Toxins*, 10, str. 244.
- Bueno D., Istamboulie G., Munoz R., Marty J.L. (2015). Determination of mycotoxins in food: A review of bioanalytical to analytical methods applied spectroscopy reviews. *Applied Spectroscopy*, 50, str. 728-774.
- Caldwell R.W., Tuite J., Stob M., Baldwin R. (1970). Zearalenone production by *Fusarium* species. *Applied Microbiology*, 20 (1), str. 31-34.
- Campagnollo F.B., Ganev K.C., Khaneghah A.M., Portela J.B., Cruz A.G., Granato D., Corassin C.H., Oliveira C.A.F., Sant'Ana A.S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*, 68, str. 310-329.
- Cinar A., Onbasi E. (2019). *Mycotoxins: The hidden danger in foods (Mycotoxins and food safety)*, IntechOpen.
- EFSA (2005). Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *EFSA Journal*, 235, str. 31-31.
- Etzel R.A. (1999). Indoor mold and children's health. *Environmental Health Perspectives*, 107, str. 463.

- Ferrao J., Bell V., Chabite I.T., Fernandes T.H. (2017). Mycotoxins, food and health mycotoxins, food and health. *Journal of Nutritional Health & Food Science*, 5 (7), str. 1-10.
- Ferrigo D., Raiola A., Causin R. (2016). Fusarium toxins in cereals: Occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules*, 21, str. 627.
- Gadzala-Kopciuch R., Cendrowski K., Cesarz A., Kielbasa P., Buszewski B. (2011). Determination of zearalenone and its metabolites in endometrial cancer by coupled separation techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401 (7), str. 2069-2078.
- Chilaka C.A., Boevre M.D., Atanda O.O., Saeger S.D. (2017). The status of Fusarium Mycotoxins in sub-Saharan Africa: A review of emerging trends and post-harvest mitigation strategies towards. *Food Control*, 9 (1), str. 19.
- Leitao A.L. (2019). Occurrence of ochratoxin A in coffee: Threads and solutions. A mini-review. *Beverages Journal*, 5, str. 36.
- Maia F., Freire F., Guedes M.I.F. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36 (1), str. 159-165.
- Malir F., Ostry V., Pfohl-Leszkowicz A., Malir J., Toman J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins (Basel)*, 8, str. 191.
- Murphy P.A., Hendrich S., Landgren C. (2006). Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*, 71 (5), str. 51-65.
- Payne G., Brown M. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Review of Phytopathology*, 36, str. 329-362.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (9), str. 754-766.
- Perrone G., Gallo A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Methods in Molecular Biology* (1542), str. 33-49.
- Picinin L.C.A., Cerqueira M.M.O.P., Vargas E.A., Lana A.M.Q., Toaldo I.M. (2013). Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas Gerais state, Brazil. *Food Control*, 31, str. 419-424.
- Rai A., Dixit S., Singh S.P., Gautam N.K., Das M., Tripathi A. (2018). Presence of zearalenone in cereal grains and its exposure risk assessment in Indian population. *Journal of Food Science*, 83 (12), str. 1-8.
- Sudakin D. L. (2003). Trichothecenes in the environment: Relevance to human health. *Toxicology Letters*, 143, str. 97-107.

- Tola M., Kebede B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food and Agriculture*, 2 (1).
- Turnera N.W., Subrahmanyam S., Piletskyb S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica chimica acta*, 632 (2), str. 168-180.
- Ueno Y., Wang K.I.S.D., Sugiura Y., Sekjima M., Tanaka T., Yu S.Z. (1997). Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food and Chemical Technology*, 35 (12), str. 1143-1150.
- Villafana R.T., Ramdass A.C., Rampersad S.N. (2019). Selection of *Fusarium* trichothecene toxin genes for molecular detection depends on TRI gene cluster organization and gene function. *Toxins*, 11, str. 36.
- Vogelsang S., Beyer M., Pasquali M., Jenny E., Musa T., Bucheli T.D. Wettstein F.E., Forrer H-R. (2019). An eight-year survey of wheat shows distinctive effects of cropping factors on different *Fusarium* species and associated mycotoxins. *European Journal of Agronomy*, 105, str. 62-77.
- Yeni F., Yavas S., Alpas H., Soyer Y. (2016). Most common foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce: A review of recent outbreaks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (9), str. 1532-1544.

***Pseudomonas aeruginosa* – patogenita a současně dostupná léčba infekcí**

***Pseudomonas aeruginosa* – pathogenicity and currently available treatment of infections**

D. Maršík, J. Masák

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Gramnegativní bakterie *P. aeruginosa* je oportunní patogen způsobující onemocnění u celé řady hostitelů včetně rostlin, hlístic, hmyzu a savců (Diggle a Whiteley, 2020). Konkrétně u člověka způsobuje řadu akutních chronických infekcí jako pneumonie, meningitis, absces, infekce kůže, močových cest, rohovky, kostí a kloubů, měkkých tkání včetně diabetické nohy, bakteriémie a erytém spojivek (Al-Wrafy a kol., 2016). Rizikovými faktory rozvoje infekce jsou například dlouhodobá hospitalizace pacientů zejména na oddělení JIP, zavedení invazivního vstupu, užívání širokospektrých antibiotik, pokročilý věk, indikace imunosupresivní léčby a výskyt onemocnění oslabující imunitu pacienta (Bassetti a kol., 2018). Ve srovnání s jinými patogeny jsou pseudomonádové infekce spojeny s vysokou mírou morbidit a mortality (Harbarth a kol., 2002; Osmon a kol., 2004) a jejich léčba je významně omezena rostoucím výskytem vysoce rezistentních kmenů, které znesnadňují empirický výběr vhodného antibiotika. Obecně platí, že opožděné zahájení účinné léčby komplikuje průběh onemocnění a prokazatelně zvyšuje úmrtnost pacientů. Při cílené terapii navíc obvykle nemohou být z důvodů rezistence aplikovány antimikrobiální látky první volby používané při léčbě citlivých kmenů (Horcajada a kol., 2019). Z těchto důvodů je potřeba stále hledat nové antimikrobiální látky, které by byly účinné při léčbě pseudomonádových infekcí.

Abstract

The gram-negative bacterium *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing disease in a variety of hosts, including plants, nematodes, insects, and mammals (Diggle and Whiteley, 2020). In humans, it causes a number of acute and chronic infections such as pneumonia, meningitis, abscess, infections of the skin, urinary tract, cornea, bones and joints, soft tissues including diabetic foot, bacteremia and conjunctivitis (Al-Wrafy et al., 2016). Risk factors for the development of infection include, e.g., long-term hospitalization of patients, especially in the ICU, invasive entry, use of broad-spectrum antibiotics, advanced age, indications for

immunosuppressive therapy, and the incidence of disease weakening the immune system (Bassetti et al., 2018). Compared to others pathogens, pseudomonal infections are associated with high morbidity and mortality (Harbarth a kol., 2002; Osmon a kol., 2004) and their treatment is significantly limited by the increasing incidence of highly resistant strains, which make it difficult to empirically select an appropriate antibiotic. In general, delayed initiation of effective treatment complicates the course of the disease and has been shown to increase patient mortality. In addition, antimicrobial agents of first choice used in the treatment of susceptible strains usually cannot be applied due to the resistance (Horcajada et al., 2019). For these reasons, there is a continuing need for new antimicrobials that would be effective in treating *Pseudomonas* infections.

Klíčová slova

Pseudomonas aeruginosa, rezistence, antibiotika, terapie

Keywords

Pseudomonas aeruginosa, resistance, antibiotics, therapy

Obecné zásady léčby

Součástí samotné léčby pseudomonádových infekcí by měla být mimo identifikace původce onemocnění také jeho typizace zahrnující stanovení citlivosti na antibiotika a detekce mechanismů rezistence kódované mobilními genetickými elementy. Z preventivních důvodů by měly být tyto testy prováděny rutinně v místech se zvýšeným rizikem výskytu multirezistentních bakterií. Rychlá a včasná analýza bakteriálního klonu je esenciální pro zahájení vhodné, efektivní léčby infekce a významně snižuje riziko úmrtí. Stanovení citlivosti na antibiotika je ale u *P. aeruginosa* velmi náročné, protože současně může být aktivováno několik mechanismů rezistence s proměnlivou efektivitou, řada nízko exprimovaných systémů je obtížně detekovatelné, indukovatelné systémy nemusí být detekovány před zahájením léčby a některé používané laboratorní metody mohou generovat výsledky, které by mohli být chybně interpretovány jako falešně citlivé nebo falešně rezistentní (Bassetti a kol., 2018). U závažných a neodkladných infekcí je proto při podezření na *P. aeruginosa* vhodné zahájit empirickou terapii v kombinovaném režimu ještě před stanovením antibiotické citlivosti. Benefit kombinované terapie spočívá ve zvýšení pravděpodobnosti výběru účinného antibiotika. Obecně doporučenou kombinací je zástupce β -laktamu s antipseudomonálním účinkem

(piperacillin/tazobaktam, ceftolozan/tazobaktam, ceftazidim, cefepim nebo karbapenem) s aminoglykosidem nebo fluorochinolonom (Bassetti a kol., 2018; Driscoll a kol., 2007).

Epidemiologie

Bakterie *P. aeruginosa* je charakteristická nozokomiálními nákazami, u kterých je identifikována jako původce v 11-13,8 % případů. Na jednotkách intenzivní péče dosahuje prevalence pseudomonádové infekce až 22,6 %. Konkrétně je *P. aeruginosa* jedním z nejčastějších původců nosokomiální pneumonie HAP (hospital-acquired pneumonia), pneumonie vázané na zdravotní zařízení HCAP (healthcare-associated pneumonia) a ventilátorové pneumonie VAP (ventilator-associated pneumonia). V případě komunitní pneumonie (CAP – community acquired pneumonia), pro kterou je charakteristický rozvoj infekce mimo nemocniční prostředí, je *P. aeruginosa* vzácný původce. Na druhou stranu míra úmrtnosti u těžké formy CAP asociované s *P. aeruginosa* dosahuje 50 až 100 % (Cillóniz a kol., 2016). Mezi další obvyklé nozokomiální nákazy *P. aeruginosa* patří infekce ran, míst po chirurgickém výkonu (Driscoll a kol., 2007) nebo močových cest (Sorlí a kol., 2019) s mortalitou dosahující až 20 % (Bassetti a kol., 2018). Značně ohroženou skupinou jsou pacienti s popáleninami, u kterých je *P. aeruginosa* nejčastějším původcem infekce (Driscoll a kol., 2007). V případě infekce krevního řečiště je *P. aeruginosa* jednou z nejčastěji izolovaných bakterií ve porovnání s jinými gramnegativními rody (Bassetti a kol., 2018) a u pacientů s cystickou fibrózou je identifikována jako hlavní příčina morbiditu a mortality (Oliver a kol., 2000).

Bakteriémie

Vstup *P. aeruginosa* do krevního řečiště je ve 40 % neznámý, ale nejčastěji je identifikován jako dýchací ústrojí, močové cesty, zavedený centrální žilní katetr, kůže nebo měkké tkáně (Bassetti a kol., 2018). Po izolaci bakterie z krevního řečiště je nejprve potřeba identifikovat zdroj infekce a následně zvolit vhodnou empirickou léčbu antibiotiky. V případě nevhodně zvolené léčby v úvodu terapie byla zaznamenána významně vyšší úmrtnost pacientů. Riziko nevhodně zvolené empirické terapie lze snížit podáním kombinované antimikrobiální léčby zahrnující antibiotika z odlišných tříd s *in vitro* aktivitou proti *P. aeruginosa*. Jakmile jsou k dispozici výsledky citlivosti, měla by být léčba v závěru upravena na jedno antibiotikum s nejvyšší *in vitro* antimikrobiální aktivitou a nejnižší náchylností k vytvoření rezistence (Micek a kol., 2005).

Pneumonie

Rozvoj pneumonie u ventilovaných pacientů je obvykle způsoben v důsledku poškození epitelu při intubaci (Al-Wrafiy a kol., 2016). Terapie se zahajuje použitím kombinace 2 antipseudomonádových antibiotik. Jakmile jsou známy výsledky testů citlivosti, lze přejít na monoterapii s výjimkou pacientů se septickým šokem nebo u pacientů s vysokým rizikem úmrtí. Potenciálně vhodnými antibiotiky pro závěr léčby jsou antipseudomonádní cefalosporin, karbapenem nebo β -laktam. Naopak by se v monoterapii neměly používat aminoglykosidy, které mají při léčbě VAP nízkou účinnost. Adekvátní účinek aminoglykosidů by z důvodů špatného průchodu antibiotika do plic vyžadoval vysoké sérové koncentrace, čímž se zvyšuje riziko nefrotoxicity nebo ototoxicity. Protože ale výskyt kmenů *P. aeruginosa* rezistentních k fluorochinolům přesahuje v Evropě 30 %, mohou být aminoglykosidy využity empiricky jako součást kombinované terapie závažných VAP. U komunitní pneumonie by měla být antipseudomonádová terapie zahájena pouze s vysokým podezřením nebo potvrzením *P. aeruginosa* jako původce, protože se léčba od běžných patogenů způsobujících toto onemocnění kompletně liší (Bassetti a kol., 2018).

Infekce močových cest

Jedna z nejčastějších příčin vzniku infekce močových cest je asociovaná se zavedením permanentního močového katetru (Mittal a kol., 2009). Standardní péče spočívá v eliminaci predispozic vzniku infekce v kombinaci s použitím jednoho antibiotika, což je považováno za adekvátní terapii při absenci septického šoku (Bassetti a kol., 2018). V mnoha případech je z důvodů rezistence *P. aeruginosa* jedinou terapeutickou možností léčba polymyxiny. Komerčně dostupnou formou kolistinu pro parenterální použití je prolečivo kolistimetát sodný. Použití kolistinu ale limituje úzké terapeutické okno s nefrotoxitou jako hlavním nežádoucím účinkem omezující dávku (Sorlí a kol., 2019).

Infekce kůže a měkkých tkání

Terapie infekce kůže a měkkých tkání způsobené *P. aeruginosa* závisí především na závažnosti onemocnění. U benigního průběhu obvykle postačí antimikrobiální léčba, v případě závažných a život ohrožujících stavů je potřeba navíc chirurgicky odstranit infikovanou tkáň tzv. debridement. Obzvláště ohroženou skupinou jsou pacienti s těžkými popáleninami, u kterých je *P. aeruginosa* jednou z nejčastějších příčin infekce. U vysoce rizikových pacientů je zpočátku vhodné použít kombinaci β -laktamu a aminoglykosidu. Na základě *in vitro* testů jsou následně obvykle zvoleny antipseudomonádní β -laktam, karbapenem nebo fluorochinolon (Bassetti a kol., 2018).

Cystická fibróza

Infekce dýchacích cest se u pacientů s autosomálně recesivní genetickou poruchou, cystickou fibrózou, objevuje často v raném věku a navzdory agresivní léčbě je eradikace bakterie téměř nemožná a postupně dochází ke ztrátě funkce plic až smrti pacienta (Diggle a Whiteley, 2020; Döring a kol., 2000; Rossi a kol., 2020). V roce 2012 byla infekce *P. aeruginosa* diagnostikována přibližně u 30 % pacientů s CF ve věku od 6 do 10 let a u 60 % pacientů ve věku 18 až 24 let (Bilton a kol., 2020). Příčinou onemocnění a faktorem podporující vznik infekce je mutace genu pro transmembránový regulátor vodivosti CF (*CFTR*). Narušený transport chloridových iontů přes membránu epitelálních buněk vede k tvorbě hyperosmolárního viskózního sputa na povrchu dýchacích cest, který brání funkci mukociliární clearance a podporuje iniciaci bakteriální kolonizace a vznik akutní infekce s prudkou zánětlivou reakcí. Přetrvávající stimulace imunitního systému bakteriemi způsobuje chronický zánět plic (Al-Wrafy a kol., 2016; Rossi a kol., 2020).

U pacientů s počínající kolonizací plic *P. aeruginosa* bylo po agresivní antibiotické léčbě prokázáno snížení rizika přechodu do fáze chronické infekce a zlepšení funkce plic (Frederiksen a kol., 1997). Po přechodu do chronické fáze, která je definována opakovanou kultivací *P. aeruginosa* ze sputa po dobu 6 měsíců, je doporučeno pravidelně užívat antipseudomonální antibiotika v inhalované formě (Driscoll a kol., 2007). U nestabilních pacientů se zhoršujícím se stavem je léčba doplněná o intravenózně podávané kombinace antibiotik (Döring a kol., 2000; Tajovská, 2013;), které jsou voleny na základě aktuálního mikrobiálního rozboru sputa (Driscoll a kol., 2007).

Ve srovnání s VAP, u které je inhalační forma podání antibiotika doporučena pouze jako doplněk intravenózní terapie infekcí způsobených MDR kmeny *P. aeruginosa* (Bassetti a kol., 2018), je naopak snadný způsob podání antibiotika u chronického zánětu plic asociovaného s CF nezbytný. Účinnost inhalovaných antibiotik je omezena špatnou penetrací do míst infekce a skrz bakteriální biofilm, inaktivací účinné látky sputem, vznikem rezistence, změnou bakteriálního fenotypu a retencí bakterií v hlenových zátkách. Registrovanými antibiotiky s inhalačním podáním pro eradikaci *P. aeruginosa* jsou v současnosti tobramycin, aztreonam (Bilton a kol., 2020) a kolistin (Döring a kol., 2000). Jedinou skupinou antibiotik s možností perorální aplikace jsou fluorochinolony, konkrétně ciprofloxacin (Millar a kol., 2020; Zhao a kol., 2020). Použití fluorochinolonů je ale vzhledem k obavám z možné inhibice vývoje kloubní chrupavky pozorované v preklinických studiích kontroverzní u dětských pacientů (Fujitani a kol., 2017). Z důvodů možné pacientovi intolerance dostupné antibiotické léčby nebo jejího

nedostatečného účinku, je u CF stále vysoká poptávka po vývoji nových antimikrobiálních látek (Bilton a kol., 2020) a zdokonalení jejich formy podání (Ehsan a Clancy, 2015).

Závěr

Vysoká míra morbidity a stále rostoucí výskyt multirezistentních klonů *P. aeruginosa* v nemocničním prostředí, jsou hlavními důvody pro nepřetržitý screening nových antimikrobiálních látek účinných v terapii pseudomonádových infekcí. Z preventivních důvodů je navíc velmi důležité v místech se zvýšeným rizikem výskytu rezistentních klonů *P. aeruginosa* pravidelně provádět mikrobiologický rozbor izolátů. U život ohrožujících infekcí s podezřením na *P. aeruginosa* je vhodné zahájit terapii empiricky v kombinovaném režimu ještě před stanovením antibiotické citlivosti. Kombinovaný režim by se však měl využívat zejména pro snížení rizika použití nevhodné antimikrobiální léčby, protože u adekvátní kombinované terapie nebyla jednoznačně prokázána nižší úmrtnost ve srovnání s adekvátní monoterapií (Deconinck a kol., 2017; Tang a kol., 2018). Výjimkou je konsensuální prohlášení o léčbě CF, kdy je doporučena kombinovaná antipseudomonální terapie pro léčbu středně těžkých až těžkých exacerbací a z důvodů snížení rizika rozvoje bakteriální rezistence (Döring a kol., 2000).

Literatura

- Al-Wrafy F., F., Brzozowska E., Górska S., Gamian A. (2016) Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* – the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70, str. 78-91.
- Bassetti M., Vena A., Croxatto A., Righi E., Guery B. (2018) How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, 7, DOI 10.7573/dic.212527
- Bilton D., Pressler T., Fajac I., Clancy J. P., Sands D., Minic P., Cipolli M., Galeva I., Solé A., Quittner A., Liu K., McGinnis J. P., Eagle G., Gupta R., Konstan M. W. (2020) Amikacin liposome inhalation suspension for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis*, 19, str. 284-291.
- Cillóniz C., Gabarrús A., Ferrer M., de la Bellacasa J. P., Rinaudo M., Mensa J., Niederman M. S., Torres A. (2016) Community-acquired pneumonia due to multidrug and non-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*, 150, str. 415-425.
- Deconinck L., Meybeck A., Patoz P., van Grunderbeeck N., Boussekey N., Chicke A., Delannoy P. Y., Georges H., Leroy O. (2017) Impact of combination therapy and early de-escalation on outcome of ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection diseases*, 49, str. 396-404.
- Diggle S. O., Whiteley M. (2020) Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166, str. 30-33.
- Döring G., Conway S. P., Heijerman H. G., Hodson M. E., Hoiby N., Smyth A., Touw D. J. (2000) Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *European respiratory journal*, 16, str. 749-767.
- Driscoll J. A., Brody S. L., Kollef M. H. (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67, str. 351-368.

- Ehsan Z., Clancy J. P. (2015) Management of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients using inhaled antibiotics with a focus on nebulized liposomal amikacin. *Future microbiology*, 10, str. 1901-1912.
- Frederiksen B., Koch Ch., Høiby N. (1997) Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 23, str. 330-335.
- Fujitani S., Moffett K. S., Yu V. L. (2017) *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobe: Infectious disease & antimicrobial agent*, dostupné z: <http://www.antimicrobe.org/new/b112.asp>.
- Harbarth S., Ferrière, Hugonnet S., Ricou B., Suter P., Pittet D. (2002) epidemiology and prognostic determinants of bloodstream infections in surgical intensive care. *Archives of surgery*, 137, str. 1353-1359.
- Horcajada J. P., Montero M., Oliver A., Sorlí L., Luque S., Gómez-Zorrilla S., Benito N., Grau S. (2019) Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 32, e00031-19.
- Micek S. T., Lloyd A. E., Ritchie D. J., Reichley R. M., Fraser V. J., Kollef M. H. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, str. 1306-1311.
- Millar B. Ch., McCaughan J., Rendall J. C., Moore J. E. (2020) Delafloxacin-A novel fluoroquinolone for the treatment of ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *The clinical respiratory journal*, 15, str. 116-120.
- Mittal R., Aggarwal S., Sharma S., Chhibber S., Harjai K. (2009) Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview,. *Journal of infection and public health*, 2, str. 101-111.
- Oliver A., Cantón R., Campo P., Baquero F., Blázquez J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288, str. 1251-1253.
- Osmon S., Ward S., Fraser V. J. (2014) Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical investigations in critical care*, 125, str. 607-616.
- Rossi E., La Rosa R., Bartell J. A., Marvig R. L., Haagensen J. A. J., Sommer L. M., Molin S., Krogh Johanesen H. (2020) *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature reviews microbiology*, DOI <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5>.
- Sorlí L., Luque S., Li J., Campillo N., Danés M., Montero M., Segura C., Grau S., Horcajada J. P. (2019) Colistin for the treatment of urinary tract infections caused by extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Dose is critical. *Journal of infection*, 79, str. 253-261.
- Tajovská E. (2013) Cystická fibróza a současné možnosti léčby pohledem farmaceuta. *Praktické lékařství*, 9, str. 234-239.
- Tang S. Y., Zhang S. W., Wu J. D., Zhang J., Dong J. T., Guo P., Zhang D. L., Yang J. T., Zhang W. J. (2018) Comparison of mono- and combination antibiotic therapy for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: A cumulative meta-analysis of cohort studies. *Experimental and therapeutic medicine*, 15, str. 2418-2428.
- Zhao L., Wang S., Li X., He X., Jian L. (2020) Development of *in vitro* resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial resistance & infection control*, 124, DOI <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00793-8>.

Vliv reakčních podmínek na syntézu nanočástic stříbra

The influence of reaction conditions on the synthesis of silver nanoparticles

A. Miškovská, A. Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Nanočástice kovů přitahují pozornost vědecké i komerční sféry díky svým unikátním chemickým, fyzikálním a biologickým vlastnostem. Zmíněné vlastnosti závisí na typu nanočástic (Ag, Au, Cu...), velikosti a jejich tvaru, které lze do značné míry ovlivnit výběrem metody syntézy a vhodným nastavením reakčních podmínek. Jedním ze zajímavých přístupů pro syntézu nanočástic kovů je použití rostlinných extraktů. V tomto případě lze průběh syntézy ovlivnit širokou škálou parametrů – původ extraktu, typ kovového prekursoru, reakční teplota, doba reakce, hodnota pH, tlak, přístup záření a dalších. Tato práce se zabývá syntézou nanočástic stříbra pomocí extraktu z letorostů *Vitis vinifera* a sledováním vlivu hodnoty pH reakční směsi na morfologii vznikajících nanočástic. Pozorování probíhalo v rozmezí hodnot pH 3,5-9,0 za neměnných zbývajících parametrů syntézy. Charakterizace vznikajících nanočástic probíhala pomocí UV-Vis absorpční analýzy a transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Bylo zjištěno, že manipulací s hodnotou pH prostředí lze při syntéze pomocí extraktu *V. vinifera* racionálně manipulovat s velikostí vznikajících nanočástic stříbra.

Abstract

Metal nanoparticles attract the attention of the scientific and commercial spheres due to their unique chemical, physical, and biological properties. These properties depend on the type of nanoparticles (Ag, Au, Cu...), their size, and their shape. The morphology of nanoparticles could be influenced to a large extent by the choice of the synthesis method and by the appropriate setting of the reaction conditions. One of the interesting approaches for the synthesis of metal nanoparticles is the use of plant extracts. In this case, the course of the synthesis can be influenced by a wide range of parameters – the origin of the extract, the type of metal precursor, the reaction temperature, the reaction time, pH value, pressure, access to the radiation source and others. This work deals with the synthesis of silver nanoparticles using an extract from *Vitis vinifera* plant and monitoring the effect of the pH value of the reaction mixture on the morphology of the resulting nanoparticles. The observations occurred in the range of pH values 3.5-9.0 when the remaining synthesis parameters stayed unchanged.

Characterization of the resulting nanoparticles was performed using UV-Vis absorption analysis and transmission electron microscopy (TEM). It has been found that by manipulating the pH of the mixture, the size of the resulting silver nanoparticles can be rationally manipulated.

Klíčová slova

Stříbro, nanočástice, rostlinné extrakt, reakční podmínky, pH

Keywords

Silver, nanoparticles, plant extract, reaction conditions, pH

Úvod

Stříbro patří mezi jedny nejvíce zkoumaných a nejvíce komercializovaných nanomateriálů posledních let. Pozornost obchodní sféry si stříbrné nanomateriály získaly svými vlastnostmi jako jsou vodivost nebo katalytická a antibakteriální aktivita (Marciniak a kol., 2020). Nárůst aplikací těchto materiálů vede k zamyšlení nad tím, jakým způsobem jsou a v budoucnu budou vyráběny. Jedním z mnoha možných postupů pro přípravu nanočástic stříbra je syntéza pomocí rostlinných extraktů. Tento typ syntézy je mnohými považován za velmi perspektivní, díky několika výhodám jako je rychlost syntézy, jednoduchost provedení, snadný scale-up a velmi snadná manipulace s reakčními podmínkami (např. ve srovnání s mikrobiální syntézou). Právě snadná manipulace s reakčními podmínkami je zásadní výhodou použití rostlinných extraktů, jelikož změnou určitých parametrů syntézy můžeme do značné míry ovlivnit velikost a tvar vznikajících nanočástic a s tím související vlastnosti, které činí nanočástice tak zajímavé pro jednotlivé aplikace. Mezi hlavní parametry syntézy, které ovlivňují morfologii nanočástic patří původ a koncentrace rostlinného extraktu, koncentrace prekursoru kovu, poměr a pořadí přidávání jednotlivých výchozích látek, teplota, hodnota pH, reakční doba, nebo například přístup záření (Mittal a kol., 2013; Borase a kol., 2014). Obvyklý postup přípravy nanočástic kovů pomocí rostlinných extraktů je jednoduchý a zahrnuje smíchání prekursoru kovu s extraktem z dané rostliny při pokojové teplotě (Mittal a kol., 2013). Mechanismus syntézy spočívá v redukci kovových iontů pomocí biomolekul přítomných v extraktu a následné stabilizaci, taktéž pomocí biomolekul (Borase a kol., 2014).

V této práci jsme se zaměřili na přípravu nanočástic stříbra pomocí extraktu z *Vitis vinifera* a na sledování vlivu změny hodnoty pH na velikost vznikajících částic. Právě pH reakční směsi je důležitým parametrem rostlinné biosyntézy nanočástic a mnoha studiemi bylo potvrzeno, že má vliv jak na rychlost reakce, tak na velikost, tvar a stabilitu vznikajících nanočástic (Borase a kol., 2014). To je dáno zvýšenou tvorbou nukleačních center spolu

s rostoucím pH. Zároveň je hodnotou pH ovlivněna aktivita biomolekul podílejících se na redukci a stabilizaci nanočástic (Vijayaraghavan a Ashokkumar, 2017). Při zvýšeném pH dochází k ionizaci funkčních skupin biomolekul extraktu a ty jsou tak přístupné pro reakci, proto zvýšení pH vede k syntéze menších a stabilnějších nanočástic. Naopak snížení pH reakční směsi vede ke vzniku větších částic, kdy proces agregace převládá nad nukleací (Borase a kol., 2014).

Materiál a metodika

Extrakce letorostů *V. vinifera*

Nejprve byly usušené zdřevnatělé letorosty *Vitis vinifera* homogenizovány pomocí laboratorního mixéru. Následně byly homogenizované letorosty extrahovány do 40% ethanolu (150 g letorostů na 600 ml rozpouštědla). Směs byla ponechána v temnu při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Následně byl vytvořený extrakt zfiltrován přes filtr o velikost pórů 0,22 µm.

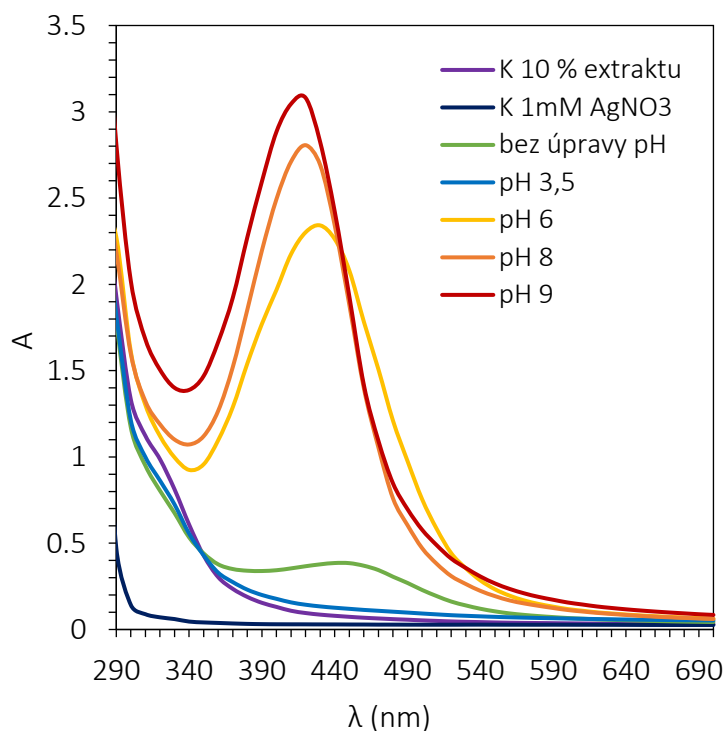
Syntéza nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra byly připravovány smícháním 10 % v/v extraktu z letorostů *V. vinifera* s destilovanou vodou a 10mM roztokem dusičnanu stříbrného (AgNO_3) tak, aby jeho výsledná koncentrace v reakční směsi činila 1 mM. Pořadí přidávání výchozích látek bylo následující: rostlinný extrakt, destilovaná voda, prekursor kovu. Bezprostředně po smíchání jednotlivých reagentů bylo u vybraných vzorků upraveno pH na hodnoty v rozmezí 3,5-9,0. Hodnota pH byla upravována pomocí přídavku příslušné kyseliny a báze (10% kyselina octová respektive 1% hydroxid sodný). Reakce probíhala při laboratorní teplotě, normálním tlaku a v temnu po dobu 1 týdne. Po uplynutí 1 týdne byla u vzorků proměřena absorpce v UV-Vis oblasti záření pomocí readru TECAN. Vybrané vzorky byly dále charakterizovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie uskutečňované v Centrálních laboratořích VŠCHT Praha.

Výsledky a diskuze

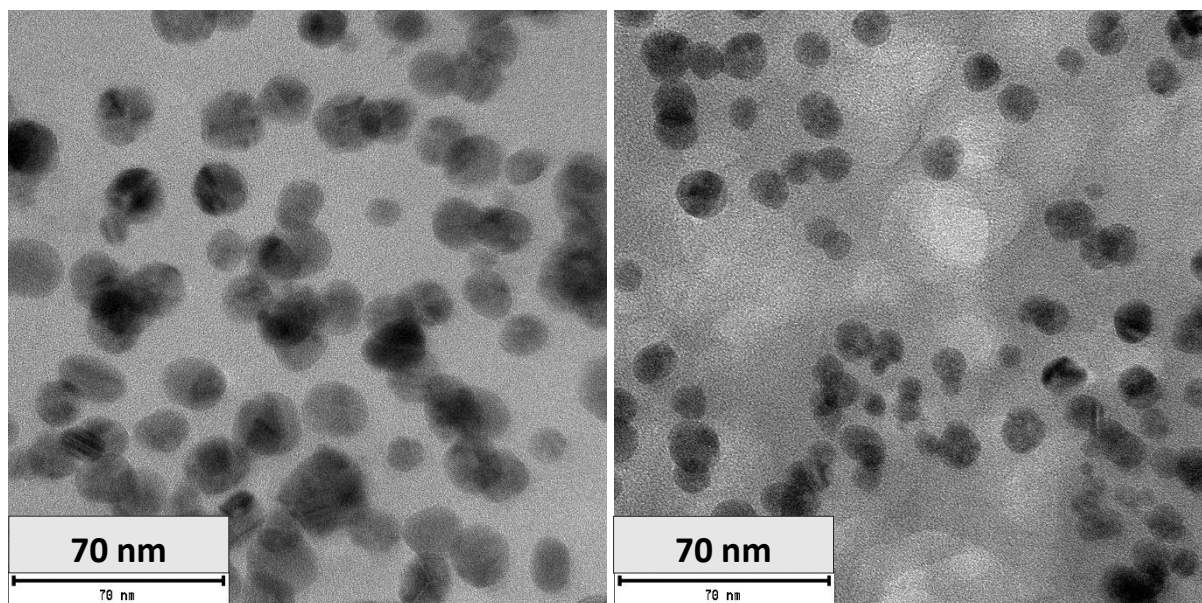
Efekt pH na syntézu nanočástic stříbra pomocí extraktu *V. vinifera* bylo možné spatřit pouhým okem, kdy při zvyšování pH bylo do několika minut možné pozorovat změnu barvy směsi ze světle hnědé na tmavě žluto-hnědou. Co se týká vzorku, u kterého neproběhla úprava pH, zde bylo možné zaznamenat mírnou změnu barvy až v řádu několika dní. U posledního vzorku, kde došlo k okyselení, nebyla ani po týdnu zaznamenána změna zabarvení reakční směsi. Dále byla u všech vzorků změřena absorpce v UV-Vis oblasti (Obr. 1). Přítomnost absorpčního pásu pozorovatelná u vzorků se zvýšeným pH a u vzorku bez úpravy pH je

charakteristická pro výskyt nanočástic stříbra (Mittal a kol., 2013). Naopak u vzorku se sníženým pH nebyla absorpce v charakteristických vlnových délkách vůbec pozorována. Tento výsledek může být spojen s velmi nízkou aktivitou bioaktivních molekul extraktu, které byly v důsledku nízké hodnoty pH deionizovány a nedocházelo tak zřejmě vůbec k redukci iontů stříbra a vzniku nanočástic. S podobnými výsledky se můžeme setkat také v literatuře. Například ve studii, kde byl pro syntézu nanočástic stříbra použitý extrakt z *Phoenix dactylifera* L., při pH 3 obdobně nedocházelo ke vzniku nanočástic stříbra (Aitenneite a kol., 2016). Z analýzy absorpce v UV-Vis bylo dále potvrzeno, že se zvyšující se hodnotou pH dochází k syntéze menších částic. To vyplývá z mírného posunu absorpčního maxima do nižších vlnových délek se zvyšujícím se pH ($A_{\max}(\text{pH } 6) = 430 \text{ nm}$, $A_{\max}(\text{pH } 8) = 420 \text{ nm}$). Pro nanočástice stříbra je totiž typické, že vrchol peaku odpovídá jejich velikosti, kdy u malých částic leží v nižších vlnových délkách a naopak (Mukherji a kol., 2018).



Obr. 1 Efekt pH na absorpci jednotlivých vzorků stříbrných nanočástic v UV-Vis oblasti

Dále byly vybrané vzorky (pH 6 a pH 8) pozorovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (Obr. 2). Také pomocí této charakterizační techniky bylo potvrzeno, že při vyšší hodnotě pH vznikaly nanočástice s větším průměrem. Zatímco při pH 8 měla většina částic průměr v rozmezí 4-16 nm při pH 6 ležel průměr většiny nanočástic v rozmezí 12-30 nm. Tvar syntetizovaných nanočástic byl v obou vzorcích sférický.



Obr. 2 TEM obraz nanočástic stříbra připravených při různých hodnotách pH reakční směsi – vlevo pH 6, vpravo pH 8

Závěr

Práce byla zaměřena na studium vlivu změny reakčních podmínek na výslednou morfologii nanočástic stříbra připravovaných pomocí rostlinného extraktu. Jako sledovaný proměnlivý parametr byla zvolena hodnota pH, přičemž ostatní podmínky biosyntézy byly při veškerých experimentech zachovány neměnné. Výsledky ukázaly, že úpravou hodnoty pH lze kontrolovaně manipulovat s velikostí vznikajících nanočástic. Zatímco při zvyšování hodnot pH docházelo ke snižování velikosti nanočástic, při nejnižší zvolené hodnotě pH 3,5 k syntéze nanočástic vůbec nedocházelo. Jev souvisí se stupněm ionizace biomolekul extraktu, které se účastní redukce a stabilizace nanočástic pouze v ionizované formě.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2021_011

Literatura

Aitenneite H., Abboud Y., Tanane O., Solhy A., Sebti S., El Bouari A. (2016) Rapid and green microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using aqueous *Phoenix dactylifera* L.(date palm) leaf extract and their catalytic activity for 4-nitrophenol reduction. Journal of Materials and Environmental Science, 7, str. 2335-2339.

Borase H. P., Salunke B. K., Salunkhe R. B., Patil C. D., Hallsworth J. E., Kim B. S., Patil S. V. (2014) Plant extract: A promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173, str. 1-29.

Marciniak L., Nowak M., Trojanowska A., Tylkowski B., Jastrzab R. (2020) The effect of pH on the size of silver nanoparticles obtained in the reduction reaction with citric and malic acids. *Materials*, 13, str. 5444.

Mittal A. K., Chisti Y., Banerjee U. C. (2013) Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31, str. 346-356.

Mukherji S., Bharti S., Shukla G., Mukherji S. (2018) Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. *Physical Sciences Reviews*, 4, str. 20170082.

Vijayaraghavan K., Ashokkumar T. (2017) Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. *Journal of environmental chemical engineering*, 5, str. 4866-4883.

Role střevního mikrobiomu v onemocnění Gut microbiota and its role in diseases

T. T. M. Nguyenová^{1, 2}, M. Kuzma², I. Kolouchová¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha,

²Mikrobiologický ústav AV ČR

Abstrakt

Střevní mikroflóra (mikrobiom, mikrobiota) se účastní obousměrné komunikace mezi střevem a mozkem a podílí se na správném fungování různých procesů v lidském organismu. Mikroorganismy sídlící ve střevě (patogenní a příznivé bakterie, viry či archea) by měly být v rovnováze a vytvářet fungující mikroekosystém. Pokud se zastoupení, množství a poměr těchto mikroorganismů změní, dochází ke vzniku dysbiosy, která může vést ke zvýšené permeabilitě střevní a hematoencefalické bariéry. Mikrobiální produkty tak mohou přecházet ze střeva do krve a do orgánů, a tak ovlivňovat jejich funkce.

Abstract

The intestinal microflora (microbiome, microbiota) participates in the bidirectional communication between the gut and the brain and contributes to the proper functioning of many processes in the human body. Intestinal microorganisms (pathogenic and beneficial bacteria, viruses, or archaea) should be in balance and create a functioning microecosystem. If the representation, amount, and proportion of these microorganisms change, it causes a phenomenon named dysbiosis, which can lead to increased intestinal and blood-brain barrier permeability. Microbial products can penetrate from the gut to the blood and other organs, influencing their function.

Klíčová slova: střevní mikrobiom, dysbiosis, obezita, Alzheimerova choroba, neurodegenerace

Keywords: gut microbiome, dysbiosis, obesity, Alzheimer's disease, neurodegeneration

Střevní mikroflóra

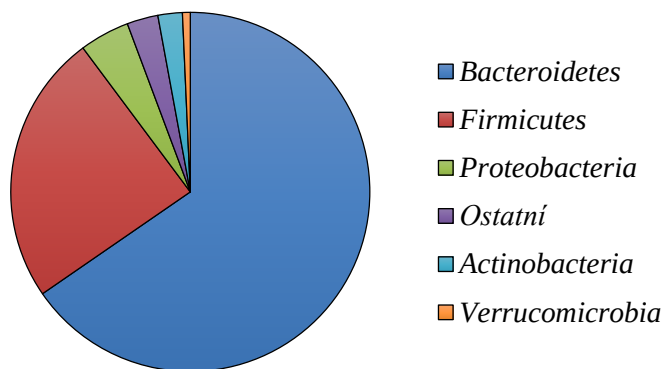
Mikrobiota je společenství mikroorganismů (bakterie, archea, viry, některé jednobuněčné eukaryoty) žijící v určitém prostředí. Mikrobiomem je označován soubor všech mikroorganismů a jejich genů (D'Argenio a Salvatore, 2015). Lidská střevní mikrobiota se skládá z 10^{14} mikroorganismů, a jedná se především o bakterie z kmene *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Obr. 1) (Shin a kol., 2015; Dhar a Mohanty, 2020). Mikroflóra získává od hostitele

výživu, a naopak se podílí na různých fyziologických procesech, (trávení, ochrana před patogeny) (Dhar a Mohanty, 2020). Střevní mikroflóra má schopnost kódovat proteiny vykonávající důležité role v lidském těle, jako jsou enzymy potřebné k trávení nestravitelných složek potravy či k syntéze vitamínů. V důsledku toho jsou v lidském těle přítomny dva genomy, jeden zděděný po rodičích a druhý patřící mikrobiomu. Zděděný genom je víceméně stabilní po celý život, zatímco genom mikrobiomu je proměnlivý (D'Argenio a Salvatore, 2015).

Mikrobiální kolonizace nastává během narození a v průběhu raného dětství se dynamicky mění v závislosti na stravě (Koenig a kol., 2011). Složení mikrobiomu bývá u dospělých jedinců takřka stabilní, značné rozdíly byly ale zaznamenány u starších osob (Claesson a kol., 2011). Tyto odlišnosti jsou spojovány například s rozvojem různých gastrointestinálních a metabolických chorob jako je chronický střevní zánět, obezita, diabetes či insulinová rezistence (Vogt a kol., 2017).

Dysbiosu lze definovat jako stav charakterizovaný kvantitativními a kvalitativními změnami ve složení střevního mikrobiomu, které mohou negativně ovlivnit stav hostitelského organismu. Kvantitativní změny spočívají v menším zastoupení prospěšných mikroorganismů a kvalitativní v jejich nižší diverzitě (Hawrelak a Myers, 2004). Dysbiosu může být způsobena antibiotiky, nebo také stravovacím stylem (kouření, alkohol) dále stresem či genetikou (Sharma a kol., 2021). Při narušení rovnováhy v mikrobiomu může vznikající dysbiosu přispívat k zánětu, a to z důsledku snížení protizánětlivých bakteriálních populací (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), nadbytečné produkce toxických látek nebo zvýšenou permeabilitou hematoencefalické a střevní bariéry, která může vést k penetraci mikrobiálních produktů ze střeva do krve a do mozku (Brown, 2019; Friedland a Chapman, 2017; Mayer a Tillisch, 2011).

Studium mikrobiomu a jeho interakcí s hostitelem, zejména s ohledem na možný podíl na etiologii a patogenezi celé řady onemocnění je předmětem velkého vědeckého zájmu. V letech 2013-2017 bylo studiu střevní mikrobioty věnováno přes 12 tisíc publikací, což představuje více než 80 % celkových publikací o tomto tématu za posledních 40 let (od roku 1977) (Cani, 2018). Obnovení složení střevního mikrobiomu by mohlo významně zpomalit například progresi neurodegenerace, a to vlivem potlačení zánětlivých reakcí a snížení tvorby amyloidních plaků (Sochocka a kol., 2019).



Obr. 1: Relativní zastoupení bakteriálních kmenů v lidském střevě (*Bacteroidetes* 65,4 %; *Firmicutes* 24,4 %; *Proteobacteria* 4,5 %; *Actinobacteria* 2,2 %; *Verrucomicrobia* 0,7 %; ostatní 2,8 %). Upraveno podle Shin a kol., 2015.

Osa střevo-mozek

Obousměrná komunikace mezi centrálním nervovým systémem a gastrointestinálním traktem je zajištěna prostřednictvím cytokinových, imunologických, hormonálních a neuronálních signálů (Sochocka a kol., 2019). Mikroorganismy přispívají ke zdraví hostitele prostřednictvím biosyntézy vitamínů, esenciálních aminokyselin, a také vytvářením důležitých metabolických produktů z nestravitelných složek stravy (Bäckhed a kol., 2005). Bakteriální kmeny mohou produkovat různé neuroaktivní molekuly jako je kyselina kynurenová či neurotransmitery (catecholaminy, serotonin, kyselina γ -aminomáselná, histamin, acetylcholin) (Strawitz, 2018; Sochocka a kol., 2019).

Klíčovou signální molekulou v této ose zastává serotonin, který je syntetizován z tryptofanu. Mikroorganismy mají schopnost podporovat biosyntézu serotoninu a regulovat permeabilitu hematoencefalické bariéry, čímž je modulována distribuce tohoto neurotransmiteru v centrální nervové soustavě (Mastrokolias a kol., 2016).

Grampozitivní střevní bakterie mohou produkovat mastné kyseliny s krátkým řetězcem (butyrát, propionát a acetát, SCFA) (Shin a kol., 2015). Tyto látky působí nejen jako hlavní zdroj energie pro buňky střevního epitelu, které mohou posilovat slizniční bariéru (Topping a Clifton, 2001), ale mají také regulační účinky při zánětu tlustého střeva (Wilson a kol., 2020) dále regulují hladinu lipidů v séru, procházejí hematoencefalickou bariérou a působí protizánětlivě v mozku (Pistollato a kol., 2016).

Osa střevo-plíce

Endotoxiny a mikrobiální metabolity přenášené krví mohou ovlivnit zdraví plic. Zánět v plicích může naopak mít vliv na strukturu střevní mikroflóry (Dumas a kol., 2018). Zatímco ve střevech převládají *Bacteroidetes* a *Firmicutes*, v plicích dominují *Bacteroidetes*, *Firmicutes* a *Proteobacteria* (Zhang a kol., 2020).

Několik studií prokázalo, že respirační infekce jsou spojeny se změnou složení střevní mikrobioty (Groves a kol., 2020). Příkladem může být onemocnění covid-19, které se ve většině případů projeví závažnými klinickými symptomy (pneumonie, syndrom akutní dechové tísně) u starších pacientů s oslabenou imunitou. U tohoto onemocnění nejspíš existuje vzájemná komunikace mezi plicemi a střevní mikroflórou, která by mohla ovlivnit výsledný klinický projev (Dhar a Mohanty, 2020).

Obezita

V posledních letech vzrostla prevalence metabolického syndromu, a to zejména obezity a diabetes mellitus 2. typu. Strava je považována za jeden z nejdůležitějších faktorů formující střevní mikrobiotu. Jelikož se střevní mikroflóra podílí na regulaci energetického metabolismu hostitele, hraje proto významnou roli v patofyziologii obezity (Ley a kol., 2006) a diabetu (Wang a kol., 2012).

Při zkoumání bakteriálních taxonů podílejících se na vývoji obezity, byl zjištěn zvýšený výskyt kmene *Firmicutes* na úkor *Bacteroidetes*. Když obézní jedinci podstoupili dietu po dobu jednoho roku s omezeným příjmem kalorií, došlo k nárůstu *Bacteroidetes* a normalizaci poměru *Firmicutes/Bacteroidetes*, současně se ztratou hmotnosti (de Wit a kol., 2012; Hildebrat a kol., 2009). *Firmicutes* jsou účinnější při získávání energie z potravy a podporují více vstřebávání kalorií než *Bacteroidetes*, a proto může způsobovat následné přibývání na váze (Krajmalnik-Brown a kol., 2012).

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění charakterizované přítomností senilních plaků (extracelulární peptidové agregáty amyloidu beta) a neurofibrilárních klubek (agregovaný tau protein). Pokud není AD způsobena mutacemi v genech, jedná se o sporadickou formu. Obecně se tato forma projevuje u starších lidí (≥ 65 let) a je výsledkem souhry mezi genetickým pozadím a různými faktory, včetně životního stylu, úrovně stresu, chronických onemocnění (kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes mellitus) a životního prostředí (Panegyres a Chen, 2013).

Předpokládá se, že AD úzce souvisí s nerovnováhou střevní mikroflóry (Sochocka a kol., 2019). Dysbiosu u jedinců s Alzheimerovou chorobou byla charakterizována poklesem kmene *Firmicutes*, zvýšením *Bacteroidetes* a snížením přítomnosti rodu *Bifidobacterium* (Vogt a kol., 2017). Rody *Lactobacillus* (kmen *Firmicutes*) a *Bifidobacterium* (kmen *Actinobacteria*) mohou metabolizovat glutamát za vzniku hlavního inhibičního neurotransmiteru – kyseliny γ -aminomáselné (GABA). Změny ve střevní mikroflóře mohou narušit endogenní produkci GABA, která souvisí s poruchami kognitivních funkcí, AD, úzkostí, depresí; anebo také produkci SCFA. Nižší hladiny SCFA mohou negativně ovlivnit glukózovou a energetickou homeostázu v mozku, imunitní odpovědi a případně i fungování centrálního i periferního nervového systému (Pistollato a kol. 2016).

Neurodegenerativní poruchy jsou často spojeny s odchylkami v metabolických drahách souvisejících se syntézou neurotransmiterů, s oxidačním stresem anebo také s mitochondriálními funkcemi, a proto lze analýzou metabolomu monitorovat změny u mnoha biochemických drah a objevit tak biomarkery specifické pro AD (Peng a kol., 2014).

Závěr

Výsledky výzkumu mikrobiomu a jeho interakce s hostitelským organismem ukazují na významnou roli, kterou hraje ve fyziologické funkci orgánů, fungování imunitního systému nebo při vývoji celé řady onemocnění. Narušení složení střevní mikroflóry může vést ke vzniku mnoha chronických chorob od gastrointestinálních zánětlivých onemocnění, přes obezitu a diabetes až po neurologická, kardiovaskulární a respirační onemocnění. V současné době je proto značné úsilí zaměřeno na pochopení molekulárních interakcí mikrobiom-hostitel s cílem najít nové terapeutické metody.

Literatura

- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 307(5717), str. 1915–1920.
- Brown, G.C. (2019) The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *Journal of neuroinflammation*. 16(1), str. 1–10.
- Cani, P.D. (2018) Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. *Gut*. 67(9), str. 1716–1725.
- Claesson, M.J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., De Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., Van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A.P., Shanahan, F., Twomey, C., Hill, C., Ross, R.P., O'Toole, P.W. (2011) Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(SUPPL. 1), str. 4586–4591.

- D'Argenio, V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta*. 451, str. 97–102.
- Dhar, D., Mohanty, A. (2020) Gut microbiota and Covid-19- possible link and implications. *Virus Research*. 10, str. 1–10.
- Dumas, A., Bernard, L., Poquet, Y., Lugo-Villarino, G., Neyrolles, O. (2018) The role of the lung microbiota and the gut–lung axis in respiratory infectious diseases. *Cellular Microbiology*. 20(12), str. 1–9.
- Friedland, R.P., Chapman, M.R. (2017) The role of microbial amyloid in neurodegeneration. *PLoS Pathogens*. 13(12), str. 1–12.
- Groves, H.T., Higham, S.L., Moffatt, M.F., Cox, M.J., Tregoning, J.S. (2020) Respiratory viral infection alters the gut microbiota by inducing inappetence. *mBio*. 11(1).
- Hawrelak, J.A., Myers, S.P. (2004) The causes of intestinal dysbiosis: A review. *Alternative Medicine Review*. 9(2), str. 180–197.
- Hildebrandt, M.A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S.A., Keilbaugh, S.A., Hamady, M., Chen, Y.Y., Knight, R., Ahima, R.S., Bushman, F., Wu, G.D. (2009) High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology*. 137(5), str. 1716–1724.
- Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., Ley, R.E. (2011) Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(SUPPL. 1), str. 4578–4585.
- Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z.E., Kang, D.W., DiBaise, J.K. (2012) Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutrition in Clinical Practice*. 27(2), str. 201–214.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I. (2006) Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 444(7122), str. 1022–1023.
- Mastrokolias, A., Pool, R., Mina, E., Hettne, K.M., van Duijn, E., van der Mast, R.C., van Ommen, G.J., 't Hoen, P.A.C., Prehn, C., Adamski, J., van Roon-Mom, W. (2016) Integration of targeted metabolomics and transcriptomics identifies deregulation of phosphatidylcholine metabolism in Huntington's disease peripheral blood samples. *Metabolomics*. 12(8), str. 1084–1088.
- Mayer, E.A., Tillisch, K. (2011) The brain-gut Axis in abdominal pain syndromes. *Annual Review of Medicine*. 62, str. 381–396.
- Panegyres, P.K., Chen, H.Y. (2013) Differences between early and late onset Alzheimer's disease. *American Journal of Neurodegenerative Diseases*. 2(4), str. 300–306.
- Peng, J., Guo, K., Xia, J., Zhou, J., Yang, J., Westaway, D., Wishart, D.S., Li, L. (2014) Development of isotope labeling liquid chromatography mass spectrometry for mouse urine metabolomics: Quantitative metabolomic study of transgenic mice related to Alzheimer's disease. *Journal of Proteome Research*. 13(10), str. 4457–4469.
- Pistollato, F., Cano, S.S., Elio, I., Vergara, M.M., Giampieri, F., Battino, M. (2016) Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutrition Reviews*. 74(10), str. 624–634.
- Sharma, V.K., Singh, T.G., Garg, N., Dhiman, S., Gupta, S., Rahman, M.H., Najda, A., Walasek-Janusz, M., Kamel, M., Albadrani, G.M., Akhtar, M.F., Saleem, A., Altyar, A.E., Abdel-Daim, M.M. (2021) Dysbiosis and Alzheimer's Disease: A Role for Chronic Stress? *Biomolecules*. 11(5), str. 678–703.

- Shin, N.R., Whon, T.W., Bae, J.W. (2015) Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*. 33(9), str. 496–503.
- Sochocka, M., Donskow-Łysoniewska, K., Diniz, B.S., Kurpas, D., Brzozowska, E., Leszek, J. (2019) The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease—a Critical Review. *Molecular Neurobiology*. 56(3), str. 1841–1851.
- Strandwitz, P. (2018) Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*. 1693, str. 128–133.
- Topping, D.L., Clifton, P.M. (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*. 81(3), str. 1034–1064.
- Vogt, N.M., Kerby, R.L., Dill-McFarland, K.A., Harding, S.J., Merluzzi, A.P., Johnson, S.C., Carlsson, C.M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B.B., Rey, F.E. (2017) Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. 7, str. 1–11.
- Wang, Jun, Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, Shenghui, Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., Lechatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, Songgang, Yang, H., Ehrlich, S.D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K., Wang, Jian (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 490(7418), str. 55–60.
- Wilson, A.S., Koller, K.R., Ramaboli, M.C., Nesengani, L.T., Ocvirk, S., Chen, C., Flanagan, C.A., Sapp, F.R., Merritt, Z.T., Bhatti, F., Thomas, T.K., O'Keefe, S.J.D. (2020) Diet and the Human Gut Microbiome: An International Review. *Digestive Diseases and Sciences*. 65(3), str. 723–740.
- de Wit, N., Derrien, M., Bosch-Vermeulen, H., Oosterink, E., Keshtkar, S., Duval, C., de Vogel-van den Bosch, J., Kleerebezem, M., Müller, M., van der Meer, R. (2012) Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 303(5), str. 589–599.
- Zhang, D., Li, S., Wang, N., Tan, H.Y., Zhang, Z., Feng, Y. (2020) The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases. *Frontiers in Microbiology*. 11, str. 1–17.

Antimikrobní účinky pigmentů houby *Monascus* **Antimicrobial effects of *Monascus* fungus pigments**

M. Plechatá, M. Husáková, P. Patáková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt česky

V této práci byly zkoumány antimikrobní účinky pigmentů tvořených houbami rodu *Monascus*. Tyto sekundární metabolity byly získány etanolovou extrakcí mycelia hub *Monascus*, po kultivaci hub za různých podmínek. Antimikrobní aktivita extraktů obsahující pigmenty byla zkoumána v souvislosti s vlivem na klíčení spor a růst sporotvorných bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Po použití kyselých a neutrálních extraktů mycelia *Monascus purpureus* DBM 4360, u kterých byla zjištěna navíc i přítomnost citrininu, byla pozorována částečná inhibice klíčení spor a růstu buněk v případě *Clostridium beijerinckii* a *Bacillus subtilis*.

Abstrakt anglicky

In this work, the antimicrobial effects of pigments produced by fungi of the genus *Monascus* were investigated. These secondary metabolites were obtained by ethanol extraction of *Monascus* fungal mycelia, after cultivating the fungi under various conditions. The antimicrobial activity of the extracts containing pigments was investigated in connection with the effect on the spore germination and growth of spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* and *Clostridium*. Partial inhibition of spore germination and cell growth was observed in *Clostridium beijerinckii* and *Bacillus subtilis* after the use of acidic and neutral extracts of mycelium *Monascus purpureus* DBM 4360, in which the presence of citrinin was detected.

Klíčová slova česky *Monascus*- pigmenty-antimikrobní účinky-klíčení-spory-bakterie-citrinin

Klíčová slova anglicky *Monascus*- pigments- antimicrobial activity- germination- spores-bacteria- citrinin

1. Úvod

Houby rodu *Monascus* jsou vláknité houby, které již přes tisíc let nacházejí rozličné využití hlavně díky produkci sekundárních metabolitů (Chen a kol., 2015, Jůzlová a kol., 1996, Patáková, 2013). Za své jméno vděčí francouzskému botanikovi Philippe Édouard L. Van

Tieghem, který roku 1884 pojmenoval zástupce z oddělení vřeckovýtrusných hub *Monascus* (Van Tieghem, 1884). Z Asie byl rod *Monascus* rozšířen takřka do celého světa, hlavně díky kultivaci v různých laboratořích. Asijské země jsou známé produkcí tzv. červené fermentované rýže, což je označení pro rýži kultivovanou houbami rodu *Monascus*. Právě díky své barvě je tato houba používána pro produkci pigmentů (žlutých, oranžových a červených). Tyto pigmenty jsou netoxické, mají syté zbarvení a nacházejí uplatnění jak v potravinářství, tak v textilním průmyslu. Biologická aktivita těchto pigmentů byla předmětem mnohých studií. Jak se ukázalo tyto pigmenty mají mimo jiné antioxidační a antimikrobní účinky (Kim a kol., 2006, Kim a Rhyu, 2008, Srianta a kol., 2017, Tan a kol., 2018, Vendruscolo a kol., 2014). Houby rodu *Monascus* produkují i mnohé jiné metabolity např. cholesterol snižující monakoliny, známé též jako lovastatiny, anebo mykotoxin citrinin (Blanc a kol., 1995, Tsukahara a kol., 2009).

Charakteristika rodu *Monascus*

Houby rodu *Monascus* jsou aerobní saprofytické vláknité houby, s teplotním optimem 30-35 °C. Vyžadují nízkou vodní aktivitu substrátu, jsou tedy slabě xerofilní, jsou schopné heterofermentativního kvašení a produkce etanolu i v aerobních podmínkách (De Carvalho a kol., 2006, Patakova, 2013). Rozmnožují se pohlavně i nepohlavně. Při nepohlavním rozmnožování jsou tvořeny jednobuněčné asexuální spory (konidie), pohlavní rozmnožování probíhá prostřednictvím askospor, které jsou umístěny ve vřečkách (kleisthoteciích) (Carels a Shepherd, 1975, Mohan, 2007). V literatuře jsou nejčastěji zmínky o druzích *Monascus purpureus* Went, *M. ruber* van Tieghem, a *M. pilosus* K Sato právě díky produkci již zmiňované červené rýže (Hawksworth a Pitt, 1983, Panda a kol., 2010).

Z metabolitů produkovaných těmito houbami můžeme zmínit například pigmenty, flavonoidy, mastné kyseliny, vitamíny, enzymy, antioxidanty, γ -aminomáselnou kyselinu a monakoliny (Aniya a kol., 2000, Lee a Pan, 2012, Lee a kol., 2006). Někteří zástupci rodu *Monascus* produkují také mykotoxin citrinin. Jedná se o známý nefrotoxin, hepatotoxin, a karcinogen, u kterého byla zjištěna také antimikrobní aktivita (Blanc a kol., 1995, Vesela a kol., 1983). Biosyntéza pigmentů, monakolinů a citrininu je označována jako polyketidová syntéza, která je ovlivněna podmínkami prostředí, enzymovým vybavením daného druhu a genetickou predispozicí (Chen a kol., 2017, Kim a Ku, 2018).

Antimikrobní aktivita pigmentů

Velké množství studií bylo provedeno v souvislosti s antimikrobními účinky pigmentů produkovanými houbami rodu *Monascus*. Např. studie Sun a kol. 2012 prokázala jistou antivirální aktivitu oranžových v případě infekce virem hepatitidy C (Sun a kol., 2012).

Antibakteriální aktivita byla zkoumána na řadě gramnegativních ale i grampozitivních bakterií. Nejčastěji bývá zkoumána antibakteriální aktivita oranžových a červených pigmentů vůči gramnegativní *E. coli* (Guo-Ping a kol., 2016, Qunyi, 1997, Vendruscolo a kol., 2014). Antibakteriální aktivita byla prokázána i na grampozitivních bakteriích rodu *Bacillus* nebo vůči *Staphylococcus aureus* (Mao a kol., 2006, Qunyi, 1997, Ungureanu a Ferdes, 2010, Vendruscolo a kol., 2014, Xu, 2011).

2. Materiál a metody

Složení médií

Pro submerzní kultivaci *Monascus purpureus* DBM 4360 byly využity tři kultivační média (A, N, P) obsahující 40 g/l glukózy, 4 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l KCl, 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Pro médium A bylo zdrojem dusíku 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a hodnota pH byla upravena na 5,5; médium N obsahovalo 6,44 g/l NaNO_3 a hodnota pH byla upravena na 6,5; médium P obsahovalo 8,84 g/l peptonu a hodnota pH byla upravena na 2,5.

Složení médií bylo navrženo podle předchozích experimentů v laboratoři (Patrovsky a kol., 2019).

Média pro kultivaci *Bacillus subtilis* DBM 3006 byla následující: LB médium složené z 5 g/l kvasničného extraktu, 10 g/l tryptonu a 10 g NaCl .

Ke kultivaci bakterií *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 bylo vybráno RCM agar, který byl připravený podle návodu výrobce a P2 médium, jehož složení ukazuje Tabulka I. Roztok 1 byl sterilován tepelně (121 °C, 20 minut), roztoky 2,3,4 byly sterilovány filtrací.

Tabulka I. Složení kultivačního média P2

	<i>Chemikálie</i>	<i>Množství [g/l]</i>
Roztok 1	glukóza	40
	kvasničný extrakt	1
Roztok 2	KH_2PO_4	0,5
	K_2HPO_4	0,5
	octan amonný	4
Roztok 3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1

Roztok 4	NaCl	0,1
	4-aminobenzoová kyselina	0,1
	tiamin	0,1
	biotin	0,001

Pozorování antimikrobních účinků***Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052**

První série pokusů byla zaměřena na účinky kyselých extraktů z mycelia *Monascus purpureus* DBM 4360, které byly získány po kultivace ve třech médiích (A, N, P). Média se lišila zdrojem dusíku a počáteční hodnotou pH. Pro extrakci byl použit 75% etanol s upravenou hodnotou pH na hodnotu 2. Byly vybrány 4 extrakty pro pozorování antimikrobních účinků pomocí agarové difúzní metody a pro stanovení účinků na tepelně aktivované spory *C. beijerinckii*.

Dále byla provedena série pokusů provedených s neutrálními extrakty z mycelia *Monascus purpureus* DBM 4360. Do zkumavek k 5 ml kultivačního P2 média byl dán 1% přídavek extraktu (A, N, P) či extrakčního činidla pro slepý pokus. Inokulum (tepelně aktivované spory, nebo vegetativní buňky) bylo očkováno v množství 500 µl. Kultivace probíhala v anaerobní komoře při 37 °C po 24 hodin. Každý pokus byl proveden ve třech paralelních provedeních. Byla změřena OD hodnota (při 600 nm) po kultivaci v jednotlivých zkumavkách.

***Bacillus subtilis* DBM 3006**

Na první sérii pokusů byly použity neutrální etanolové extrakty z mycelia *Monascus purpureus* DBM 4360, kultivovaného v kapalných médiích. K 5 ml LB média byl do zkumavek přidán 1% přídavek extraktů (A, N, P) či extrakčního činidla pro slepý pokus. Zkumavky byly přes noc inkubovány v termostatu (37 °C) a poté bylo pipetováno 1% inokulum (tepelně aktivované spory nebo vegetativní buňky). Kultivace probíhala na třepáčkách (48 hodin, 37 °C, 100 rpm), každý pokus byl prováděn ve třech paralelách. Byly změřeny OD hodnoty (při 600 nm).

3. Výsledky

Zvolené kyselé extrakty *Monascus purpureus*, využitě v agarové difúzní metodě pro pozorování antimikrobních účinků, dokázaly pouze částečně inhibovat klíčení spor *Clostridium beijerinckii*. Pro experimenty s neutrálními extrakty *Monascus purpureus* přidávanými do kultivačního média v 1 obj. %, byla zjištěna částečná inhibice klíčení spor a částečná inhibice růstu vegetativních buněk *Clostridium beijerinckii* a také částečná inhibice klíčení spor

a částečná inhibice /limitace růstu vegetativních buněk *Bacillus subtilis*. V extraktech z mycelia *M. purpureus* byly pomocí UHPLC stanoveny žluté a oranžové pigmenty a mykotoxin citrinin shrnuto v tabulce II.

Tabulka II. Koncentrace žlutých a oranžových pigmentů a citrininu v získaných extraktech *M. purpureus* DBM 4360; kvantifikační limit byl 0,1 mg/l

Submerzní kultivace probíhala ve tmě na třepačkách (100 rpm, 30 °C), extrakce (1 hod., 75% etanol, třepačky 100 rpm)

EČ	Médium	Den extrakce	Koncentrace mg/l				
			Ankaflavin	Monasci n	Rubropunktat in	Monaskorubr in	Citrini n
pH 2	A	10	101,0	179,3	380,3	405,1	-
	N	10	64,4	137,8	157,7	122,8	1,6
	P	7	65,5	137,6	157,0	122,3	-
		14	41,0	66,6	85,4	113,0	-
neutrální	A	14	8,6	166,3	219,0	132,4	1,4
	N	14	153,3	333,4	291,6	278,1	4,9
	P	14	123,5	322,5	192,0	106,6	0,9

Závěr

Pomocí UHPLC bylo stanoveno množství pigmentů a citrininu v získaných extraktech z mycelia *M. purpureus* DBM 4360. Antimikrobní aktivita získaných extraktů byla testována v souvislosti se sporotvornými bakteriemi a jejich spory. První pokusy s kyselými extrakty *M. purpureus* DBM 4360 obsahující pigmenty i citrinin ukázaly pouze částečnou inhibici klíčení spor *C. beijerinckii* NCIMB 8052. Pro vyloučení vlivu nízké hodnoty pH na klíčení spor byly dále využívány neutrální extrakty. Neutrální etanolové extrakty *M. purpureus* DBM 4360 (směs pigmentů a citrininu), opět dokázaly částečně inhibovat klíčení spor a růst vegetativních buněk v případě *C. beijerinckii* NCIMB 8052. Pro kultivaci *B. subtilis* DBM 3006, bychom mohli hovořit spíše o limitaci klíčení spor a růstu vegetativních buněk. Pro dosažení úplné inhibice klíčení spor a růstu bakterií by bylo vhodné zvolit koncentrovanější extrakty, či zvážit vyšší procentuální přídavky využitých extraktů.

V potravinářském průmyslu jsou spory sporotvorných bakterií velkým problémem (nejznámější tzv. klobásový jed botulotoxin tvořený *C. botulinum*). K zamezení klíčení spor v potravinách, bývají tyto potraviny tzv. vysolovány, do masa jsou navíc přidávány dusitaný (E249) pro stabilizaci barvy. Naše pokusy poukázaly na jistou možnost nahrazení dusitanů a dusičnanů v masném průmyslu právě námi zkoumanými extrakty obsahující pigmenty hub *Monascus*. Pigmenty hub *Monascus* jsou netoxické, a navíc mají mnoho benefičních vlastností na lidské zdraví. Hlídaným parametrem při využití extraktů hub *Monascus* v potravinářství by musela být přítomnost citrininu.

Literatura

- Aniya, Y., Ohtani, I.I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Shimabukuro, M., Nakanishi, H., Taira, J. (2000) Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. *Free Radical Biology and Medicine* 28(6), 999-1004.
- Blanc, P., Loret, M., Goma, G. (1995) Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnology Letters* 17(3), 291-294.
- Carels, M., Shepherd, D. (1975) Sexual reproductive cycle of *Monascus* in submerged shaken culture. *Journal of Bacteriology* 122(1), 288-294.
- De Carvalho, J.C., Pandey, A., Oishi, B.O., Brand, D., Rodriguez-Léon, J.A., Soccol, C.R. (2006) Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 29(3), 262-269.
- Guo-Ping, Z., Ying-Qiu, L., Jie, Y., Kai-Yu, C. (2016) Antibacterial characteristics of orange pigment extracted from *Monascus* pigments against *Escherichia coli*. *Czech Journal of Food Sciences* 34(3), 197-203.
- Hawksworth, D.L., Pitt, J.I. (1983) A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. *Australian Journal of Botany* 31(1), 51-61.
- Chen, G., Shi, K., Song, D., Quan, L., Wu, Z.J.B.b. (2015) The pigment characteristics and productivity shifting in high cell density culture of *Monascus anka* mycelia. *BMC Biotechnology* 15(1), 72.
- Chen, W., Chen, R., Liu, Q., He, Y., He, K., Ding, X., Kang, L., Guo, X., Xie, N., Zhou, Y. (2017) Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *Chemical Science* 8(7), 4917-4925.
- Jůzlová, P., Martinková, L., Křen, V. (1996) Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *Journal of Industrial Microbiology* 16(3), 163-170.
- Kim, C., Jung, H., Kim, Y.O., Shin, C.S. (2006) Antimicrobial activities of amino acid derivatives of *Monascus* pigments. *FEMS Microbiology Letters* 264(1), 117-124.
- Kim, D., Ku, S. (2018) Beneficial effects of *Monascus* sp. KCCM 10093 pigments and derivatives: A mini review. *Molecules* 23(1), 98.
- Kim, E.-Y., Rhyu, M.-R. (2008) Antimicrobial activities of *Monascus koji* extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology* 40(1), 76-81.
- Lee, C.-L., Pan, T.-M. (2012) Development of *Monascus* fermentation technology for high hypolipidemic effect. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94(6), 1449-1459.
- Lee, C.-L., Tsai, T.-Y., Wang, J.-J., Pan, T.-M. (2006) In vivo hypolipidemic effects and safety of low dosage *Monascus* powder in a hamster model of hyperlipidemia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70(5), 533-540.

- Mao, R.-f., Huang, L., Ren, S.-k., WANG, R.-h.** (2006) The study on purification of *Monascus* in red-yeast-rice and its anti-bacterial activity. *JOURNAL-GUANGXI UNIVERSITY NATURAL SCIENCE EDITION* 31(4), 319.
- Mohan, A.D. (2007) Physiology of *Monascus purpureus* in relation to metabolite production and application as functional food, University of Mysore.
- Panda, B.P., Javed, S., Ali, M.** (2010) Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Food and Bioprocess Technology* 3(3), 373-378.
- Patakova, P.** (2013) *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40(2), 169-181.
- Patrovsky, M., Sinovska, K., Branska, B., Patakova, P.** (2019) Effect of initial pH, different nitrogen sources, and cultivation time on the production of yellow or orange *Monascus purpureus* pigments and the mycotoxin citrinin. *Food Science & Nutrition*.
- Qunyi, T.** (1997) Study on antibacterial activity of *Monascus* pigment. *SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY* 5.
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Iuchi, Y., Harijono, H., Yamada, M.** (2017) Antioxidant activity of pigments derived from *Monascus purpureus* fermented rice, corn, and sorghum. *International Food Research Journal* 24(3), 1186-1191.
- Sun, J.-M., Kim, S.-J., Kim, G.-W., Rhee, J.-K., Kim, N.D., Jung, H., Jeun, J., Lee, S.-H., Han, S.H., Shin, C.S.** (2012) Inhibition of hepatitis C virus replication by *Monascus* pigment derivatives that interfere with viral RNA polymerase activity and the mevalonate biosynthesis pathway. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(1), 49-58.
- Tan, H., Xing, Z., Chen, G., Tian, X., Wu, Z.** (2018) Evaluating antitumor and antioxidant activities of yellow *Monascus* pigments from *Monascus ruber* fermentation. *Molecules* 23(12), 3242.
- Tsukahara, M., Shinzato, N., Tamaki, Y., Namihira, T., Matsui, T.** (2009) Red Yeast Rice Fermentation by Selected *Monascus* sp. with Deep-Red Color, Lovastatin Production but No Citrinin, and Effect of Temperature-Shift Cultivation on Lovastatin Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158(2), 476-482.
- Ungureanu, C., Ferdes, M.** (2010) Antibacterial and antifungal activity of red rice obtained from *Monascus purpureus*. *Chemical Engineering Transactions* 20, 223-228.
- Van Tieghem, M.P.** (1884) *Monascus*, genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. *Bulletin de la Société Botanique de France* 31(5), 226-231.
- Vendruscolo, F., Tosin, I., Giachini, A.J., Schmidell, W., Ninow, J.L.** (2014) Antimicrobial Activity of *Monascus* Pigments Produced in Submerged Fermentation. *Journal of Food Processing and Preservation* 38(4), 1860-1865.
- Vesela, D., Veselý, D., Jelinek, R.** (1983) Toxic effects of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, on chicken embryos. *Applied and Environmental Microbiology* 45(1), 91-93.
- Xu, W. (2011) Study on the liquid fermentation to produce *Monascus* pigment with corn starch and antibacteria, pp. 1336-1340, Trans Tech Publ.

Vliv polyfenolových extraktů na zástupce mikroorganismů gastrointestinálního traktu

Effect of polyphenol extracts on the representatives of gastrointestinal tract microorganisms

M. Rollová, O. Maňátková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt česky

Tato práce se zabývá vlivem třech biologicky aktivních látek (*trans*-resveratrolem, extraktem z letorostů *Vitis vinifera* a komerčním přípravkem Regrapex-R-forte) na oportunně patogenní (*Citrobacter freundii* DBM 3127, *Escherichia coli* DBM 3125) a probiotický druh bakterií (*Lactobacillus acidophilus* LA-5), kde tyto vybraní zástupci úzce souvisí s lidským trávicím traktem. Na základě koncentrací *trans*-resveratrolu, byla pro suspenzní populace mikroorganismů stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC80) jednotlivých biologicky aktivních látek. V této práci se podařilo prokázat inhibiční účinek polyfenolových sloučenin, se zaměřením na *trans*-resveratrol, na zástupce oportunně patogenních mikroorganismů, *E. coli* DBM 3125 a *C. freundii* DBM 3127, a zároveň posílení růstu probiotického kmenu *L. acidophilus* LA-5.

Abstrakt anglicky

This study deals with the effect of three biologically active substances (*trans*-resveratrol, extract from *Vitis vinifera* canes and commercial product Regrapex-R-forte) on opportunistic pathogens (*Citrobacter freundii* DBM 3127, *Escherichia coli* DBM 3125) and probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* LA-5) closely related to the human digestive tract. Based on *trans*-resveratrol concentrations in biologically active substances, minimal inhibitory concentrations (MIC80) were determined for populations of microorganisms. In this work, polyphenolic compounds, focusing on *trans*-resveratrol, proved to inhibit the growth of opportunistic pathogenic microorganisms, *E. coli* DBM 3125 and *C. freundii* DBM 3127, while enhancing the growth of the probiotic strain *L. acidophilus* LA-5.

Klíčová slova česky

střevní mikroflóra, polyfenoly, *trans*-resveratrol, *Vitis vinifera*

Klíčová slova anglicky

gut microbiota, polyphenols, *trans*-resveratrol, *Vitis vinifera*

Úvod

Lidské střevo obsahuje velké množství bakteriálních druhů, které jsou součástí mnoha životně důležitých procesů lidského těla. Mikrobiom střev může být ovlivněn různými faktory, vnitřními i vnějšími. Jedním z nejpodstatnějších faktorů je dieta, která má zásadní vliv na druhové a funkční zastoupení mikroorganismů v lidském zažívacím traktu.

Biologická aktivita polyfenolových látek obsažených v potravě a doplňcích stravy může modulovat složení mikroorganismů vyskytujících se v trávicím traktu, a to jak z hlediska jejich zastoupení v rámci střev, tak i působení jednotlivých druhů. Vztah polyfenolů a mikroorganismů střevní mikroflóry je komplikovaný a obousměrný – enzymatická aktivita střevních mikroorganismů je zásadní pro jejich absorpci do těla (Selma a kol., 2009), na druhou stranu polyfenoly mají významnou biologickou aktivitu, a tedy mohou ovlivňovat složení a činnost mikroorganismů (Tsao, 2010).

V posledních letech jsou polyfenolové sloučeniny předmětem rostoucího vědeckého zájmu, zejména díky jejich významné roli v lidské stravě a jejich rozmanitosti potenciálních příznivých účinků, především v podobě doplňků stravy. V současné době je věnována velká pozornost studiu léčebných účinků spojených s rostlinami či rostlinnými extrakty. Využívají se jak extrakty z rostlin, tak extrakty i z jednotlivých rostlinných částí.

Materiál a metody

Použité mikroorganismy

V rámci experimentální práce byly použity dva oportunně patogenní druhy bakterií a jeden probiotický druh bakterie. 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. Všechny použité mikroorganismy byly uchovávány v podobě kryokonzerv v 50% glycerolu při teplotě -70 °C v hlubokomrazícím 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 druh 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.

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 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.

Zásobní roztok komerčně dostupného potravinového doplňku Regrapexu-R-forte obsahuje extrakt z hroznů *Vitis vinifera* a extrakt z kořene *Polygonum cuspidatum*. U tohoto preparátu, je deklarováno množství 9 % *trans-resveratrolu*.

Použitý roztok extraktu ze zimních řezů letorostů *Vitis vinifera* byl připraven v laboratoři na Ústavu Biotechnologie, VŠCHT Praha. Zimní řezy letorostů *Vitis vinifera*, obsahující 730 mg/l *trans-resveratrolu*, byly získány z vinice Grébovka na Praze 2.

Roztoky všech tří biologicky aktivních látek, tedy Regrapexu R-forte, extraktu z letorostů *Vitis vinifera* a čistého *trans-resveratrolu* byly připraveny extrakcí, rozpuštěním či zředěním ve 40% ethanolu.

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 byly zaočkovány z kryokonzervy do 100 ml sterilního LB média. Probiotický druh bakterie z rodu *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* LA-5) byl zaočkován z kryokonzervy do 100 ml sterilního MRS média. Pre-kultivace všech tří zástupců

bakterií probíhala na orbitální třepačce při 150 min^{-1} a teplotě 37°C po dobu 24 h.

Výsledné koncentrace *trans*-resveratrolu pro jednotlivé biologicky aktivní látky, určené pro kultivaci v přístroji Bioscreen C a stanovení minimálních inhibičních koncentrací suspenzních buněk, byly 1, 5, 20, 50, 70, 90, 120 a 150 mg/l. Kultivace za účelem stanovení suspenzního růstu pro *E. coli* DBM 3125, *C. freundii* DBM 3127 a *L. acidophilus* LA-5 probíhala v mikrokultivačním zařízení Bioscreen C při teplotě 37°C po dobu 24 h.

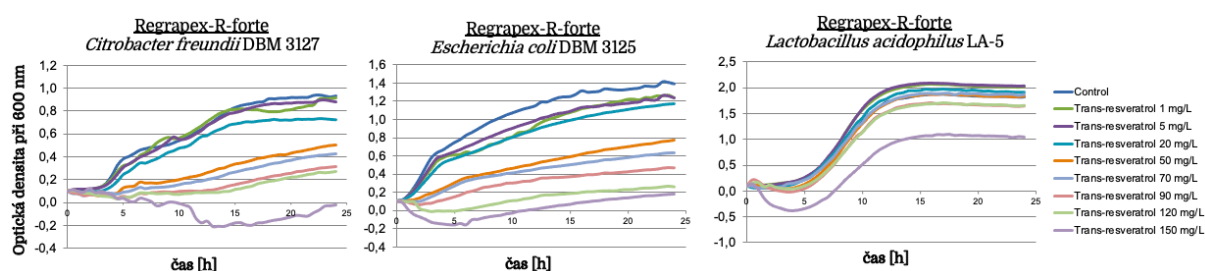
Sledování suspenzního růstu v přítomnosti biologicky aktivní látky a stanovení MIC80

Po 24hodinové kultivaci mikroorganismů bylo inokulum odstředěno (10 min, 10°C , 9000 g) a následně byla pomocí komplexního média upravena jeho optická densita (OD) na hodnotu $\text{OD}_{600} = 0,100 \pm 0,015$. Do každé jamky mikrotitrační destičky (Honeycomb, UK) bylo pipetováno 30 μl takto upravené suspenze inokula. Roztoky biologicky aktivních látek byly přidávány v takovém množství, aby v jednotlivých jamkách bylo dosaženo požadované koncentrace *trans*-resveratrolu. Koncentrace rozpouštědla (40% ethanol) v jamce přitom nesměla překročit 3 %, 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. Jamky byly poté sterilním komplexním médiem doplněny na požadovaný finální objem 320 μl . Všechny experimenty probíhaly v pěti paralelách. Získané výsledky byly znázorněny graficky jako závislosti hodnoty optické density OD_{600} na čase, vyjadřující růstové křivky mikroorganismů. V porovnání s kontrolním vzorkem, neobsahujícím sledované biologicky aktivní látky, byla určena minimální inhibiční koncentrace pro jednotlivé mikroorganismy (MIC80), tj. nejnižší koncentrace, při které dochází po 24 hodinách k inhibici růstu mikroorganismu o více než o 80 % (vztaženo ke kontrole) (Andrews, 2010; Bébéar a Robertson, 1996).

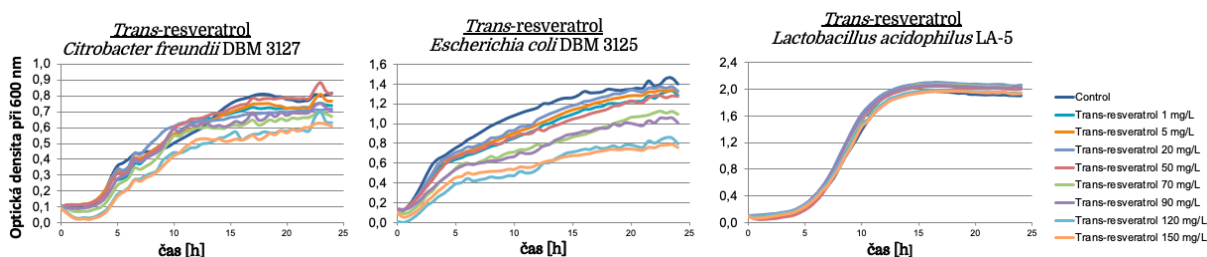
Výsledky

V této práci byly z jednotlivých růstových křivek (obr. 1-3) stanoveny minimální inhibiční koncentrace komerčně dostupného doplňku stravy Regrapexu-R-forte, laboratorně připraveného extraktu ze zimních letorostů *Vitis vinifera* (vztaženy na obsah *trans*-resveratrolu) a čistého *trans*-resveratrolu pro suspenzní buňky vybraných zástupců mikroorganismů (Tab. I). V případě mikroorganismu *L. acidophilus* LA-5 se nepodařilo určit MIC80 při použití Regrapexu-R-forte ani při aplikaci nejvyšší koncentrace 150 mg/l *trans*-resveratrolu. U bakterií

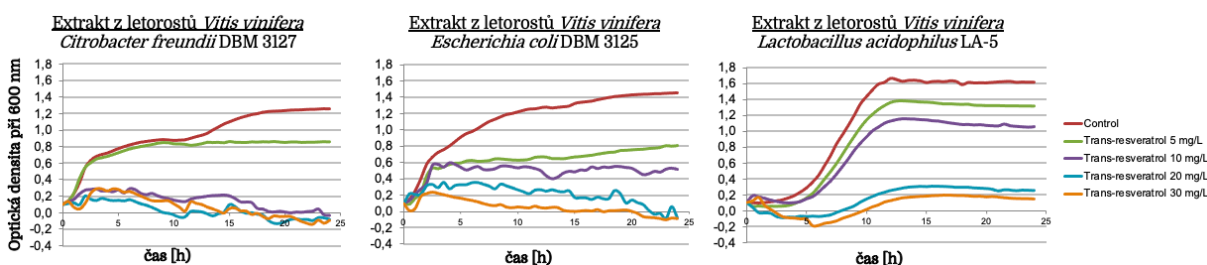
E. coli DBM 3125 byla stanovena MIC80 Regrapexu-R-forte 120 mg/l *trans*-resveratrolu. Nejnižší minimální inhibiční koncentrace MIC80 pro Regrapex-R-forte byla stanovena u *C. freundii* DBM 3127 a to 90 mg/l *trans*-resveratrolu. MIC80 čistého *trans*-resveratrolu nebyla určena v rámci sledovaného koncentračního rozpětí u žádného ze sledovaných mikroorganismů. Při aplikaci extraktu z letorostů *Vitis vinifera* byl zaznamenán výrazný vliv na suspenzní buňky všech bakterií. U všech vybraných zástupců bakterií byla určena MIC80 pro jednotlivé antimikrobiální agens. U bakterie *C. freundii* DBM 3127 extrakt *Vitis vinifera* inhiboval růst nad 80 % již při koncentraci 10 mg/l *trans*-resveratrolu.



Obr. 1 Vliv extraktu komerčně dostupného Regrapex-R-forte na bakteriální růst *C. freundii* DBM 3127, *E. coli* DBM 3125 a *L. acidophilus* LA-5 v suspenzi; kultivace po dobu 24 hodin, při 37 ° C, 150 min⁻¹, mikrokultivační zařízení Bioscreen C.



Obr. 2 Vliv čistého *trans*-resveratrolu na bakteriální růst *C. freundii* DBM 3127, *E. coli* DBM 3125 a *L. acidophilus* LA-5 v suspenzi; kultivace po dobu 24 hodin, při 37 ° C, 150 min⁻¹, mikrokultivační zařízení Bioscreen C.



Obr. 3 Vliv laboratorně připraveného extraktu z letorostů *Vitis Vinifera* na bakteriální růst *C. freundii* DBM 3127, *E. coli* DBM 3125 a *L. acidophilus* LA-5 v suspenzi; kultivace po dobu 24 hodin, při 37 ° C, 150 min⁻¹, mikrokultivační zařízení Bioscreen C.

Tab. I Stanovení MIC80 komerčního extraktu Regrapex-R-forte, *trans*-resveratrolu a laboratorně připraveného extraktu z letorostů *Vitis Vinifera* (vztaženo na *trans*-resveratrol) pro suspenzní růst, *C. freundii* DBM 3127, *E. coli* DBM 3125 a *L. acidophilus* LA-5.

MIC80 [mg/L] vztaženo k obsahu <i>trans</i> -resveratrolu	Mikroorganismy		
	<i>Citrobacter freundii</i> DBM 3127	<i>Escherichia coli</i> DBM 3125	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5
Regrapex-R-forte	90	120	> 150
<i>Trans</i> -resveratrol	> 150	> 150	> 150
Extrakt z letorostů <i>Vitis vinifera</i>	10	20	20

Závěr

V této studii bylo prokázáno, že laboratorně připravený extrakt z letorostů *Vitis vinifera* účinně inhiboval růst oportunně patogenních bakteriálních kmenů (*C. freundii* DBM 3127 a *E. coli* DBM 3125) a má podobné antimikrobiální vlastnosti proti vybraným oportunním bakteriálním patogenům jako komerčně dostupný doplněk stravy, který byl obohacen o obsah certifikovaného množství komplexu *trans*-resveratrolu. Oba polyfenolové extrakty byly schopny ovlivnit růst vybraných mikroorganismů. Regrapex-R-forte a extrakt z letorostů *Vitis vinifera* byly z hlediska antimikrobiální aktivity mnohem účinnější než čistý *trans*-resveratrol.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2021_048.

Literatura

- Andrews J.M. (2010) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, str. 5–16.
- Bébéar, C., Robertson, J.A. (1996) Determination of minimal inhibitory concentration. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology* 2, str. 189-197.
- Gharwalova L., Hutar D., Masak J., Kolouchova I. (2018): Antioxidant activity and phenolic content of organic and conventional vine cane extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 36, str. 289–295.

Selma M. V., Espín J. C. a Tomás-Barberán F. A. (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15), str. 6485-6501.

Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2 (12), str. 1231-1246.

Mikroorganismy a oxidativní stres – působení na buňky a mechanismy adaptace

Microorganisms and oxidative damage – effects on cells and defence mechanisms

E. Timkina, O. Maťátková, I. Kolouchová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt česky

Mikroorganismy jsou různou měrou ovlivněny působením oxidativního stresu, který může být vyvolán reaktivními formami kyslíku, dusíku nebo chloru. Oxidativní stres vyvolává například vysoká intenzita UV záření či radionuklidy, nízká aktivita vody nebo prostředí makrofágů. Vysoká intenzita ionizujícího záření způsobuje četná poškození molekul DNA a RNA, ale především vyvolává hydrolýzu molekul vody za vzniku hydroxylových radikálů ($\text{OH}\cdot$), superoxidových aniontů ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a peroxidu vodíku (H_2O_2). Tyto částečně redukované reaktivní formy kyslíku (ROS) poškozují rozmanité biologické molekuly a způsobují buněčnou smrt. Radiorezistentní mikroorganismy disponují mechanismy detoxifikace ROS, které umožňují zachování životaschopnosti i ve vysoce nepříznivých životních podmínkách. Jedná se například o zvýšení vnitrobuněčného poměru Mn:Fe za účelem snížení intenzity Fentonovy reakce, produkci enzymatických či neenzymatických antioxidantů...

Abstrakt anglicky

The life of many microorganisms is affected by the presence of reactive forms of oxygen, nitrogen, or chlorine, which cause oxidative stress. Oxidative stress can affect cells in an environment hostile to bacteria, for example, in the presence of high levels of UV radiation or radionuclides, low water activity, or macrophages. Ionizing radiation causes numerous damages to DNA and RNA molecules at high intensity, but mainly it causes hydrolysis of water molecules to form hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$), superoxide anions ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). These partially reduced reactive oxygen species (ROS) damage a variety of biological molecules and cause cell death. Radioresistant microorganisms have developed mechanisms of detoxification of ROS and thus maintaining viability. These include increasing the intracellular Mn: Fe ratio to reduce the intensity of the Fenton reaction, the production of enzymatic or non-enzymatic antioxidants, and so on.

Klíčová slova:

Oxidativní stres, reaktivní formy kyslíku, ionizující záření, Fentonova reakce, karotenoidy

Key words

Oxidative stress, reactive oxygen species, ionizing radiation, Fenton reaction, carotenoids

Úvod

Rozmanité ekosystémy, včetně vysoce extrémních lokalit, vyskytující se na Zemi jsou obývány množstvím eukaryotních a prokaryotních mikroorganismů. Mezi extrémní podmínky pro život mikroorganismů se řadí vysoký tlak a salinita, extrémně vysoké nebo nízké pH, extrémně nízké či vysoké teploty, nízká aktivita vody a intenzivní UV nebo ionizující záření. V takovýchto extrémních podmínkách lze nalézt překvapivě široké spektrum extrémofilních mikroorganismů. Mezi nejzajímavější mikroorganismy schopné žít v prostředí ionizujícího záření patří bacteria a archaea. Většina radiorezistentních mikroorganismů má zvýšenou odolnost i na některé další abiotické faktory, například vysoké teploty nebo vysychání. Takové mikroorganismy patří do skupiny polyextremofilů (Pavlopoulou, Savva et al. 2016).

Částečně redukované reaktivní formy kyslíku (ROS), včetně superoxidových aniontů ($O_2^{\bullet -}$), peroxidu vodíku (H_2O_2) a hydroxylových radikálů ($OH^{\bullet}$), které mohou poškodit buňky a způsobit jejich smrt, vznikají také přijmutím elektronů molekulou kyslíku (O_2). Velké množství zejména ROS, reaktivních forem dusíku (RNS) a reaktivní druhy chloru (RCS) vzniká v extrémních typech prostředí. Oxidační stres doprovází život mikroorganismů v rozmanitých lokalitách. V literatuře jsou popsány vysoce odolné izoláty získané z pouštní půdy, vysokohorských jezer, lidských fagocytů či barelů s radioaktivním odpadem. Ve výše popsaných extrémních lokalitách jsou schopné žít a prospívat pouze specifické mikroorganismy. UV záření, rozpad radionuklidů, vysychání či obranné mechanismy imunitního systému člověka mají podobné dopady na vitalitu bakteriálních buněk a jsou aktivovány i podobné mechanismy ochrany buněk (Gordon and Read 2002, Pavlopoulou, Savva et al. 2016, Rasuk, Ferrer et al. 2017).

Známým lidským patogenem je fakultativně intracelulární bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, která vyvinula široké spektrum mechanismů pro přežití a replikaci uvnitř fagocytů hostitele. Fagocyty bojují proti infekci zvýšením oxidačního stresu, hlavně přes generaci reaktivních forem kyslíku a dusíku, které mají za cíl poškodit biomakromolekuly. Podobně působí i ionizující záření. Ukazuje se, že mutantní kmeny *M. tuberculosis*, deficientní na antioxidační enzymy, vykazují mnohonásobně nižší virulenci, než kmeny s aktivním systémem detoxifikace (Gordon and Read 2002, Ng, Cox et al. 2004).

Odolné mikroorganismy k působení stresových faktorů se nalézají i v místech s vysokou zátěží radionuklidů. Jedná se například o prostředí jaderných reaktorů a míst spojených se shromažďováním s nimi spojených odpadů. Jedním z takových míst je Savannah River Site (USA), kde v současné době probíhá skladování a zpracování radioaktivních odpadů. Práce Phillips a kol, 2002, popisuje izolaci bakteriálního izolátu číslo SRS30216^T ze vzorku odebraného z nádoby s radioaktivními odpady ve zmíněné lokalitě. Genetická analýza ukázala nejbližší schodu s rodem *Kineococcus* z kmene *Actinobacteria*, následně nový izolát byl pojmenován *Kineococcus radiodurans*. Bakteriální kolonie měly na živném agaru žluté zabarvení a ukázaly shodnou odolnost vůči působení *gamma* záření a vysychání jako známý vysoce odolný druh *Deinococcus radiodurans* (Phillips, Wiegel et al. 2002).

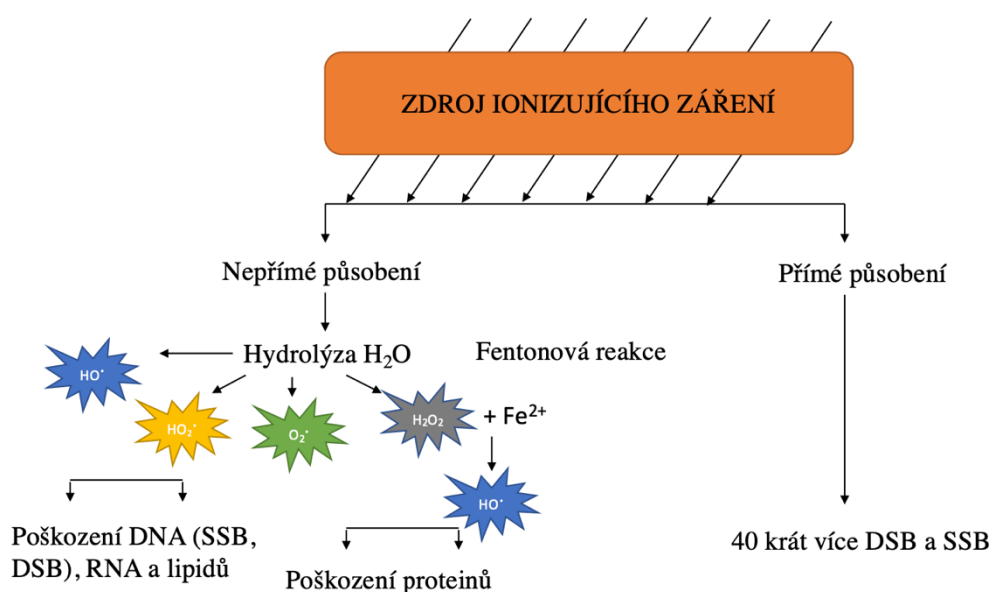
Zástupci čeledě *Geodermatophilaceae* se často nalézají v extrémně suchém prostředí, například půda z pouště Sahara (Chad) nebo vápenec, do kterého dokonce vrůstají a působí jako endolithy. Do čeledě spadají rody vysoce odolné vůči UV záření *Geodermatophilus* a *Modestobacter*. Kolonizace kamenů je umožněna adaptací na stresové podmínky, mezi které patří: vysoké dávky ionizujícího záření (UV), vysychání, vysoké koncentrace solí nebo těžkých kovů. Izoláty z rodů *Geodermatophilus* a *Modestobacter* ukazují extrémní odolnost vůči *gamma* záření, UV záření a vysychání. *G. obscurus* a *M. multiseptatus* nevykazovaly žádnou ztrátu životaschopnosti buněk po působení dávek *gamma* záření až 3 kGy, u *G. obscurus* byla pozorována odolnost vůči dávkám UV záření až 3500 kJ m⁻² a přítomností až 10% roztoku H₂O₂ v kultivačním médiu. Vysychání po dobu 60 dní způsobovalo pokles životaschopnosti populace, ale i přesto 10 – 20 % buněk zůstalo životaschopných (Ortega-Morales, Gaylarde et al. 2005, Gtari, Essoussi et al. 2012).

Dopady působení ionizujícího záření

Ionizující záření je typ energie uvolněný atomy ve formě elektromagnetických vln (*gamma* záření, UV) nebo částic (neutronů, *beta* či *alfa* částice). Dopady působení ionizujícího záření na buňky lze rozdělit na přímé a nepřímé (Obr. 1). Přímý vliv radioaktivity spočívá v interakci nabitých částic, jako *alfa* a *beta* částice, nebo kvantu energie s hmotou (jádrům atomu nebo elektronovým obalem, včetně atomů v biologických molekulách). Při této interakci dochází k ionizaci nebo excitaci atomů, v důsledku čehož vzniká v samotné biomolekule vysoce reaktivní radikál. Podobným způsobem může docházet například k poškození cukr-fosfátové kostry molekul DNA nebo poškození purinů či pyrimidinů, což vede k narušení struktury DNA (například vznik dimerů pyrimidinů působením UVC záření). Přímým mechanismem je

způsobeno přibližně 20 % cytotoxických dopadů ionizujícího záření na buňku (Luig, Kellerer et al. 2011, Close, Nelson et al. 2013, Halliwell and Gutteridge 2015).

Nepřímé působení radioaktivity na buňku nastává po pohlcení *gamma* nebo rentgenového záření. Pohlcením ionizujícího záření v tomto případě dochází k radiolýze molekul H_2O , což vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS). Vzhledem k velkému obsahu vody v živých buňkách, se jedná o hlavní zdroj radikálů. Jde o hydroxylový radikál ($OH\cdot$), superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$) a peroxid vodíku (H_2O_2). Sekundárním zdrojem hydroxylových radikálů je Fentonova reakce, které se účastní železnaté ionty a peroxid vodíku (Daly 2009, Halliwell and Gutteridge 2015).



Obrázek 1. Mechanismus působení ionizujícího záření na bakteriální buňky.

ROS mají krátkou dobu životnosti a poškozují všechny typy biomolekul. V případě bakterií se ukazuje, že na zachování vitality buněk má největší vliv poškození proteinů působením ROS. V přítomnosti ionizujícího záření v buňkách náchylných a odolných vzniká stejné množství jedno či dvou řetězcových zlomů DNA, však v odolných buňkách lze sledovat řadově nižší míru oxidace proteinů. Z toho lze odvodit, že ochrana proteinů umožňuje u odolných mikroorganismů zajištění pohotovové opravy poškození DNA a tím zachování vitality buněk (Rich, Allen et al. 2000, Daly, Gaidamakova et al. 2007).

Mechanismy adaptace

Přímé působení ionizujícího záření vyvolává vznik četných zlomů DNA. Usnadnění opravy DNA je zprostředkováváno DNA vazebnými proteiny podobnými eukaryotickým

histonům, které umožňují správné umístění části poškozené DNA pro bezchybnou opravu (Hashimoto, Imhoff et al. 2003, Ghosh and Grove 2004, Pavlopoulou, Savva et al. 2016). Samotné mechanismy opravy poškozené DNA jsou obdobné jak u odolných, tak náchylných mikroorganismů (Sghaier, Ghedira et al. 2008).

Zachování vitality vyžaduje udržení integrity DNA, proto má většina mikroorganismů k dispozici dostatečnou enzymatickou výbavu pro pohotovou opravu poškozené DNA. Pozoruhodně jenom malé množství kultivovatelných mikroorganismů je schopno přežít působení ionizujícího záření. Enzymatická oprava DNA, ať už nativními nebo klonovanými enzymy, po ozařování v buňkách radiorezistentních mikroorganismů může fungovat lépe díky ochraně proteinů před oxidací. Tato ochrana může být zprostředkovávána jak molekulami enzymatické povahy, tak i jinými látkami neenzymatické povahy (Gutman, Fuchs et al. 1994, Daly, Gaidamakova et al. 2007).

Z antioxidantů enzymatické povahy lze zmínit thioredoxin reduktázu (*trxB*), proteiny podobné glutaredoxinu (*glp*), glutathion-vázající proteiny (*gsiB*), superoxid dismutázu (*sodA*), katalázu (*katE*) a jiné (Pavlopoulou, Savva et al. 2016). Mezi antioxidanty neenzymatické povahy řadíme karotenoidní barviva, které produkují mnohé mikroorganismy odolné na ionizující záření. Jedná se například o bacterioruberin z *Rubrobacter radiotolerans* a deinoxanthin z *D. radiodurans* (Saito, Terato et al. 1994, Park, Ahn et al. 2020). Ukazuje se, že cílená mutagenese genů pro syntézu karotenoidů u *D. radiodurans* vede ke vzniku málo odolných bezbarvých kolonií, kdežto nativní kolonie jsou červeně zbarvené a vyznačují se vysokou odolností na rozmanité stresové podmínky (Tian, Xu et al. 2007). Mikroorganismy, na které v životním prostředí působí vysoké dávky UV záření, například ve vysokohorských jezerech nebo v moři, často produkují bezbarvé látky s maximem absorpce v UV spektru. Tyto vlastnosti má velká skupina látek ze skupiny mikosporinů podobných aminokyselin, které se často izolují z cyanobakterií, známým producentem je například *Lyngbya* sp. (Rastogi and Incharoensakdi 2014)

Důležitým mechanismem ochrany buněk je předcházení oxidace proteinů. Sekundárním zdrojem hydroxylových radikálů v buňkách je Fentonova reakce, které se účastní železnaté ionty. Ukazuje se, že bakteriální izoláty s vysokým vnitrobuněčným poměrem Mn:Fe vykazují extrémně vysokou odolnost před oxidací proteinů způsobenou ionizujícím zářením, kdežto hypersenzitivní bakteriální izoláty mají nízký poměr Mn:Fe. Analýza míry karbonylace proteinů ukázala, že akumulace manganatých iontů v buňkách zabraňuje oxidaci proteinů, ale neovlivňuje míru tvorby dvou řetězcových zlomů DNA. Tyto předpoklady vedly ke vzniku

hypotézy, že buňky bohaté na mangan mohou lépe předcházet vzniku ROS prostřednictvím Fentonovy reakce (Daly, Gaidamakova et al. 2004, Daly 2009).

Závěr

Oxidativní stres působí na mikroorganismy v rozmanitých lokalitách. Velké množství reaktivních forem kyslíku může vznikat působením imunitního systému, nízkou aktivitou vody nebo po pohlcení ionizujícího záření. Ionizující záření působí na buňky přímo nebo prostřednictvím tvorby hydroxylových radikálů. Odolné mikroorganismy vyvinuly účinné mechanismy reparace poškozené DNA a ochrany biomolekul. Nejdůležitějšími mechanismy obrany jsou zachování funkčnosti enzymatické výbavy pomocí antioxidantů a zamezení oxidace proteinů snížením intracelulárního množství železnatých iontů.

Literatura

- Geodermatophilus. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: 1-28.
- Modestobacter. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: 1-4.
- Close, D., W. Nelson and B. W. (2013). "DNA Damage by the Direct Effect of Ionizing Radiation: Products Produced by Two Sequential One-Electron Oxidations." The Journal of Physical Chemistry A **117**: 12608–12615.
- Daly, M. J. (2009). "A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*." NATURE REVIEWS | Microbiology **7**: 8.
- Daly, M. J., E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, R. D. Leapman, B. Lai, B. Ravel, S. M. W. Li, K. M. Kemner and J. K. Fredrickson (2007). "Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance." Plos Biology **5**(4): 769-779.
- Daly, M. J., E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M. V. Omelchenko, H. M. Kostandarithes, K. S. Makarova, L. P. Wackett, J. K. Fredrickson and D. Ghosal (2004). "Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance." Science **306**(5698): 1025-1028.
- Ghosh, S. and A. Grove (2004). "Histone-like protein HU from *Deinococcus radiodurans* binds preferentially to four-way DNA junctions." Journal of Molecular Biology **337**(3): 561-571.
- Gordon, S. B. and R. C. Read (2002). "Macrophage defences against respiratory tract infections." British Medical Bulletin **61**: 45-61.
- Gtari, M., I. Essoussi, R. Maaoui, H. Sghaier, R. Boujmil, J. Gury, P. Pujic, L. Brusetti, B. Chouaia, E. Crotti, D. Daffonchio, A. Boudabous and P. Normand (2012). "Contrasted resistance of stone-dwelling Geodermatophilaceae species to stresses known to give rise to reactive oxygen species." Fems Microbiology Ecology **80**(3): 566-577.

Gutman, P. D., P. Fuchs and K. W. Minton (1994). "RESTORATION OF THE DNA-DAMAGE RESISTANCE OF DEINOCOCCUS-RADIODURANS DNA-POLYMERASE MUTANTS BY ESCHERICHIA-COLI DNA-POLYMERASE-I AND KLENOW FRAGMENT." Mutation Research **314**(1): 87-97.

Halliwell, B. and J. Gutteridge (2015). Free Radicals in Biology and Medicine.

Hashimoto, M., B. Imhoff, M. M. Ali and Y. W. Kow (2003). "HU protein of Escherichia coli has a role in the repair of closely opposed lesions in DNA." Journal of Biological Chemistry **278**(31): 28501-28507.

Luig, H., A. Kellerer and J. Griebel (2011). Radionuclides, 1. Introduction. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.

Ng, V. H., J. S. Cox, A. O. Sousa, J. D. MacMicking and J. D. McKinney (2004). "Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst." Molecular Microbiology **52**(5): 1291-1302.

Ortega-Morales, B. O., C. C. Gaylarde, G. E. Englert and P. M. Gaylarde (2005). "Analysis of salt-containing biofilms on limestone buildings of the Mayan culture at Edzna, Mexico." Geomicrobiology Journal **22**(6): 261-268.

Park, S. A., S. Y. Ahn and K. Y. Choi (2020). "Functional Microbial Pigments Isolated from Chryseobacterium and Deinococcus species for Bio-paint Application." Biotechnology and Bioprocess Engineering **25**(3): 394-402.

Pavlopoulou, A., G. D. Savva, M. Louka, P. G. Bagos, C. E. Vorgias, I. Michalopoulos and A. G. Georgakilas (2016). "Unraveling the mechanisms of extreme radioresistance in prokaryotes: Lessons from nature." Mutation Research-Reviews in Mutation Research **767**: 92-107.

Phillips, R. W., J. Wiegel, C. J. Berry, C. Fliermans, A. D. Peacock, D. C. White and L. J. Shimkets (2002). "Kineococcus radiotolerans sp nov., a radiation-resistant, Gram-positive bacterium." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **52**: 933-938.

Rastogi, R. P. and A. Incharoensakdi (2014). "Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium Lyngbya sp CU2555." Fems Microbiology Ecology **87**(1): 244-256.

Rasuk, M. C., G. M. Ferrer, D. Kurth, L. R. Portero, M. E. Farias and V. H. Albarracin (2017). "UV-Resistant Actinobacteria from High-Altitude Andean Lakes: Isolation, Characterization and Antagonistic Activities." Photochemistry and Photobiology **93**(3): 865-880.

Rich, T., R. L. Allen and A. H. Wyllie (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-783.

Saito, T., H. Terato and O. Yamamoto (1994). "PIGMENTS OF RUBROBACTER-RADIOTOLERANS." Archives of Microbiology **162**(6): 414-421.

Sghaier, H., K. Ghedira, A. Benkahla and I. Barkallah (2008). "Basal DNA repair machinery is subject to positive selection in ionizing-radiation-resistant bacteria." Bmc Genomics **9**: 7.

Tian, B., Z. J. Xu, Z. T. Sun, J. Lin and Y. J. Hua (2007). "Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses." Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects **1770**(6): 902-911.

**Sborník souhrnů a plných textů konference
KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2021**

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

Editor: Olga Mařátková, Irena Kolouchová

Rok vydání: 2021

Počet stran: 76

ISBN: 978-80-7592-096-6

Jedná se o elektronickou verzi publikace ve formátu PDF.