



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Sborník souhrnů a plných textů konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2015

12. seminář

PIVOVARSTVÍ A KVASNÉ TECHNOLOGIE 2015

6. seminář

ENVIRONMENTÁLNÍ BIOTECHNOLOGIE 2015

Editor: Olga Schreiberová

Praha 2015

Pořádající instituce:

Ústav biotechnologie

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Sponzoři, spolupracující společnosti a hosté:

Budějovický Budvar, n.p.

Dekonta, a.s.

Denwel, s.r.o.

EPS, s.r.o.

Heineken Česká Republika, a.s.

Pacovské strojírny, a.s.

Pivovar Svijany, a.s.

Pivovary Lobkowicz, a.s.

Pivovary Staropramen, s.r.o.

Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.

Přípravný a organizační výbor:

Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

Ing. Olga Schreiberová, Ph.D.

Rudolf Jung

Ivana Dušková

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

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015

ISBN 978-80-7080-929-7

Obsah

Program konference	4
SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ	6
Působení nanočástic kovů na biofilm kvasinky <i>Candida parapsilosis</i>	7
Produkce sekundárních metabolitů houbou <i>Monascus purpureus</i>	12
Možnosti využití bakterií rodu <i>Clostridium</i> pro zpracování lignocelulózových odpadů	16
Metody kvantifikace a vizualizace biofilmů	20
Produkce rhamnolipidů a jejich charakteristika	25
Antimikrobiální účinky nanočástic	30
Modelová predikce a skutečná adheze baktérií kazících pivo na koloidní částice nerzové oceli	34
Kutinázy v nových průmyslových aplikacích	35
Zvýšení trvanlivosti nefiltrovanosti piva pomocí vysokého hydrostatického tlaku	36
Identifikace produktů termických a oxidačních reakcí polyfenolů ječmene a chmele	37
Mikrobiální produkce kyseliny jantarové	38
Produkce mastných kyselin psychrofilními kvasinkami	43
Vliv nanočástic železa na růst mikrobiálních populací	44
Vliv bazické oblasti nukleokapsidového proteinu na tvorbu zralé a nezralé retrovirové částice	51
Vliv baicaleinu na tvorbu a stabilitu biofilmu kvasinek	52
Vliv biologicky aktivních látek na tvorbu biofilmu na titanových materiálech používaných v ortopedii	59
Využití přírodních látek k regulaci tvorby biofilmu	64
Příprava rekombinantních nukleas s potenciálním farmakologickým účinkem	68
Biofiltrace těkavých látek za použití termofilní populace	69
Fenotypová analýza produkce rhamnolipidů	70
Struktura a vlastnosti biofilmů vláknitých eukaryot	71
Vliv kultivačních podmínek na produkci rhamnolipidů	75
Sklízení jednobuněčných sladkovodních řas metodou flokulace	76
Odbourávání směsí nitroaromatických látek v různých typech reaktorů volnými a imobilizovanými buňkami	77
Antibiofilmová aktivita rhamnolipidů	78



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Program konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2015

12. seminář Pivovarství a kvasné technologie 2015

a

6. seminář Environmentální biotechnologie 2015

9. dubna 2015

Konferenční centrum VŠCHT Praha, kolej Sázava

areál vysokoškolských kolejí Praha 4 – Kunratice

8:00 – 9:00	Registrace účastníků
	1. přednášková sekce sál B+C
9:00 – 9:10	zahájení konference
9:10 – 9:30	Basařová G., prof. Ing. DrSc. Současné postavení českého sladařství a pivovarství ve světové produkci
9:30 – 9:50	Rumlová M., Dr. Ing. Molekulárně-biologické metody: nástroj pro studium životního cyklu retrovirů
9:50 – 10:10	Derdelincx G., prof. Basics of primary gushing
10:10-10:20	Ježková Z., Mgr. Biologicky aktivní látky z mořských organismů
10:20-10:30	Koukalová M., Ing. Působení nanočástic kovů na biofilm kvasinky <i>Candida parapsilosis</i>
10:30-10:40	Patrovský M., Ing. Produkce sekundárních metabolitů houbou <i>Monascus purpureus</i>
10:40-10:50	Raschmanová H., Ing. Stresová odpověď indukovaná špatně sbalenými proteiny v endoplazmatickém retikulu kvasinky <i>Pichia pastoris</i>
10:50-11:00	Kolek J., Mgr. Možnosti využití bakterií rodu <i>Clostridium</i> pro zpracování lignocelulózových odpadů
11:00-11:20	PŘESTÁVKA
11:20-11:30	Kvasničková E., Ing. Metody kvantifikace a vizualizace biofilmů
11:30-11:40	Ježdík R., Ing. Produkce a charakteristika rhamnolipidů
11:40-11:50	Pádrová K., Ing. Antimikrobiální účinky nanočástic
11:50-12:00	Strejc J., Ing. Srovnání modelové predikce a skutečné adheze buněk a spor rodu <i>Alicyclobacillus</i>
12:00-12:10	Hudcová T., Ing. Biologická aktivita a biotransformační reakce chmelových flavonoidů
12:10-13:30	OBĚD

2. přednášková sekce sál B+C

13:30-13:40	Bajerová K., Bc. Vliv nanočástic železa na růst mikrobiálních populací
13:40-13:50	Dostálková A., Bc. Vliv bazické oblasti nukleokapsidového proteinu na tvorbu zralé a nezralé retrovirové částice
13:50-14:00	Heřmanová A., Bc. Vliv baicaleinu na tvorbu a stabilitu biofilmu kvasinek
14:00-14:10	Kubů T., Bc. Vliv biologicky aktivních látek na tvorbu biofilmu na titanových materiálech používaných v ortopedii
14:10-14:20	Paldrychová M., Bc. Využití přírodních látek k regulaci tvorby biofilmu
14:20-14:30	Streckerová T., Bc. Příprava rekombinantních nukleas s potenciálním farmakologickým účinkem
14:30-14:50	<i>PŘESTÁVKA</i>
14:50-15:00	Brožová M., Bc. Modelová predikce a skutečná adheze bakterií kazících pivo na koloidní částice nerezové oceli
15:00-15:10	Bahounková H., Bc. Kutinázy v nových průmyslových aplikacích
15:10-15:20	Čadková A., Bc. Vliv mikroelementů na kinetiku růstu a výtěžnost biomasy mikroorganismů rodu <i>Thraustochytriales</i>
15:20-15:30	Ivanišová M., Bc. Ošetření vysokým hydrostatickým tlakem – prostředek pro zvýšení trvanlivosti nefiltrovaných piv
15:30-15:40	Melczer L., Bc. Vliv složení média na výtěžnost biomasy a obsahu lipidů v biomase mikroorganismů řádu <i>Thraustochytriales</i>
15:40-15:50	Lučková A., Bc. Identifikace produktů termických a oxidačních reakcí polyfenolů ječmene a chmele
15:50-16:00	Urbanská A., Bc. Mikrobiální produkce kyseliny jantarové
16:00-16:10	Zajícová V., Bc. Produkce mastných kyselin psychrofilními mikroorganismy

3. přednášková sekce sál A

13:30-13:40	Dostálek P., prof. Ing. CSc. Group presentation
13:40-13:50	Brányik T., doc. Ing. Ph.D. Group presentation
13:50-14:00	Růžička M., doc. Ing. CSc. Beer foam as a multiphase system
14:00-14:10	Poštulková M., Ing. Relationship and differences between primary and secondary gushing
14:10-14:20	Zítková K., Bc. Quantification of gushing in desaturation cell
14:20-14:30	Kareš O. A simple model for unplugging the desaturation cell
14:30-14:50	<i>PŘESTÁVKA</i>
14:50-15:00	Linha L., Bc. Biofiltrace těkavých látek za použití termofilní populace
15:00-15:10	Moravcová N., Bc. Fenotypová analýza produkce rhamnolipidů.
15:10-15:20	Paulíček V., Bc. Struktura a vlastnosti biofilmů vláknitých eukaryot
15:20-15:30	Počík O., Bc. Termofilní biofiltrace těkavých organických látek v probublávaném reaktoru
15:30-15:40	Suchánek A., Bc. Vliv kultivačních podmínek na produkci rhamnolipidů
15:40-15:50	Smolová J., Bc. Sklízení jednobuněčných sladkovodních řas metodou flokulace
15:50-16:00	Ševčíková M., Bc. Odbourávání směsí nitroaromatických látek v různých typech reaktorů
16:00-16:10	Zeman K., Bc. Antibiofilmová aktivita rhamnolipidů

SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ

Působení nanočástic kovů na biofilm kvasinky *Candida parapsilosis*

Koukalová M., Čejková A.

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Úvod

Biofilmy jsou složité mikrobiální komunity, které odolávají nepříznivým vnějším podmínkám, včetně působení antibiotik a lidského imunitního systému. Populace biofilmu se může skládat z jednoho nebo více druhů mikroorganismů a může vzniknout na rozličných površích, jako jsou například přírodní vodní systémy, vodní potrubí, živé tkáně, povrch zubů, zdravotnické nástroje nebo implantáty. Díky změněné morfologii a produkci extracelulární matrix a tím i zvýšené odolnosti, jsou mikroorganismy ve formě biofilmu příčinou řady chronických infekcí, a navíc buňky uvolněné z biofilmů způsobují kontinuální šíření infekcí. Proto mají biofilmy vznikající na zdravotnických nástrojích a implantátech velmi negativní dopad v medicíně. Vzhledem k nedostatku účinných antibiotik k vyléčení onemocnění vyvolaných biofilmovými populacemi je zapotřebí nových antimikrobiálních činidel, které by mohly snížit nebo inhibovat schopnost adheze buněk, zabránit kolonizaci a tím i infekci. Rezistence biofilmů vůči antibiotikům je mimo jiné způsobena také špatnou penetrací antibiotik do matrice biofilmu, změněným mikroprostředím a/nebo adaptivním mechanismem mikroorganismů. Jednou z potenciálních možností léčby biofilmů je využití nanočástic kovů, které vykazují antimikrobiální a antibiofilmovou aktivitu (Markowska a kol., 2013; Monteiro a kol., 2014).

Nanočástice nulamocného železa (nZVI) se vyznačují se velkým měrným povrchem a reaktivitou. Jejich potenciální aplikace může být v katalýze, magnetismu, elektronice, biomedicinském inženýrství a ochraně životního prostředí (Barnes a kol., 2010). Částice nZVI díky své vysoké reaktivitě uvolňují elektrony a Fe^{2+} , které přeměňují méně reaktivní peroxid vodíku na více reaktivní formy kyslíku, zejména hydroxylové radikály, které reagují přímo s membránovými lipidy, proteiny a DNA, kde mohou způsobovat dysfunkce. Tyto reaktivní formy kyslíku mohou být inaktivovány (zhášeny) enzymy s antioxidační kapacitou, pokud však jejich množství přesáhne antioxidační kapacitu buňky, nastává oxidativní stres (Ševců a kol., 2011). Antimikrobiální vlastnosti stříbra jsou již dlouho známy a předpokládá se, že nanočástice tohoto kovu jsou méně toxické než ionty stříbra. Antimikrobiální aktivita materiálu obsahujícího nanočástice stříbra může pomoci zabránit infekcím při léčbě popálenin, stejně jako v prevenci mikrobiální kolonizace protéz a katetrů. Z důvodu působení nanočástic na různých buněčných úrovních (buněčná stěna, proteosyntéza, DNA) by mikroorganismy neměly být schopny si vytvořit odolnost ani po dlouhodobém používání nanočástic. Nicméně stále zůstává nevyřešena otázka toxicity nanočástic na eukaryotické (lidské) buňky (Markowska a kol., 2013; Panáček a kol., 2009).

Kvasinky rodu *Candida* jsou jedny z nejčastějších podmíněných patogenů, které jsou zodpovědné za kvasinkové nosokomiální infekce (Panáček a kol., 2009). Kandidózy jsou běžné infekce kůže, ústní dutiny a jícnu, gastrointestinálního traktu, vaginy a cévního systému člověka a velmi často se objevují u pacientů, kteří podstupují léčbu rakoviny, transplantaci orgánů a léčení širokospektrálními antibiotiky. Kandidóza je také jednou z nejčastějších a přetrvávajících infekcí u osob infikovaných HIV a pacientů s AIDS (Silva a kol., 2010). Rozhodujícím prvkem této všestrannosti je schopnost *Candida* spp. přežít jako komenzální mikroorganismy na různých anatomicky odlišných místech, jejich schopnost adaptace na různé fyziologické podmínky a schopnost tvořit biofilm (Calderone a Fonzi, 2001). Jedna

z nejčastěji se vyskytujících kvasinek způsobující kandidové infekce je *Candida parapsilosis*, která se běžně vyskytuje na lidské kůži a její patogenita je omezena neporušenou kůží. Ve srovnání s jinými druhy *Candida* je *C. parapsilosis* v přírodě mnohem více rozšířená. Na rozdíl od jiných druhů (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*) byla *C. parapsilosis* izolována i z nelidských zdrojů (domácí zvířata, hmyz, půda, mořská voda). Její virulence je spojená se schopností kolonizovat povrch, sekrecí hydrolytických enzymů a tvorbou biofilmu. Nejvyšší riziko infekce je zvláště u novorozenců a u pacientů na jednotkách intenzivní péče, kde se infekce *C. parapsilosis* hojně vyskytují na kloubních náhradách a permanentních katetrech (Kuhn a kol., 2004; Trofa a kol., 2008).

V této práci je popsána metodika pro experimenty zabývající se působením nanočástic nulamocného železa a stříbra na adhezi biofilmu kvasinky *C. parapsilosis*.

Metodika

Použité chemikálie

NaCl (Penta)

Kvasničný extrakt (Roth)

Bakteriální pepton (Oxoid)

Glukosa bezvodá (Penta)

Krystalová violet (Roth)

Glycerin bezvodý (Penta)

Nanofer 25S (Nanoiron)

Roztok nanočástic stříbra (Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT Praha)

Ethanol

Kultivační média

Média byla připravována v destilované vodě a sterilována v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,1 MPa.

Složení kultivačních médií

YPD médium (Yeast extract peptone dextrose medium)

Kvasničný extrakt 10 g/l

Bakteriální pepton 20 g/l

Glukosa 20 g/l

Fyziologický roztok

NaCl 9 g/l

Použité mikroorganismy

V experimentální části byla použita kvasinka *Candida parapsilosis* DBM 2165 (sbírka Ústavu biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha).

Uchovávání buněčné populace

Mikroorganismus byl uchováván ve formě kryokonzerv při -70 °C v 50% (obj.) glycerolu jako kryoprotektantu.

Použité nanočástice

Nanofer 25S o koncentraci 205 g/l

Roztok nanočástic stříbra o koncentraci 102 mg/l

Příprava inokula

100 ml sterilního YPD média bylo inokulováno buněčnou populací z kryokonzervy a kultivováno na třepačce s frekvencí otáček 100 min^{-1} , 24 hodin při teplotě 30°C . Získaná buněčná populace byla separována centrifugací (9000 g, teplota 10°C , 10 min.), promyta čistým YPD médiem a použita k inokulaci jamek v mikrotitrační desce ($\text{OD}_{600} = 0,8$).

Kultivace na mikrotitrační desce

Do jednotlivých jamek byla pipetována inokulační suspenze společně s roztokem nanočástic (nanoželezo, rozmezí koncentrací $0,4 - 2,5 \text{ g/l}$, velikost 50 nm ; nanostříbro, rozmezí koncentrací $5 - 55 \text{ mg/l}$, velikost 20 nm) v celkovém objemu $200 \mu\text{l}$. Do jednoho sloupce byla přidána pouze buněčná suspenze, která sloužila jako kontrola. Deska byla kultivována na plošné třepačce o frekvenci otáček 150 min^{-1} , 24 hodin při teplotě 30°C .

Stanovení míry nárůstu biofilmu

Míra nárůstu biofilmu byla analyzována pomocí spektrofotometrické metody sledujících celkový nárůst biofilmu (metoda barvení krystalovou violetí) a pomocí mikroskopické metody s vyhodnocením osídlené plochy (automatizovaný mikroskop CellaVista se softwarem pro analýzu obrazu).

Mikroskopická metoda s vyhodnocením osídlené plochy (automatizovaný mikroskop CellaVista se softwarem pro analýzu obrazu)

Po 24 hodinách kultivace byla každá jamka třikrát promyta fyziologickým roztokem k odstranění nepřisedlých buněk. Poté byla deska proměřena automatizovaným mikroskopem CellaVista a ze získaných dat byla vyhodnocena osídlená plocha. Míra nárůstu biofilmu pod vlivem nanočástic byla srovnána s nárůstem bez nanočástic.

Metoda barvení krystalovou violetí

Po proměření na mikroskopu CellaVista byl do každé jamky přidán $0,1\%$ roztok krystalové violeti na 20 minut, poté byly jamky opět třikrát promyty fyziologickým roztokem a následně bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ 96% ethanolu na 10 minut. Z každé jamky bylo poté převedeno $100 \mu\text{l}$ do čisté desky a proměřeno na Readeru při 580 nm .

Výsledky

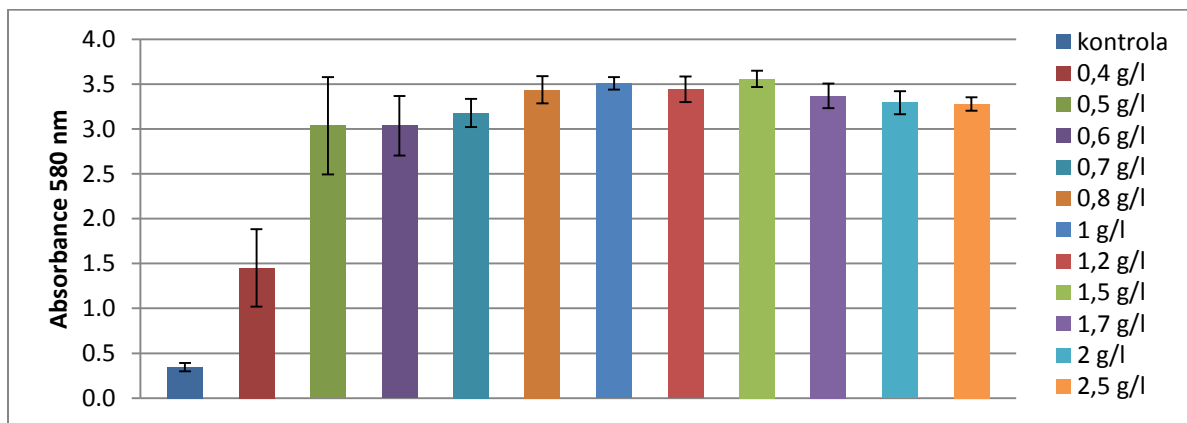
Vzhledem k předpokladu, že nanočástice stříbra a nulamocného železa mají antimikrobiální účinky, byly provedeny kultivace kvasinky *Candida parapsilosis* DBM 2165 s přidavkem zmíněných nanočástic v rozličných koncentracích na mikrotitrační desce za účelem inhibice počáteční adheze (viz kap. 2. 7.).

Míra inhibice adheze a nárůstu biofilmu byla vyhodnocena mikroskopickou metodou s vyhodnocením osídlené plochy (viz kap. 2. 8. 1.) a metodou barvení krystalovou violetí (viz kap. 2. 8. 2.).

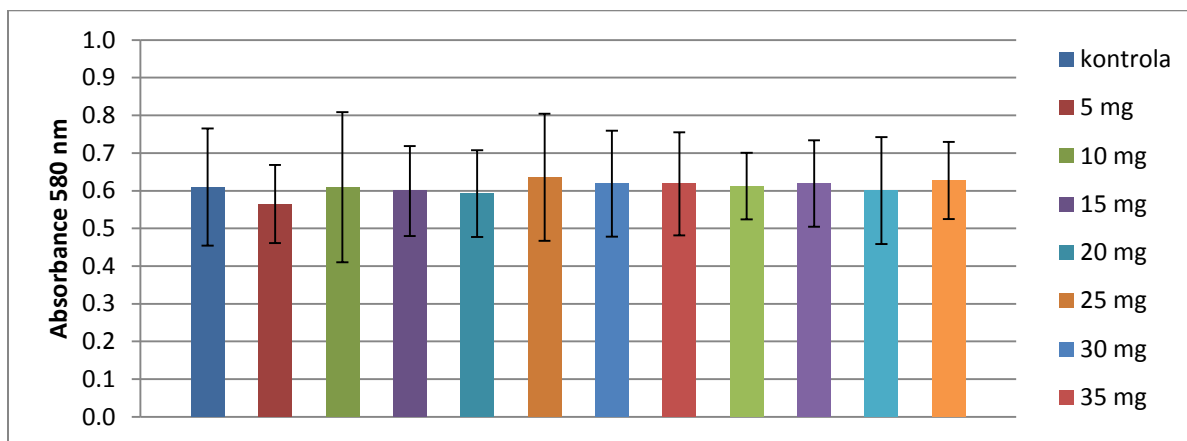
Na Obr. 1 je zobrazen nárůst biofilmu *C. parapsilosis*, vyjádřený jako absorbance, v závislosti na přidavku nanočástic železa (vyhodnocení metodou barvení krystalovou violetí). Z grafického vyjádření na Obr. 1 je patrné, že použité nanočástice železa nemají požadovaný inhibiční vliv na adhezi a nárůst biofilmu, nárůst biofilmu byl naopak několikanásobně vyšší než kontrolní měření. Data z metody s vyhodnocením osídlené plochy nebylo možné u tohoto měření získat z důvodu černého zabarvení roztoku nanočástic, kdy nebylo možné odlišit buňky od nanočástic.

Na Obr. 2 a Obr. 3 je znázorněn nárůst biofilmu *C. parapsilosis* s přidavkem nanočástic stříbra. Z grafu na Obr. 2 (vyhodnocení metodou barvení krystalovou violetí) je patrný téměř

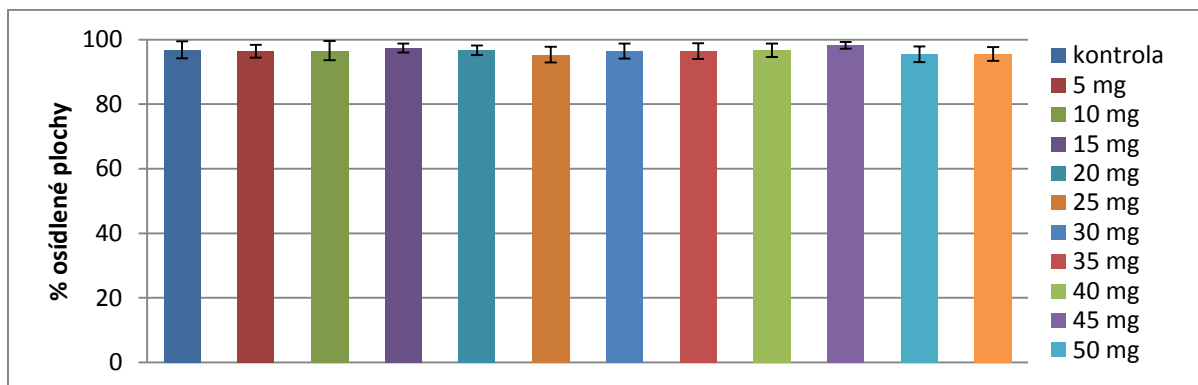
srovnatelný nárůst biofilmu po přidavku nanoštěříbra s kontrolním nárůstem bez nanočástic. Stejně tak graf znázorňující hodnoty z mikroskopické metody s vyhodnocením osídlené plochy (Obr. 3) ukazuje nárůst biofilmu s přidavkem nanoštěříbra srovnatelný s kontrolním nárůstem biofilmu. Z obou vyhodnocení tedy vyplývá, že ani nanočástice štříbra v použité koncentraci nemají požadovaný inhibiční vliv na adhezi a nárůst biofilmu.



Obr. 1 Nárůst biofilmu *C. parapsilosis* v závislosti na přidavku nanočástic železa (vyhodnocení metodou barvení krystalovou violetí).



Obr. 2 Nárůst biofilmu *C. parapsilosis* v závislosti na přidavku nanočástic štříbra (vyhodnocení metodou barvení krystalovou violetí).



Obr. 3 Nárůst biofilmu *C. parapsilosis* v závislosti na přidavku nanočástic štříbra (mikroskopická metoda s vyhodnocením osídlené plochy).

Závěr

Byly provedeny kultivace kvasinky *C. parapsilosis* s přidavkem nanočástic stříbra a nulamocného železa v rozličných koncentracích na mikrotitrační desce za účelem inhibice počáteční adheze. Po přidavku nanočástic železa byl zaznamenán několikanásobně vyšší nárůst biofilmu oproti kontrole. Vzhledem k těmto výsledkům se u kvasinky *C. parapsilosis* do budoucna dále tyto nanočástice nebudou používat k inhibici adheze a nárůstu biofilmu. Ani při kultivaci s přidavkem nanočástic stříbra neměla použitá koncentrace (5 – 55 mg/l) inhibiční vliv na nárůst biofilmu. Inhibice růstu *C. parapsilosis* nanočásticemi stříbra byla již dříve prokázána (Panáček a kol., 2009), avšak pouze u suspenzních buněk. Pro inhibici nárůstu biofilmu, bude z důvodu odlišné morfologie buněk a jejich zvýšené odolnosti pravděpodobně potřeba použít vyšší koncentrace, což bude náplní další práce, nebo použití nanočástic o menší velikosti (1 – 10 nm), u kterých již bylo dříve prokázáno, že mají větší antimikrobiální aktivitu ve srovnání s většími nanočásticemi (Morones a kol., 2005.; Verran a kol., 2007).

Literatura

- Barnes R. J., Van der Gast C. J., Riba O., Lehtovirta L. E., Prosser J. I., Dobson P. J., Thompson I. P. The impact of zero-valent iron nanoparticles on a river water bacterial community. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, 184, 73–80.
- Calderone R. A., Fonzi W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* **2001**, 9, 327–335.
- Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Clark T. A., Pujol C., Chandra J., Hajjeh R. A., Warnock D. W., Soll D. R., Ghannoum M. A. *Candida parapsilosis* Characterization in an Outbreak Setting. *Emerging Infectious Diseases* **2004**, 10, 1074 – 1081.
- Markowska K., Grudniak A. M., Wolska K. I. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica* **2013**, 60, 523 – 530.
- Monteiro D. R., Negrib M., Silva S., Gorup L. F., De Camargo E. R., Oliveira R., Barbosa D. B., Henriques M. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, 114, 410– 412.
- Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. P., Yacaman M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, 16, 2346–2353.
- Panáček A., Kolář M., Večeřová R., Pucek R., Soukupová J., Kryštof V., Hamal P., Zbořil R., Kvítek L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp.. *Biomaterials* **2009**, 30, 6333–6340.
- Silva S., Henriques M., Oliveira R., Williams D., Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Current Microbiology* **2010**, 61, 534 – 540.
- Ševců A., El-Temsah Y. S., Joner E. J., Černík M. Oxidative stress induced in microorganisms by zero-valent iron nanoparticles. *Microbes and Environments* **2011**, 26, 271–281.
- Trofa D., Gácser A., Nosanchuk J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **2008**, 21, 606–625.
- Verran J., Sandoval G., Allen N. S., Edge M., Stratton J. Variables affecting the antibacterial properties of nano and pigmentary titania particles in suspension. *Dyes and Pigments* **2007**, 73, 298 – 304.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2015).

Produkce sekundárních metabolitů houbou *Monascus purpureus*

Patrovský M., Patáková P.

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Taxonomické zařazení

Rod *Monascus* byl poprvé popsán v roce 1884 francouzským botanikem Van Tieghemem. *Monascus* může být charakterizován jako aerobní, saprofytická, prototrofní, mezofilní a xerofilní houba. Dle taxonomického zařazení patří rod *Monascus* do čeledi *Monascaceae*, řádu *Eurotiales*, třídy *Ascomycetes*, kmene *Ascomycota* a říše *Fungi*. Celkem bylo popsáno asi 58 kmenů, které patří do několika oddělených druhů, z nichž jsou nejznámější - *M. pilosus*, *M. purpureus* a *M. ruber* (Feng a kol., 2012).

Využití

Vláknité houby rodu *Monascus* byly po staletí využívány v potravinářství v Asii, především v Číně, Japonsku, Thajsku, Indonésii, Taiwanu a Filipínách - pro výrobu rýžového vína, červeného sójového sýra, barvení potravin nebo pro konzervaci masa a ryb. Tradiční produkt „*Monascus fermented rice*“ či „red yeast rice“ (fermentovaná rýže) je hojně užíván jako barvivo různých druhů potravin a doplňků stravy v asijských zemích (Sabater-Vilar a kol., 1999). Kromě potravinářské výroby, pigmenty houby *Monascus* mohou najít uplatnění i ve farmaceutickém a textilním průmyslu (Fabre a kol., 1993; Dufossé a kol., 2005; Lopes a kol., 2013).

Kultivace a reprodukce

Houbu lze kultivovat jak na pevných substrátech, tak submerzním způsobem. Optimálním substrátem se ukázala být lehce spařená rýžová zrna o vlhkosti 40 až 50 %. Zaočkovaná rýže s houbou se nechá alespoň 7 dní stát při teplotě 30 °C, přičemž je vhodné rýži v pravidelných intervalech jemným mnutím provzdušnit a mírně navlhčit. Po fermentaci rýžová zrna celým svým obsahem zčervenejí, rozdrťí se a jako prášek se poté používají jako součást tradiční medicíny, potravinářské barvivo či jako startovací kultura pro výrobu dalších produktů.

K výrobě pigmentů mohou být však použity i různé zemědělské zbytky jak jsou rýžové otruby, pšeničné otruby, cassava či semena chlebovníku a mnoho dalších.

Další možností kultivace houby je použití vhodných agarových médií, např. bramborovo-dextrózový, sladinový či Sabouradův agar.

Výhoda kultivace v kapalném médiu spočívá v možnosti snadné změny složení kultivačního média a tím i konečného složení a obsahu požadovaných látek. Produkce pigmentů je zejména ovlivněna zvoleným kmenem, teplotou, hodnotou pH, zdrojem uhlíku, zdrojem dusíku, poměrem mezi C:N a koncentrací kyslíku. Zdroj uhlíku ovlivňuje množství vytvořených pigmentů, zatímco zdroj dusíku má vliv na typ produkovaných pigmentů.

Nepohlavní neboli vegetativní rozmnožování je realizováno tvorbou konidií (spor) vznikajících na koncích hyf (vláken), které jsou nazývány konidiofory. Pohlavní rozmnožování probíhá splynutím samčího (anteridium) a samičího (askogonium) pohlavního orgánu za vzniku plodnice (kleistothecium), z níž se uvolní osm vytvořených askospor, které poté klíčí v nové hyfy (Lin a kol., 2008).

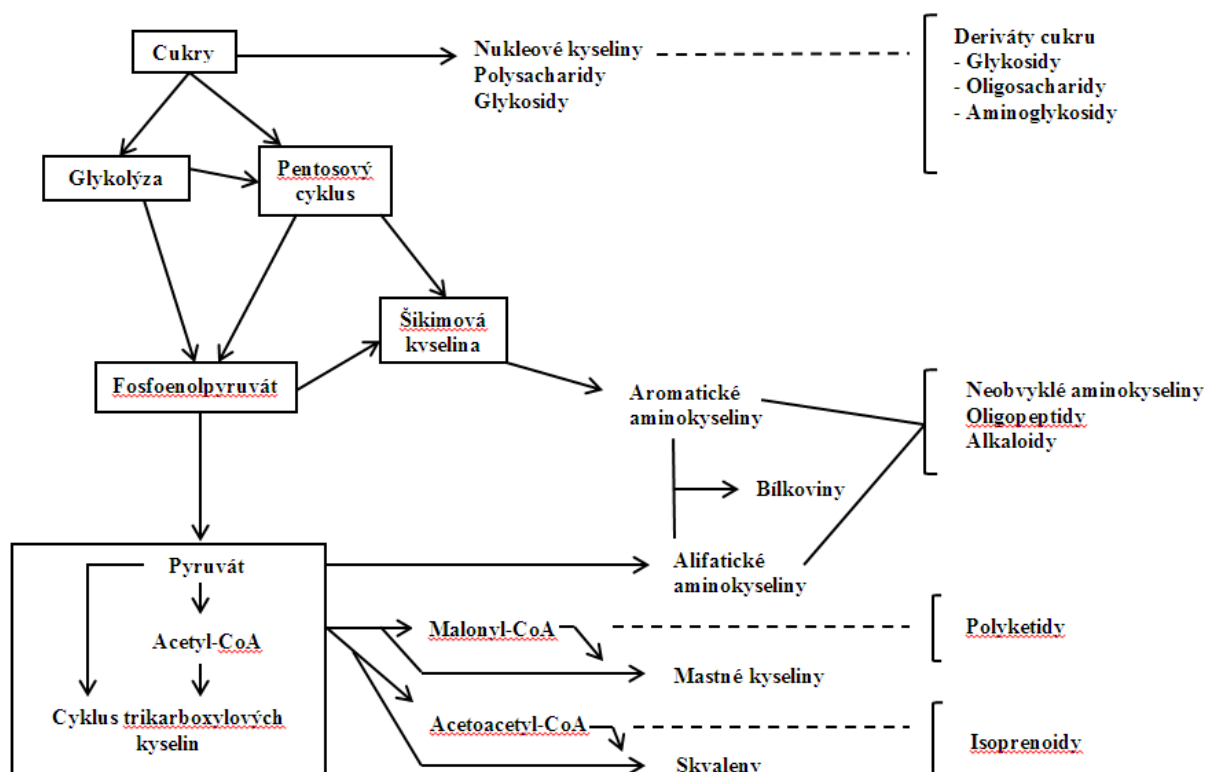
Tvorba sekundárních metabolitů

Biosyntéza většiny pigmentů, citrininu i lovastatinu probíhá klasickou polyketidovou syntézou typu I. Jedná se tedy vesměs o polyketidové sekundární metabolity. Polyketidy jsou tvořeny základní biosyntetickou jednotkou acetátem, který se nachází v rostlinách ve formě thioesteru octové kyseliny s koenzymem A. Na jedné straně je zapojován do tvorby důležitých vyšších mastných kyselin a na druhé straně poskytuje základní fragmenty pro biosyntézu řady sekundárních metabolitů. Základní strukturou polyketidů je poly- β -ketoacylkoenzym A, vznikající kondenzací acetylkoenzymu A a malonylkoenzymu A.

Pigmenty svou strukturou patří do skupiny azofilních sloučenin. Tyto sekundární metabolity hub mají pyron-chinonovou strukturou s větším množstvím atomů kyslíku. Název azaphilony získaly díky své vysoké afinitě k látkám, které obsahují v molekule dusík ve formě amino-skupiny. S takovými látkami tyto pigmenty reagují za vzniku červeně nebo purpurově zbarvených derivátů gama-pyridonu. Azaphilony reagují nejen s amoniakem a různými alkylaminy, ale i s aminokyselinami, peptidy, proteiny a nukleovými kyselinami.

Tyto látky vykazují široké spektrum biologických aktivit projevující se inhibicí různých enzymatických aktivit vedoucích k antimikrobiálním, protinádorovým, antioxidačním a protizánětlivým účinkům (Gao a kol., 2013; Patáková, 2013).

Na Obr. 1 jsou znázorněny biosyntetické dráhy nejběžnějších typů sekundárních metabolitů.



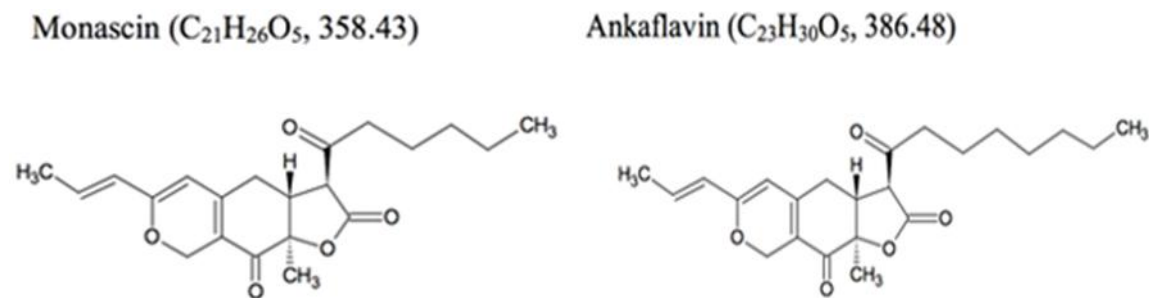
Obr. 1 Klasifikace sekundárních metabolitů podle původu intermediátů

- upraveno dle Biochemie sekundárních metabolitů

(dostupné z <http://old.vscht.cz/kch/download/sylaby/biochemiesekmet.pdf>)

Vlastnosti sekundárních metabolitů

V současné době je známo více než 50 pigmentů tvořených houbou *Monascus*. Houba tvoří tři základní typy pigmentů - žluté (ankaflavin a monascin), oranžové (rubropunktatin a monaskorubrin) a červené (rubropunktamin a monaskorubramin). Dalšími důležitými popsány sekundárními metabolity jsou např. monakolin K, citrinin a γ -aminomáselná kyselina. Chemická struktura žlutých pigmentů je znázorněna na Obr. 2.



Obr. 2 Zástupci žlutých pigmentů - monascin a ankaflavin

- upraveno dle Research and Development of *Monascus purpureus* NTU 568
(dostupné z <http://www.ntu568.org/front/bin/ptlist.phtml?Category=434963>)

Obecně lze pigmenty považovat za vysoce biologicky aktivní látky. Rubropunktatin a monaskorubrin prokázaly jisté antimikrobiální účinky vůči bakteriím, kvasinkám a vláknitým houbám. Rubropunktatin vykazuje prozatím nejsilnější popsané protinádorové účinky spočívající v inhibici růstu karcinomu žaludku. Monaskorubrin vykazuje značné protizánětlivé účinky. U žlutých pigmentů byla prokázána např. imunomodulační aktivita. Monascin vykazuje protizánětlivé účinky chránící játra před chemickým poškozením. Ankaflavin způsobuje u rakovinných buněk apoptózu (Zheng a kol., 2010). Biologická aktivita statinů (např. Monakolinu K) spočívá především v inhibici 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktázy (HMG-CoA) katalyzující jeden z kroků syntézy cholesterolu v těle. Může být proto využit na léčbu hyperlipidemie. Podobný účinek blokace tvorby cholesterolu byl zjištěn i u některých žlutých pigmentů. U statinů byla také prokázána účinnost v prevenci Alzheimerovy choroby inhibicí amyloid β -peptidu, který při své nadměrné produkci vytváří plaky, které obalují nervovou buňku a tím poškozují nervová vlákna (Lachenmeier a kol., 2012).

Mykotoxin citrinin je nežádoucím metabolitem. Projevil jisté hepatotoxické, nefrotoxické a mutagenní efekty, ale i antimikrobiální účinky proti G^+/G^- bakteriím.

Kyselina γ -aminomáselná funguje jako hlavní inhibiční neurotransmitter v centrálním nervovém systému savců a reguluje svalové napětí u člověka.

Stanovení metabolitů

Předpokladem cílené tvorby vybraných pigmentů houbou rodu *Monascus* je úprava složení kultivačního média (Said a kol., 2014), ale i podmínek jejich izolace (Loret a kol., 2010), následně se zaměřením na pigmenty s očekávanou fyziologickou funkcí nebo možným potravinářským použitím (Hsu a kol., 2011; Hsu a kol., 2013).

Pro stanovení kvalitativního i kvantitativního obsahu sekundárních metabolitů - pigmentů, monakolinu K či citrininu, se používají především instrumentální analytické metody spektrofotometrie, kapalinová a plynová chromatografie či tenkovrstvá chromatografie.

Tradiční kvantifikace pigmentů spočívá v extrakci narostlého mycelia vhodným extrakčním činidlem, např. etanolem a následným proměřením jejich absorpčního spektra. Hodnota

absorpčního spektra a absorbance indikuje přítomnost a přibližné množství jednotlivých pigmentů. Další možností je využití metody tenkovrstvé chromatografie. Pro další podrobnější analýzu se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Teng a Feldheim, 1998).

Literatura

- Fabre C. E., Santerre A. L., Loret M. O., Baberian R., Pareilleu, A., Goma, G., Blanc, P. J. (1993) Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*, Journal of Food Science 58 (5), 1099-1102.
- Feng Y., Shao Y., Chen F. (2012) *Monascus* pigments: Mini-review, Applied Microbiology and Biotechnology 96, 1421-1440.
- Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Arad S. M., Blanc P., Murthy K. N. C., Ravishankar, G. A. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality?, Trends in Food Science and Technology 16(9), 389-406.
- Gao J. M., Yang S. X., Qui J. C. (2013) Azaphilones: Chemistry and biology, Chemical reviews 113(7), 4755-4811.
- Hsu L. C., Hsu Y. W., Liang Y. H., Kuo, Y. H., Pan, T. M. (2011) Anti-tumor and anti-inflammatory properties of ankaflavin and monaphilone A from *Monascus purpureus* NTU 56, Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(4), 1124-1130.
- Hsu L. C., Liang Y. H., Hsu Y. W., Kuo Y. H., Pan T. M. (2013) Anti-inflammatory properties of yellow and orange pigments from *Monascus purpureus* NTU 568, Journal of Agricultural and Food Chemistry 61(11), 2796-2802.
- Lachenmeier D. W., Monakhova Y. B., Kuballa T., Löbell-Behrends S., Maixner S., Kohl-Himmelsehr M., Waldmer A., Steffen C. (2012) Regulatory evaluation of red yeast rice (*Monascus* spp.) food supplements sold via the Internet, Deutsche Lebensmittel-Rundschau 108, 357-360A.
- Lin Y. L., Wang T. H., Lee M. H., Su N. W. (2008) Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: A review, Applied Microbiology and Biotechnology 58, 555-564.
- Lopes F. C., Tichota D. M., Pereira J. Q., Segalin J., Rios A. O., Brandelli A. (2013) Pigment production by filamentous fungi an agro-industrial byproducts: An eco-friendly alternative, Applied Biochemistry and Biotechnology 171, 616-625.
- Loret M. O., Morel S. (2010) Isolation and structural characterization of two new metabolites from *Monascus*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(3), 1800-1803.
- Patakova P. (2013) *Monascus* secondary metabolites: Production and biological activity, Journal of Industrial Biotechnology 40, 169-181.
- Said F. M., Brooks J., Chisti Y. (2014) Optimal C: N ratio for the production of red pigments by *Monascus ruber*, World Journal of Microbiology and Biotechnology 30(9), 2471-2479.
- Sabater-Vilar M., Maas R. F. M., Fink-Gremmels J. (1999) Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination, Mutation research 44, 7-16.
- Teng S. S., Feldheim W. (1998) Analysis of anka pigments by liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry, Chromatographia 47 (9/10).
- Zheng Y., Xin Y., Shi., Guo Y. (2010) Cytotoxicity of *Monascus* pigments and their derivatives to human cancer cells, Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 9523-9528.

Možnosti využití bakterií rodu *Clostridium* pro zpracování lignocelulózových odpadů

Jan Kolek, Petra Patáková

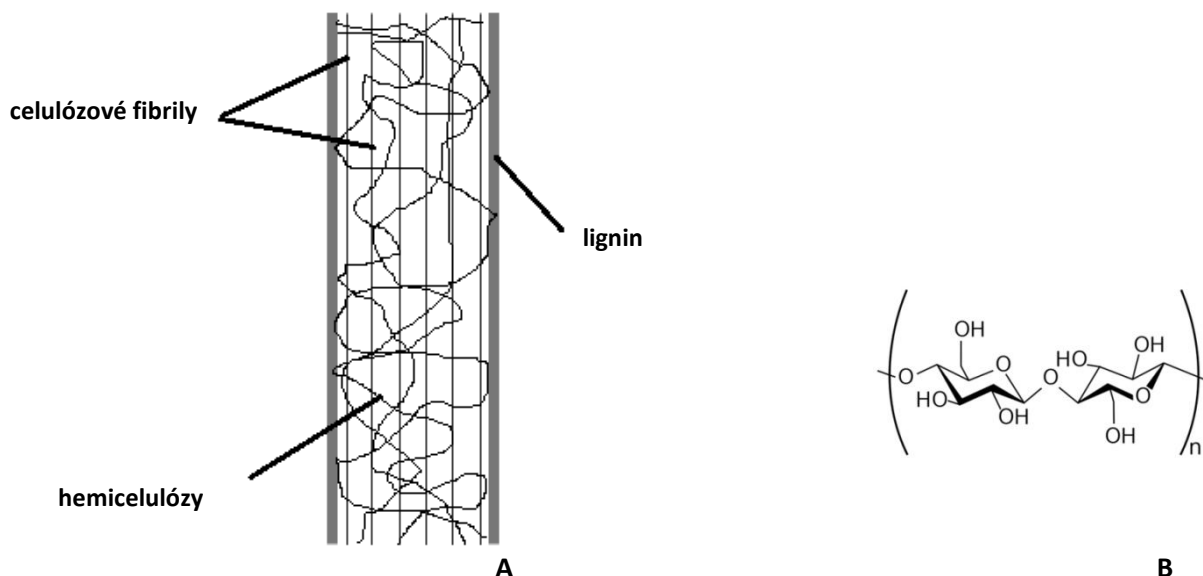
VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Celulóza je jednou z nejrozšířenějších látek na Zemi. Jedná se o komplexní polysacharid, který je tvořen opakujícími se podjednotkami glukózy. Díky tomu by mohla být celulóza potenciálně využitelná, jako zdroj uhlíku a energie pro různé biotechnologické procesy. Hlavním problémem jejího využití je však její velmi špatná rozložitelnost na základní podjednotky. V přírodě je navíc celulóza součástí kompaktního komplexu s hemicelulózami a ligninem, což její rozložitelnost ještě více znesnadňuje. V současnosti jsou uvažovány tři hlavní přístupy k využití lignocelulózových odpadů: enzymatická hydrolýza lignocelulózových substrátů, jejich gasifikace do podoby syntetického plynu (neboli syngasu) a přímá přeměna celulózy na konečný produkt pomocí celulytického organismu. Hlavními rozkladači celulózy v přírodě jsou především bakterie a houby. Bakterie rodu *Clostridium* jsou anaerobní, gram-pozitivní bakterie, které jsou hlavními rozkladači celulózy v anaerobních habitatech v přírodě (např. spodní vrstvy půdy, vodní sedimenty, trávicí trakt býložravých zvířat atd.). Jedná se o velmi málo prozkoumané mikroorganismy, které jsou schopné využít celulózu s vysokou efektivitou a produkovat např. organické kyseliny nebo ethanol. Celulytická klostridia jsou také důležitým modelem celulytických anaerobních bakterií.

Celulóza a lignocelulózový komplex

Celulóza je v přírodě velmi běžně se vyskytující látka, jelikož tvoří hlavní součást buněčných stěn vyšších rostlin. V přírodě se typicky nevyskytuje v čisté formě, ale jako jeden z komponentů velice rigidního komplexu zvaného lignocelulózový komplex. Tato velmi stabilní matrice je složena ze tří hlavních složek. Jedná se o celulózu, hemicelulózy a lignin. Tyto tři látky se v lignocelulózovém komplexu navzájem prostupují a tvoří složité struktury, jako jsou např. fibrily nebo pláty (Obr. 1). Celulóza je polysacharid složený z glukózových podjednotek, které jsou navzájem propojeny β -1,4 glykosidickou vazbou. Tyto podjednotky tvoří velmi dlouhé, zpravidla nerozvětvené řetězce. Hemicelulózy tvoří velmi heterogenní skupinu polysacharidů, jejichž základními podjednotkami jsou různé monosacharidy (glukóza, galaktóza, manóza atd.) a často i další látky, jako jsou např. uronové kyseliny. Řetězec hemicelulóz je také na rozdíl od celulózy častěji větvený. Lignin je náhodný kopolymer tvořený především z podjednotek 4-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapilalkoholu. Jedná se o hlavní komponentu především dřevnatých lignocelulózových substrátů, kterým lignin dodává vysokou tvrdost a pevnost. Lignin je velmi těžko rozložitelný a případné degradační produkty mají zpravidla silné antimikrobiální účinky (aromatické sloučeniny). Tvoří proto často tenký obal kolem vláken celulózy a hemicelulóz, čímž intenzivně zabraňuje rychlému mikrobiálnímu rozkladu těchto polysacharidů (Obr. 1).

Zastoupení zmíněných tří hlavních složek lignocelulózového komplexu je velice variabilní v závislosti na použitém substrátu¹ (Tab. I). Kromě tří zmíněných základních složek lignocelulózového komplexu se na jeho výstavbě podílí také mnoho dalších, minoritních složek. Sem patří například různé anorganické soli, oxidy křemíku, proteiny, jednoduché cukry a disacharidy atd.



Obrázek 1.: (A) typické uspořádání tří majoritních složek lignocelulózového komplexu (celulóza, hemizcelulóza a lignin). (B) struktura celobiózy (základní řetězcí se podjednotka celulózy).

Díky svému složení (z glukózových podjednotek) by mohla být celulóza využita, jako potenciální zdroj uhlíku a energie pro různé biotechnologické procesy, jako je např. výroba biopaliv pomocí bakteriální či kvasinkové fermentace. Lignocelulózový komplex (a koneckonců i celulóza samotná) je bohužel velmi špatně rozložitelný a pouze specializované organismy jsou schopny jeho rozkladu a využití, jako zdroje uhlíku a energie.

Tabulka I.

Příklady složení různých lignocelulózových substrátů. Zobrazené údaje jsou vyjádřeny v procentech celkové suché hmotnosti.

Materiál	Celulóza [%]	Hemicelulóza [%]	Lignin [%]
Dřevo listnatých stromů (průměrná hodnota)	43-47	25-35	16-24
Dřevo jehličnatých stromů (průměrná hodnota)	40-44	25-29	25-31
Pšeničná sláma	30-50	20-30	15
Ječná sláma	33-40	20-35	8-17
Proso	45	31	12
Stonky kukuřice	35	25	35
Traviny	25-40	35-50	10-30
Zelené řasy	20-40	20-50	NA
Papír	85-99	0	0-15
Dobytčí hnůj	2-8	2-4	3-6

NA: neobsahuje

Možnosti využití lignocelulózových substrátů

Jedním z přístupů k využití energie lignocelulózového komplexu, je jeho umělý rozklad (enzymatický či fyzikální) na lépe fermentovatelné sacharidy a jejich následná fermentace. Mezi tyto procesy patří především popsané metody chemicko-enzymatické hydrolýzy a zplyňování. Při chemicko-enzymatické hydrolýze je nejdříve lignocelulózový substrát ošetřen prvotní předúpravou (sušení, mletí, peletizace atd.), následně je upraven chemickou či fyzikální cestou pro lepší výtěžnost enzymatické hydrolýzy (parní expanze, kyselá/zásaditá hydrolýza) a nakonec rozložen na monosacharidy za přídavku enzymů (celulázy, hemicelulázy, amylázy atd.). Získaný hydrolyzát již obsahuje jednotky monosacharidů a lze ho využít k bakteriální či kvasinkové fermentaci. Mezi hlavní problémy tohoto procesu patří především vznik velkého množství inhibitorů, které následně brání růstu mikroorganismů a také poměrně vysoká cena použitých celuláz a dalších enzymů. Zplyňování (neboli gasifikace) je metoda založená na zahřívání lignocelulózového substrátu na vysoké teploty za přesně regulovaného přívodu vzduchu. Získaný plyn (tzv. syngas) je složen především z CO, CO₂ a H₂ a je využitelný, jako zdroj uhlíku a energie pro některé specializované mikroorganismy, jako jsou např. syngas-utilizující klostridia. Hlavním problémem výroby a fermentace syngasu je také poměrně vysoká cena samotného zpracování biomasy, ale především velmi pomalý růst mikroorganismů a pouze omezené spektrum získatelných substrátů.

Druhou možností je přímá přeměna celulózy na produkt pomocí celulytického organismu. Někdy se tento proces označuje, jako CBP („consolidated-bioprocessing) a jeho hlavní výhodou je provedení hydrolýzy i samotné fermentace v jednom kroku a pouze za pomoci vloženého mikroorganismu². To samozřejmě může vést k celkovému snížení nákladů. Hlavním problémem CBP je velice pomalý růst celulytických mikroorganismů a také malé výtěžky produktů.

Organismy podílející se na dekompozici lignocelulózových zbytků

V přírodě se v místech s přístupem kyslíku podílí na dekompozici lignocelulózového komplexu především specializované houby a různé aerobní druhy bakterií. V anaerobní zóně se potom na rozkladu podílí výhradně anaerobní bakterie. Mezi hlavní rozkladače celulózy v přírodě v různých anaerobních habitatech patří především některé bakterie rodu *Clostridium* (tzv. celulytická skupina klostridií).

Klostridia jsou gram-pozitivní, striktně anaerobní, sporotvorné bakterie, které se vyskytují hlavně v půdě, ale lze je nalézt prakticky ve všech habitatech obsahující zbytky rostlinné biomasy a naopak postrádající kyslík (vodní sedimenty, močály, trávicí trakt býložravců atd.). Dodnes bylo popsáno pouze několik druhů klostridií, které by byly schopny růstu *in vitro* a účinného rozkladu celulózy. Přehled nejvýznamnějších popsaných celulytických klostridií je uveden v tabulce II. Pro rozklad celulózy používají anaerobní mikroorganismy (na rozdíl od typické produkce extracelulárních hydroláz u organismů aerobních) membránově vázané struktury – tzv. celulosomy. Jedná se o systém proteinových kotev, které váží k membráně do těsné blízkosti vedle sebe různé enzymy nutné pro rozklad lignocelulózového komplexu (celulázy, hemicelulázy, enzymy rozkládající lignin atd.). Díky tomuto uspořádání může probíhat rozklad lignocelulózového substrátu velice efektivně. Navíc bylo prokázáno, že např. celulázy izolované z modelové bakterie *C. thermocellum* vykazují nejvyšší enzymatickou aktivitu ze všech doposud popsaných celuláz vůbec. Může se tedy také jednat o potenciální nový zdroj velmi účinných celuláz.

Klostridia obecně patří mezi druhy využitelné v biotechnologiích. Např. druhy patřící mezi tzv. solventogenní klostridia, jsou schopny produkovat organická rozpouštědla (butanol, ethanol) za pomoci ABE fermentace. Kyselinotvorná klostridia jsou zase potenciálně využitelná např. pro produkci kyseliny máselné. Celulolytická klostridia jsou potenciálně využitelná v CBP procesech např. pro produkci ethanolu či butanolu (Tab. II).

Mezi hlavní problémy využití celulolytických klostridií patří jejich poměrně pomalý růst a přirozeně nízká koncentrace vznikajících produktů (např. ethanolu). Problematický je také fakt, že se jedná o mikroorganismy stále poměrně špatně popsané a pochopené, což vede často např. k problémům během kultivace, složitý vývoj levného kultivačního média, složitou optimalizaci jejich růstu a rychlosti degradace lignocelulózových substrátů atd.

Tabulka II.

Nejvýznamnější, dosud popsané druhy celulolytických klostridií.

Druh	Teplotní opt.	Zdroj izolace	Hlavní produkty fermentace	Ref.
<i>C. cellulolyticum</i>	Mezofilní	Kompost	Acetát, ethanol	3
<i>C. cellulovorans</i>	Mezofilní	Čistící nádrž	Acetát, butyrát	4
<i>C. cellobioparum</i>	Mezofilní	Bachor skotu	Acetát, ethanol	5
<i>C. phytofermentans</i>	Mezofilní	Půda	Acetát, ethanol	6
<i>C. thermocellum</i>	Termofilní	Čistící nádrž	Acetát, ethanol, laktát	7
<i>C. papyrosolvans</i>	Mezofilní	Kompost	Acetát, ethanol, laktát	8
<i>C. josui</i>	Termofilní	Vodní sediment	Acetát, ethanol, butyrát	9
<i>C. termitidis</i>	Mezofilní	Termití trávicí trakt	Acetát, ethanol	10
<i>C. cellulosi</i>	Termofilní	Dobytčí hnůj	Acetát, ethanol	11
<i>C. lentocellum</i>	Mezofilní	Vodní sediment	Acetát, ethanol, laktát	12
<i>C. herbivorans</i>	Mezofilní	Prasečí trávicí trakt	Butyrát, formiát, ethanol	13

Literatura:

1. Sun Y., Cheng J. Y.: Bioresour. Technol. 83, 1 (2002).
2. Paulová L., Patáková P., Branská B., Rychtera M., Melzoch K. Biotechnol. Adv., in press.
3. Petitdemange E., Caillet F., Giallo J., Gaudin C.: Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 155 (1984).
4. Sleat R., Mah R. A., Robinson R.: Appl. Environ. Microbiol. 48, 88 (1984).
5. Hungate R. E.: J. Bacteriol. 48, 499 (1944).
6. Warnick T. A., Methe B. A., Leschine S. B.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1155 (2002).
7. Ng T. K., Weimer T. K., Zeikus J. G.: Arch. Microbiol. 114, 1 (1977).
8. Madden R. H., Bryder M. J., Poole N. J.: Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 87 (1982).
9. Sukhumavasi J., Ohmiya K., Shimizu S., Ueno K.: Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 179 (1988).
10. Hethener P., Brauman A., Garcia J. L.: Syst. Appl. Microbiol. 15, 52 (1992).
11. He Y. L., Ding Y. F., Long Y. Q.: Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 306 (1991).
12. Murray W. D., Hofmann L., Campbell N. L., Madden R. H.: Syst. Appl. Microbiol. 8, 181 (1986).
13. Varel V. H., Tanner R. S., Woese C. R.: Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 490 (1995).

Poděkování:

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/ 2015)

Metody kvantifikace a vizualizace biofilmů

E. Kvasničková, J. Masák

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Úvod

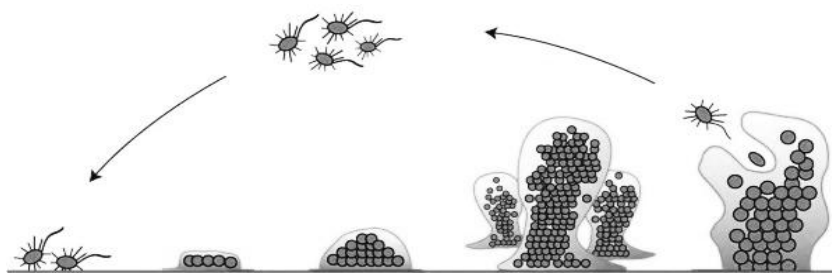
Biofilmy - kolonie pevně přichycené k povrchu a s typicky pozměněným fenotypem, rychlostí růstu a genovou transkripcí, mohou způsobovat vážné infekce, které se velice obtížně léčí díky zvýšené odolnosti těchto uskupení vůči antibiotikům. K pochopení vlastností a chování biofilmů, které by pomohlo v medicíně i jiných odvětvích, je tedy nutné tuto oblast dále důkladně studovat. V dnešní době již disponujeme značným množstvím kvantifikačních metod a zobrazovacích technik, které se nabízejí jako účinný nástroj k výzkumu biofilmů a je nezbytné si tyto metody řádně osvojit, případně je vhodně modifikovat pro zvýšení jejich využitelnosti.

Biofilm

Prokaryotní i eukaryotní buňky mají schopnost vytvářet přisedlá společenství na různých typech povrchů *in vitro*, stejně jako *in vivo*. Tomuto uskupení se obecně říká biofilm. Jedná se o konsorcium mikroorganismů jednoho i více druhů, které jsou obklopeny matricí extracelulárních polymerních látek (EPS), složených především z polysacharidů, proteinů a extracelulární DNA, jež mikroorganismy žijící ve formě biofilmu samy produkují. Díky této ochranné vrstvě jsou buňky biofilmu mimo jiné schopné mezi sebou vzájemně komunikovat. Matrice se dále také podílí na pevném přichycení k povrchu a napomáhá tak vytvářet trojrozměrnou strukturu biofilmu (Lappin-Scott a Costerton, 2003), díky níž jsou biofilm stabilní (Douglas, 2002).

Tvorba biofilmu (Obr. 1) začíná uchycením planktonních buněk na povrch prostřednictvím van der Waalsových sil. Pokud je tento krok úspěšný a mikroorganismus není odplaven, začne vazbu upevňovat, v případě bakterií např. pomocí pili. Následuje růst mikrokolonie, produkce ochranného slizového obalu (extracelulární matrix) a fáze zrání biofilmu (maturace). V poslední fázi tohoto cyklu se po kompletním vzniku biofilmu začnou uvolňovat jednotlivé buňky zpět do prostředí, aby mohlo dojít k osídlení dalších míst (Harding a kol., 2009).

V lidském těle se biofilmy vyskytují především na cizích tělesech, jako jsou kanyly, katétry nebo implantáty, kde mohou vyvolávat řadu obtížně léčitelných infekcí. Je však znám i pozitivní výskyt biofilmů v lidském těle, a to například na střevní sliznici. Ten je tvořen převážně symbiotickými bakteriemi, které zajišťují určitou formu ochrany člověka před patogenními mikroorganismy (Rulík a Holá, 2011).



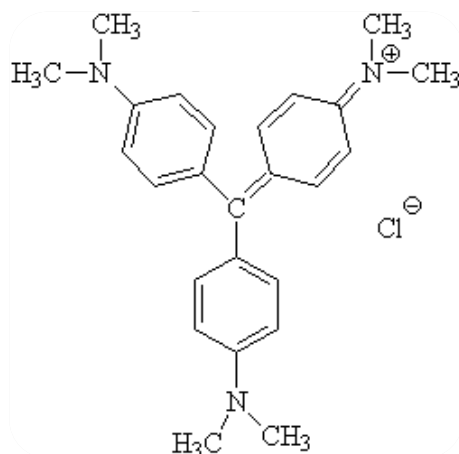
Obr. 1 Obecné schéma tvorby biofilmu (upraveno dle Emeryville Pharmaceutical Services, 2013)

Příklady metod pro kvantifikaci biomasy biofilmu

Existuje celá řada technik, které umožňují kvantifikovat biofilm. V této práci se zaměříme na dvě v současné době nejčastěji používané metody, které jsou pro jejich finanční nenáročnost a možnost použití pro vysoký počet vzorků při jedné analýze používány řadou vědeckých skupin při screeningových studiích zabývajících se například vlivem biologicky aktivních látek na tvorbu biofilmu. Jedná se o metodu barvení biofilmu krystalovou violetí a dále metodu XTT, které se vzájemně doplňují především proto, že krystalovou violetí můžeme obarvit veškeré struktury biofilmu, zatímco XTT metoda určí pouze množství buněk, které jsou v biofilmu metabolicky aktivní.

Barvení krystalovou violetí

Jak již bylo řečeno, tato nepřímá kvantifikační metoda dává informaci o celkovém obsahu biomasy. Jelikož bylo řadou experimentálních studií dokázáno, že molekula krystalové violeti (Obr. 2) je schopna vazby s nukleovými kyselinami, sacharidy, proteiny i řadou dalších struktur, je možné tvrdit, že tato metoda v případě barvení biofilmu kvantifikuje veškeré buněčné struktury živých i mrtvých buněk dohromady s množstvím EPS, které biofilm obalují.



Obr. 2 Struktura molekuly krystalové violeti (upraveno dle Wakelin a kol., 1981)

Vazba krystalové violeti na nukleové kyseliny

Studium vazby mezi trifenylmethanovými barvivy (např. krystalová violet) a deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) vyústilo v mnoho různých návrhů mechanismu jejich společné interakce.

Lerman a kol. (1961) zjistili, že vazba trifenylmethanových barviv zvýší viskozitu vzorku DNA srovnatelným způsobem jako působení akridinových barviv, a proto navrhovali, že se jedná o interkalační činidla. Dále tato publikace uvádí, že vazba na DNA výrazně snížila reaktivitu aminoskupin pararosnilinu (červené trifenylmethanové barvivo), což bylo bráno jako důkaz, že amonný kation je při vazbě alespoň částečně zanořen do dvoušroubovice DNA (Lerman a kol., 1961).

Armstrong a Panzer (1972) potvrdili zvyšování viskozity roztoku po vzniku interakce s DNA a navrhli možnost, že pararosnilin interkaluje do molekuly DNA takovým způsobem, že je vyloučena další interakce nejbližších tří okolních vazebných míst na obou stranách molekuly navázaného barviva. Jako další možnost navrhli formu interakce, při které nedochází ke zvyšování viskozity roztoku. Při tomto druhu vazby je molekula barviva externě přichycena na povrchu DNA helix (Armstrong a Panzer, 1972).

Podobně Müller a Gautier (1975) nesledovali při svých experimentech výrazný vliv krystalové violeti na viskozitu roztoku s DNA a potvrdili, že krystalová violet se váže nespecificky na povrch DNA. Kromě toho interaguje preferenčně se sousedícími A-T páry v molekule DNA (Wakelin a kol., 1981). Dále je také zcela zřejmé, že afinita k interakci krystalové violeti spolu k DNA či RNA je různá a přednostně vzniká komplex s na DNA (Wakelin a kol., 1981).

Tyto poznatky shrnuli Wakelin a kol., 1981 ve své práci. Krystalová struktura trifenylmethyl perchloridu podle nich ukazuje, že se jedná o symetrický karbonylový ion ve tvaru vrtule, se třemi koplanárními centrálními vazbami na aromatické kruhy, které mezi sebou uzavírají úhel 54°. Struktura této molekuly se významně liší od vzájemně spojených aromatických kruhů běžných interkalačních činidel. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že interkalace tohoto karbonylového ionu je ze sterických důvodů vyloučena. Další významná odlišnost trifenylmethylových barviv, od běžných interkalačních sloučenin, je jejich tendence hromadit zbytkový náboj na para- substituentech, v případě krystalové violeti v symetrickém uskupení základních center. Tento model by mohl vést k vysvětlení mechanismu interakce těchto barviv s molekulou DNA jiným způsobem, než je interkalace (Wakelin a kol., 1981).

Vazba krystalové violeti na proteiny

Santhanalakshmi a Balaji, 2001 sledovali vazbu krystalové violeti na lidský sérový albumin a mléčný protein kasein. Ukázalo se, že krystalová violet je schopná vazby na tyto proteiny. Pravděpodobným mechanismem této vazby jsou hydrofobní interakce. V obou případech byla vazba krystalové violeti na lidský sérový albumin i kasein označena jako monovrstevná povrchová vazba.

Kromě toho také krystalová violet způsobuje kaskádovou koagulaci lidského sérového albuminu, která je vyvolána právě přítomností opačně nabitých molekul ve vodě rozpustného barviva, ale nezpůsobuje dimerizaci kaseinu. V přítomnosti NaCl je podpořena vazba krystalové violeti na kasein, což znamená, že iontová síla roztoku ovlivňuje míru vazby tohoto barviva. Velké rozdíly ve způsobu ovlivnění přítomnosti roztoku krystalové violeti u těchto dvou testovaných proteinů naznačují, že sekundární projevy této vazebné interakce také hrají svou roli při těchto reakcích (Santhanalakshmi a Balaji, 2001).

Vazba krystalové violeti na sacharidy

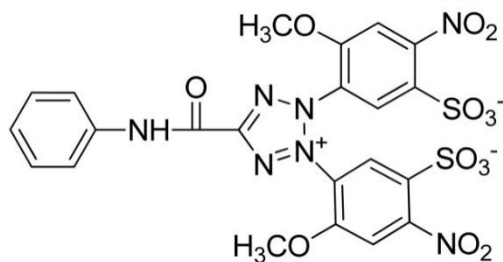
Sun a kol., 2007 sledovali vazbu krystalové violeti na heterogenní směs sulfonových polysacharidů - heparin. Zjistili, že negativně nabitě molekuly heparinu mohou interagovat s kladně nabitými molekulami krystalové violeti a vznikají tedy elektrostatické interakce. Směs polysacharidů ve vazbě s tímto barvivem mění absorpční maximum roztoku krystalové violeti, které je běžně 580 nm (Sun a kol., 2007).

Určení metabolické aktivity buněk pomocí XTT metody

Tato kolometrická metoda využívající redukce transparentního roztoku tetrazoliové soli XTT (2,3-bis-(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilidová sůl) (Obr. 3) na barevný formazan je přímo úměrná koncentraci životaschopných buněk v roztoku, v němž k této reakci dochází. Metabolicky aktivní buňky jsou totiž schopné za pomoci dehydrogenas (mitochondriální dehydrogenasy, sukcinát-oxidasové systémy cytochromu P450 či flavoprotein oxidasova aktivita) enzymaticky štěpit XTT na ve vodě rozpustný produkt – formazan. Za normálních okolností je tato reakce velice pomalá (trvá až 24 hodin), ale díky přidavku menadionu dochází k významnému zrychlení procesu na řádově několik minut (v závislosti na množství přidaného menadionu). Přídavek menadionu vyvolá tvorbu

superoxidu, jehož přítomnost způsobí urychlení celé reakce (Singh a kol., 2011). Přesný mechanismus tohoto účinku není zcela znám, ale bylo navrženo, že menadion může být přeměněn pomocí různých flavoenzymů (např. NADPH cytochrom P-450 reduktasa, NADH cytochrom B5 reduktasa a NADH-ubichinon reduktasa) na semichinon, který je poté konvertován v přítomnosti kyslíku na chinon, čímž vzniká vysoce reaktivní superoxid (Castro a kol., 2008). Druhou variantou je neenzymatická reakce menadionu s různými thiolý přítomnými v buňkách za vzniku již zmiňovaného semichinonu (Schopfer a kol., 2008).

Při kvantifikaci množství biofilmu touto metodou může docházet k nepřesnostem, protože spodní vrstvy zralého biofilmu bývají často v klidové formě a tudíž nevykazují příliš vysokou metabolickou aktivitu. Z tohoto důvodu byl experimentálně sledován vliv přidavku glukosy při přeměně XTT na formazan a ukázalo se, že tento způsob může minimalizovat chyby této metody (da Silva a kol., 2008).



Obr. 3 Struktura molekuly XTT (da Silva a kol., 2008)

Příklady zobrazovacích technik pro vizualizaci biofilmu

Vývoj zobrazovacích technik započal již v roce 1665, kdy britský geolog Robert Hooke sestavil první optický mikroskop, se kterým pozoroval plísň. Od tohoto významného milníku optické mikroskopie došlo k obrovskému rozvoji této oblasti. V současné době známe techniky, jako jsou magnetická rezonanční mikroskopie, skenovací transmisní rentgenová mikroskopie, skenovací elektronová či transmisní elektronová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil nebo jedna z nejnovějších a především pro sledování biofilmů velice vhodná možnost - konfokální laserová mikroskopie (Pawley, 2010).

Konfokální mikroskop s rotujícími disky

Konfokální mikroskopie s rotujícími disky (SDCM) je poměrně nová metoda, která potlačuje některé nevýhody klasické konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM). Obecný princip konfokální mikroskopie spočívá ve snímání jedné vrstvy vzorku, tedy fokální roviny. Všechny ostatní vrstvy jsou díky průchodu skrz fokální šterbinu odstíněny. Je možné nasnímat několik vrstev vzorku a ty poté pomocí softwaru poskládat do 3D rekonstrukce. Této možnosti se s výhodou využívá právě při studiu biofilmů, jejichž rozvinutou 3D strukturu je většinou ostatních mikroskopických technik jen velmi obtížné sledovat. Oproti poměrně drastickému a především velice zdlouhavému skenování vzorku bod po bodě, ke kterému dochází u CLSM spočívá SDCM ve snímání většího počtu malých osvětlených bodů na povrchu vzorku. Daná místa jsou následně zobrazována na řadu dírek v rotujícím disku. Díky tomu je zcela odstíněna nežádoucí fluorescence z míst mimo záběr vzorku. Použití prostorového filtru umožňuje snímat i matné vzorky, u kterých to doposud nebylo možné a výrazně rozšiřuje možnosti využití této techniky (Cohen, 2014).

Literatura

- Armstrong R. W., Panzer N. M. (1972) A comparison of the interaction of an acridine dye and a triphenylmethane dye with deoxyribonucleic acid, *Journal of the American Chemical Society* 94, s. 7650-7653.
- Castro F. A. V., Mariani D., Panek, A. D., Eleutherio, E. C. A., Pereira, M. D. (2008) Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS ONE* 3, s. 1-6.
- Douglas J. L. (2002) *Candida* biofilms and their role in infection, *Trends in Microbiology* 11, 30-36.
- Emeryville pharmaceutical services, <http://www.emerypharmaservices.com/blog/eps-offers-quantitative-biofilm-models-for-todays-research-needs>, dostupné online 1. 6. 2015.
- Harding, M. W., Marques, L. L. R., Howard, R. J., Olson, M. E. (2009) Can filamentous fungi form biofilms ?, *Trends in Microbiology* 17, s. 475-480.
- Lappin-Scott, H. M.; Costerton, J. W. (2003) *Microbial Biofilms*. Cambridge University Press, Spojené Království, 310 stran.
- Lerman, L. S. (1961) Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, *Journal of Molecular Biology* 10, s. 367-380.
- da Silva W. J., Seneviratne J., Parahitiyawa N., Rosa E. A. R., Saranayake L. P., Del Bel Cury A. A. (2008) Improvement of XTT Assay Performance for Studies Involving *Candida albicans* Biofilms, *Brazilian Dental Journal* 19, s. 362-369.
- Muller, W., & Gautier, F. (1975) Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. A - T-specific non-intercalating DNA ligands, *European Journal of Biochemistry* 54, s. 385-394.
- Pawley J. (2010) *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer Science & Business Media, New York, s. 2765-2766.
- Santhanalakshmi J., Balaji S. (2001) Binding studies of crystal violet on proteins, *Colloids and Surfaces A* 186, s. 173-177.
- Schopfer, P., Eiri, H., Friedel, D., Anja, K. L., 2008. Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean.
- Singh U., Akhtar S., Mishra A., Sarkar D. (2011) A novel screening method based on menadione mediated rapid reduction of tetrazolium salt for testing of anti-mycobacterial agents, *Journal of Microbiological Methods* 84, s. 202-207.
- Wakelin L. P. G., Adams A., Hunter C., Waring M. J. (1981) Interaction of Crystal Violet with Nucleic Acids, *Biochemistry* 20, s. 5779-5787.

Produkce rhamnolipidů a jejich charakteristika

Ježdík R., Masák J.

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Surfaktanty jsou amfifilní molekuly obsahující hydrofilní a hydrofobní část. Díky jejich struktuře jsou surfaktanty schopné se vázat na mezifázové rozhraní dvou nemísitelných kapalin (olej/voda, voda/vzduch), tímto snižují povrchové a mezifázové napětí těchto fází a umožňují tvorbu emulze (Desai a Banat., 1997). Chemické surfaktanty jsou produkovány jako vedlejší produkty petrochemického průmyslu, převážně obsahují anionické alkybenzen sulfonáty, nebo neionické alkyphenol ethoxyláty. Chemické surfaktanty jsou velice rozšířené v širokém spektru aplikací. Jsou například hojně využívány jako mycí prostředky. Ačkoli, jsou tyto látky velmi levné a účinné, tvoří negativní zátěž pro životní prostředí (Gutnick a kol., 2011). Biosurfaktanty jsou strukturně velice rozmanitá skupina povrchově aktivních látek produkovaných mikroorganismy. Oproti chemickým surfaktantům mají mnoho výhod, například nízká toxicita, vysoká degradabilita, stability v širším rozmezí pH a salinity, což umocňuje jejich potenciál pro využití v ochraně životního prostředí (Desai a Banat, 1997). Avšak ochrana životního prostředí není jediné odvětví, kde lze biosurfaktanty využít, nízká akutní toxicita vůči savcím buňkám umožňuje jejich použití například v kosmetice nebo lékařství (Sarkar a kol., 1989). Nejprostudovanějšími biosurfaktanty jsou rhamnolipidy, glykolipidy obsahující jednu či dvě hydroxy mastné kyseliny a jednu případně molekuly rhamnosy (Soberon-Chavéz a kol., 2005). Produkce těchto látek je nejčastěji spojována s bakteriálním rodem *Pseudomonas*, konkrétně s potenciálním patogenem *Pseudomonas aeruginosa*, avšak v dnešní době je známa řada dalších producentů jako například *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Nocardioides* sp., *Pseudoxanthomonas* (Rooney a kol., 2009).

Produkce rhamnolipidů je ovlivněna mnoha faktory zahrnující kompozici kultivačního média (zdroje C, N, P, stopové prvky), vedení kultivace (teplota, pH, aerace) a produkční mikroorganismus (Santos a kol., 2002). Tyto faktory neovlivňují pouze množství produkovaných rhamnolipidů, ale také mají významný vliv na složení rhamnolipidové směsi (Soberon-Chavéz a kol., 2005).

Tento výzkum je zaměřen vliv typu zdroje uhlíku na charakteristické vlastnosti rhamnolipidové směsi produkované bakteriálním producentem *Enterobacter hormaechei* B-59185.

Materiál a Metody

Použitý mikroorganismus

Při sledování produkce rhamnolipidů a jejich fyzikálně chemických vlastností byly použity kmen *Enterobacter hormaechei* B-59185 získaný ze sbírky: ARS Culture Collection, Bacterial Foodborne Pathogens and Mycology Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, USA.

Použitá média

L-Broth médium: 10 g/l Trypton, 5 g/l kvasinkový extrakt, 10 g/l NaCl

Médium pro produkci rhamnolipidů v **g/l**: KH_2PO_4 3,4; K_2HPO_4 4,4; NaNO_3 9,5; KCl 1,1; NaCl 1,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,00028; MgSO_4 0,224; kvasničný extrakt 0,5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,00029; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,00025; $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,00024; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,00017.

Zdroj uhlíku: citrát sodný nebo glycerol v ekvivalentním molárním poměru vztaženého ke zdroji dusíku. Citrát sodný 66,35 g/l, glycerol 41,5 g/l.

Použité metody

Příprava inokula

200 ml sterilního komplexního média (živný bujón, L-B médium) bylo inukolováno buněčnou populací z kryokonzervy a kultivováno na třepačce 100 ot/min, 48 hodin při teplotě 30 °C. Získaná buněčná populace byla separována centrifugací (10000 g, teplota 10 °C, 10 min.) promyta sterilním minimálním médiem. Následně byla tato buněčná suspenze použita k zaočkování média pro produkci rhamnolipidů.

Baňkové kultivace pro produkci buisurfaktantu

Kultivace v Erlenmayerových baňkách (500 ml) probíhala za aerobních podmínek na třepačce (100 ot/min) ve sterilním minimálním médiu o objemu 200 ml při konstantní teplotě (30 °C). K inokulaci byla použita promytá buněčná suspenze. Baňky byly zaočkovány, tak aby hodnota optické density (OD_{400}) byla $0,2 \pm 0,02$.

Stanovení rhamnosy (Dubois, 1956)

Množství rhamnolipidu bylo stanoveno nepřímo stanovením obsahu rhamnosy. Množství rhamnolipidu je přímo úměrné množství stanovené, koeficient pro přepočet mezi oběma látkami se liší dle zastoupení jednotlivých složek ve směsi v závislosti na poměru jejich molárních hmotností ku molární hmotnosti rhamnosy.

Rhamnosa byla stanovena fenol-sírovou metodou pro stanovení sacharidů, která je založena na barevné kondenzaci sacharidů s fenolem za přítomnosti koncentrované kyseliny sírové. Výsledné zabarvení směsi bylo měřeno pomocí spektrofotometru, závislost hodnoty absorbance je lineární v rozmezí 0 - 80 mg/l sacharidu.

K 1 ml roztoku rhamnosy/ odstředěného vzorku buněčné suspenze byl přidán 1 ml 5 % roztoku fenolu a následně 5 ml koncentrované H_2SO_4 . Směs byla promíchána a ponechána 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla promíchána a vložena do termostatu na 20 minut při teplotě 30 °C. Byla měřena absorbance směsi při 480 nm proti referenčnímu vzorku, který byl připraven stejným způsobem, místo roztoku rhamnosy byl použit stejný objem destilované vody.

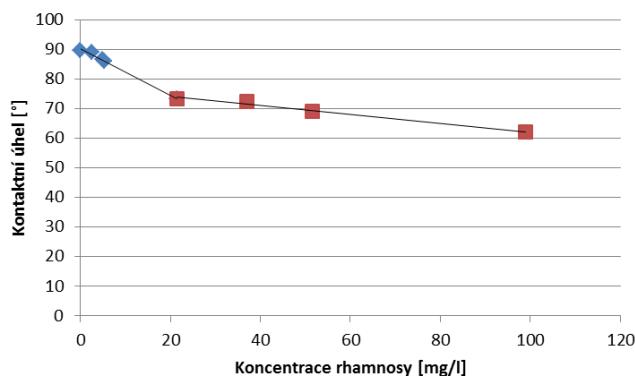
Izolace rhamnolipidu

Směs rhamnolipidů byla izolována srážením v kyselém prostředí pH 2 – rhamnolipidy se stávají nerozpustnými (Abdel-Mawgoud a kol., 2009). Po ukončení kultivace byla buněčná suspenze odstředěna. Supernatant byl po separaci ochlazen na 4 °C a následně okyselen kyselinou chlorovodíkovou na pH 2, při kterém se vysrážela směs produkovaných rhamnolipidů. Okyselený roztok se ponechal v klidu a chladu 12 hodin, poté byl odstředěn. Sedlina, která obsahovala směs rhamnolipidů, byla lyofilizována. Z lyofilizátu byly rhamnolipidy získány extrakcí organickými rozpouštědly Methanol:chloroform 1:1. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno.

Stanovení kritické micelární koncentrace

Kritická micelární koncentrace (KMK) byla stanovena z grafického vyjádření, závislosti kontaktního úhlu na koncentraci rhamnosy. Pro odhad kritické micelární koncentrace byly použity údaje z literatury (Abdel-Mawgoud a kol., 2009). Preparáty rhamnolipidu byly rozpuštěny v destilované vodě. Ředěním bylo vytvořeno více různých koncentrací, část roztoků v koncentraci pod KMK a část roztoků nad KMK.

Jednotlivé roztoky rhamnolipidu byly kapány na polystyrenovou destičku. Kapka roztoku na povrchu destičky byla vyfotografována a získaný obraz následně vyhodnocen v programu CAM 2008. Z naměřených hodnot kontaktního úhlu (Obr. 1) jednotlivých roztoků byl sestaven graf, mající dvě části, oblast pod KMK a nad KMK, obě části byly proloženy s využitím lineární regrese a v průsečíku přímek byla odečtena KMK.



Obr. 1: Příklad grafického stanovení kritické micelární koncentrace pomocí kontaktního úhlu.

Emulzifikace

Emulzifikační aktivita rhamnolipidu byla stanovena podle Pornsunthorntawe (2008). 0,8 ml vodného roztoku obsahujícím 0,5 g/l rhamnosy bylo smícháno s 1,2 ml organické sloučeniny (ropa, slunečnicový olej, hexan a ethylacetát). Směs byla v úzké zkumavce 1 minutu třepána a následně ponechána odstát při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Následně byla změřena výška celého sloupce a výška emulze. Emulzifikační index byl spočítán vydělením výšky emulzifikované vrstvy výškou celého sloupce a vynásobením této hodnoty stem. Každý pokus byl proveden v pěti paralelních měřeních.

Oil-displacement test

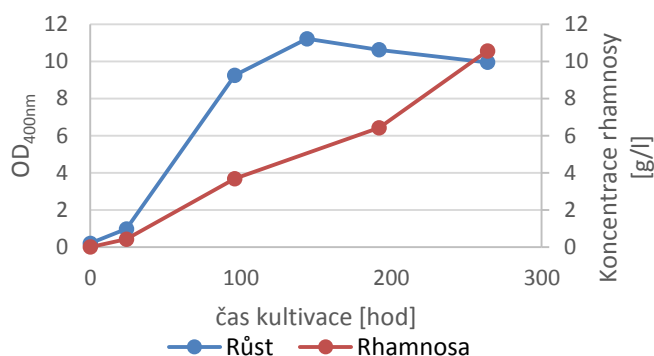
Do velké Petriho misky (průměr cca. 25 cm) bylo nalito přibližně 100 ml vody. Do ní bylo pipetováno 80 μ l surové ropy, která na povrchu vytvořila film. Do středu bylo nakápnuto 20 μ l vodného roztoku rhamnolipidu o koncentraci 0,5 g(rhamnosy)/l. Petriho miska byla položena na milimetrový papír a vyfotografována fotoaparátem AIAF Power Shot A620 a byl změřen průměr čiré zóny. U každého rhamnolipidu bylo provedeno osm opakování

Výsledky

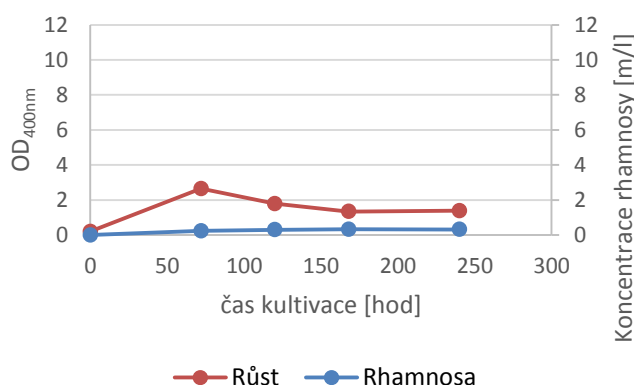
Vliv zdroje uhlíku na růst a produkci rhamnolipidů

Pro sledování vlivu zdroje uhlíku na charakteristické vlastnosti rhamnolipidové směsi byly zvoleny citrát sodný a glycerol. Tyto látky byly v médiu obsaženy ve shodném molárním poměru ke zdroji dusíku C/N.

Z grafického vyjádření růstové křivky a křivky produkce rhamnolipidu (Obr. 2) je patrné, že při použití glycerolu jako zdroje uhlíku je dosaženo 10,5 g/l rhamnosy za přibližně 250 hodin kultivace, zatímco v případě použití citrátu sodného jako zdroje uhlíku (Obr. 3) bylo dosaženo pouze 0,32 g/l rhamnosy za stejný časový úsek kultivace. Z těchto výsledků lze konstatovat, že glycerol zastoupený ve stejném molárním množství je vhodnější zdroj uhlíku pro produkci rhamnolipidů tímto mikroorganismem.



Obr. 2. ■ Růstová křivka *E. hormaechei* ■ koncentrace rhamnosy při použití glycerolu o koncentraci 41,5 g/l jako zdroje uhlíku



Obr. 3. ■ Růstová křivka *E. hormaechei* ■ koncentrace rhamnosy při použití dihydrátu citrátu sodného o koncentraci 66,35 g/l jako zdroje uhlíku.

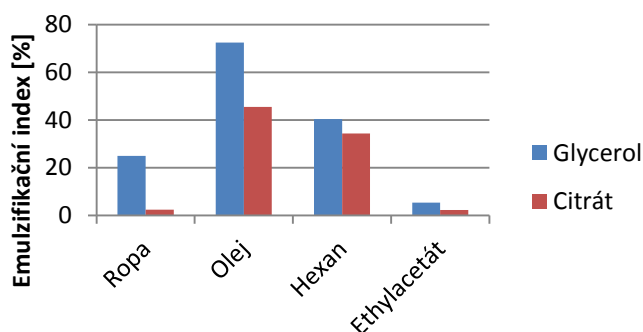
Stanovení charakteristických vlastností

Z výsledků kritické micelární koncentrace (Tab. I), je patrné, že rhamnolipid produkovaný použitým kmenem v přítomnosti glycerolu jako zdroje uhlíku dosahuje velice nízké hodnoty (5,6 mg/l), oproti 20,5 mg/l v případě použití citrátu sodného jako zdroje uhlíku. Z těchto výsledků lze konstatovat, že rhamnolipid produkovaný na glycerolu je výrazně účinnější, jak vyplývá z definice kritické micelární koncentrace.

Tab. I: Kritická micelární koncentrace rhamnolipidů produkovaných *E. hormaechei* v závislosti na zdroji uhlíku v produkčním médiu.

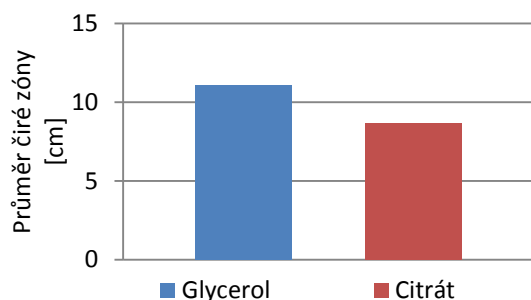
	Kritická micelární koncentrace [mg/l]
glycerol	5,6
citrát sodný	20,5

Mezi charakteristické vlastnosti rhamnolipidů je řazeno stanovení emulsifikačního indexu. Jak vyplývá z grafického vyjádření (obr.4), že bakterie *Enterobacter hormaechei* B-59185 je schopna při kultivaci na glycerolu jako zdroji uhlíku produkovat rhamnolipid, který vykazuje vyšší emulsifikační index na všech emulgovaných látkách. V případě emulgate slunečnicového oleje bylo v případě použití rhamnolipidu produkovaného na glycerolu dosaženo 72 % stability emulze, zatímco při použití citrátu jako zdroje uhlíku bylo dosaženo přibližně 45%.



Obr. 4 Stanovení emulzifikačního indexu rhamnolipidů produkovaných bakterií *Enterobacter hormaechei* B-59185, v přítomnosti různých zdrojů uhlíku (glycerol a citrát sodný).

Doplňkovým testem pro stanovení efektivnosti surfaktantů je oil displacement test. Tento test je založen na tvorbě čiré zóny přidávkou surfaktantu na hladinu vody s filmem hydrofobní kapaliny. Čím je dosaženo většího průměru čiré zóny, tím je surfaktant účinnější. Z grafického vyjádření (Obr. 5) vyplývá, že rhamnolipid produkovaný bakterií *Enterobacter hormaechei* B-59185 vykazuje vyšší aktivitu v tomto testu a dosahuje průměru čiré zóny 11 cm.



Obr. 5 Oil displacement test rhamnolipidů produkovaných bakterií *Enterobacter hormaechei* B-59185, v přítomnosti různých zdrojů uhlíku (glycerol a citrát sodný).

Závěr

Při sledování vlivu zdroje uhlíku na produkci rhamnolipidu a následně na vlastnosti naprodukované rhamnolipidové směsi byla zjištěna tato fakta. Za prvé, pro produkci rhamnolipidů, z hlediska maximalizace produkce je vhodnější použít glycerol jako zdroj uhlíku. Za druhé, naprodukované rhamnolipidy byly podrobeny testům na stanovení charakteristických vlastností surfaktantů. Z výsledků plyne, že rhamnolipid produkovaný na glycerolu vykazuje vyšší povrchovou aktivitu než rhamnolipid produkovaný na citrátu a to ve všech testech.

Literatura

- Desai J. D., Banat, I. M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, str. 47–64.
- Gutnick D. L., Bach, H. (2011) Biosurfactants. *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed.; Murray Moo-Young: Burlington, Chapter 3.59, str. 699–715.
- Rooney A. P., Price N. P. J., Ray K. J., Kuo T.-M. (2009) Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiol. Lett.*, 295, str. 82–87.
- Santos, A. S., Sampaio, A. P. W., Vasquez, G. S., Santa Anna, L. M., Pereira, N., & Freire, D. M. G. (2002). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98, 1025–1035.
- Sarkar, A. K., Goursaud, J. C., Sharma, M. M., & Georgiou, G. (1989). A Critical-Evaluation of Meor Processes. *In Situ*, 13(4), 207–238.
- Soberón-Chávez G., Lépine F., Déziel E. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, str. 718–725.

Antimikrobiální účinky nanočástic

Pádrová K., Čejková A.

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Úvod

Vývoj rezistentních či multi-rezistentních kmenů patogenních mikroorganismů, které působí vážné potíže nejen v oblasti medicíny, nutí k vývoji modifikovaných či zcela nových účinných látek. Nicméně hledání nových látek, případně chemická modifikace stávajících, nezaručí snížení rozvoje rezistence u patogenů (Huh a kol., 2011). Vznik rezistence představuje proces vývoje a adaptace mikroorganismů v reakci na selektivní tlak určité látky, a proto vývoj látek nových možná vyřeší stávající komplikace spojené s rezistencí, ale může také způsobit vznik nových rezistentních kmenů (Rice, 2009).

V souvislosti s touto problematikou je dnes stále více diskutována možnost aplikace některých typů nanočástic, jako možné alternativy tradičních léčivých přípravků. Nanočástice, díky své velikosti, disponují fyzikálně-chemickými vlastnostmi odlišujících je od svých makroskopických analogů. Velikost částic v rozmezí od 1 do 100 nm umožňuje relativně snadný průnik buněčnými membránami do cytosolu, kde mohou dále interagovat s buněčnými komponenty. Naproti tomu, velký specifický povrch usnadňuje jejich interakce s buněčným povrchem (Blecher a kol., 2011). Nesporná výhoda nanočástic spočívá v komplexním mechanismu jejich působení. Přestože podrobný popis všech možných účinků nanočástic na exponovanou buňku je stále předmětem výzkumu, je zřejmé, že nanočástice interferují s více buněčnými pochody současně. Proto pravděpodobnost vývoje mikroorganismů rezistentních vůči účinkům nanočástic je téměř nulová. Mezi další výhody patří také lepší dlouhodobá stabilita nanočástic, vyšší odolnost či nižší cenová náročnost na výrobu než u komerčně dostupných antibiotik. Rovněž případné komplikace spojené s nízkou účinností, specifitou či vyšší mírou nežádoucích vedlejších účinků daného typu nanočástic je možné vyřešit relativně snadnou přípravou různě povrchově modifikovaných analogů (Huh a kol., 2011). Nanočástice lze také využít jako nosiče pro běžně užívaná léčiva, čímž může být posílena nejen jejich účinnost, ale také cílení a biodistribuce v organismu (Zhang a kol., 2010).

Příkladem nanočástic s prokázanou antimikrobiální aktivitou jsou například nano-Ag, nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-CuO (Hajipour a kol., 2012; Rice, 2009). V některých případech byl popsán antimikrobiální účinek nano-Au, respektive nanočástic obsahujících zlato. Samotné nano-Au nedisponují příliš vysokou antimikrobiální aktivitou. Nicméně jsou známy případy, kdy právě povrchovou modifikací nano-Au antibiotikem byl zvýšen účinek tohoto antibiotika vůči původně již rezistentnímu bakteriálnímu kmenu (Pelgrift a kol., 2013).

Z hlediska silného antimikrobiálního chování nanočástic jsou dnes především diskutovány nanočástice stříbra. Často jsou používány například v textilním průmyslu, bývají součástí preparátů na čištění vody nebo obalových materiálů (Rai a kol., 2009). Antimikrobiální charakter nano-Ag byl prokázán proti některým multirezistentním kmenům patogenů, mezi které patří *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus* nebo zástupci rodu *Candida* (Durán a kol., 2010; Panacek a kol., 2009). Jejich účinek byl dokonce popsán i vůči některým virům (Galdiero a kol., 2011).

Materiál a metody

Modelové mikroorganismy

Jako modelové mikroorganismy byly použity G- bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (NRRL B-59188) a kvasinka *Trichosporon cutaneum* (CCY 30.5.10). Mikroorganismy byly kultivovány v komplexním mediu, L-broth medium pro bakterii a živný bujon pro kvasinku.

Nanočástice nano-Au a nano-Ag

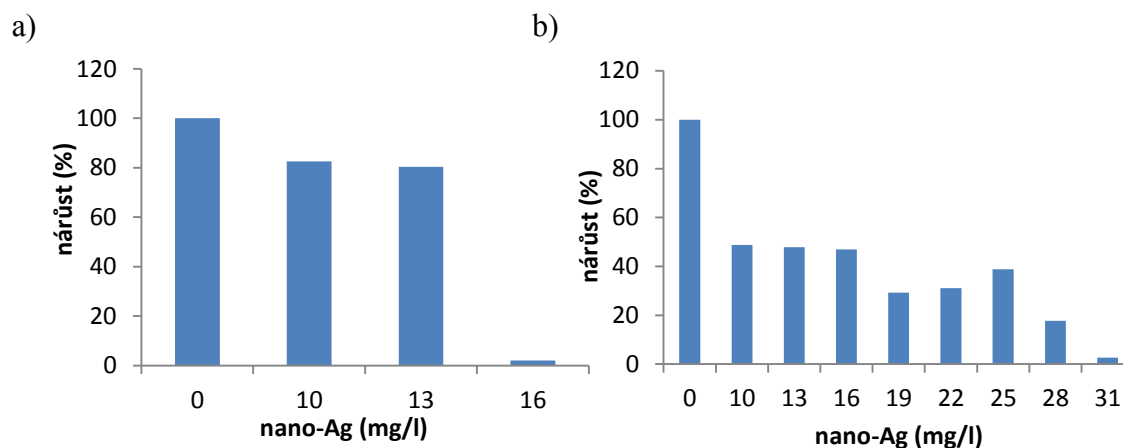
Vodné suspenze obou studovaných typů nanočástic (nano-Ag, nano-Au) byly stabilizovány přidavkem polyethylenglykolu (10 obj. %). Střední velikost nanočástic 20 nm. Nanočástice byly připravené doc. Ing. Petrem Slepíčkou, Ph.D. (Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT).

Screeningové experimenty

Screeningové experimenty byly zaměřené na stanovení minimálních inhibičních koncentrací pro studované nanočástice u modelových mikroorganismů. Experimenty probíhaly v mikrotitračních destičkách v mikrokultivačním zařízení Bioscreen C při kultivační teplotě 30 °C.

Výsledky a diskuze

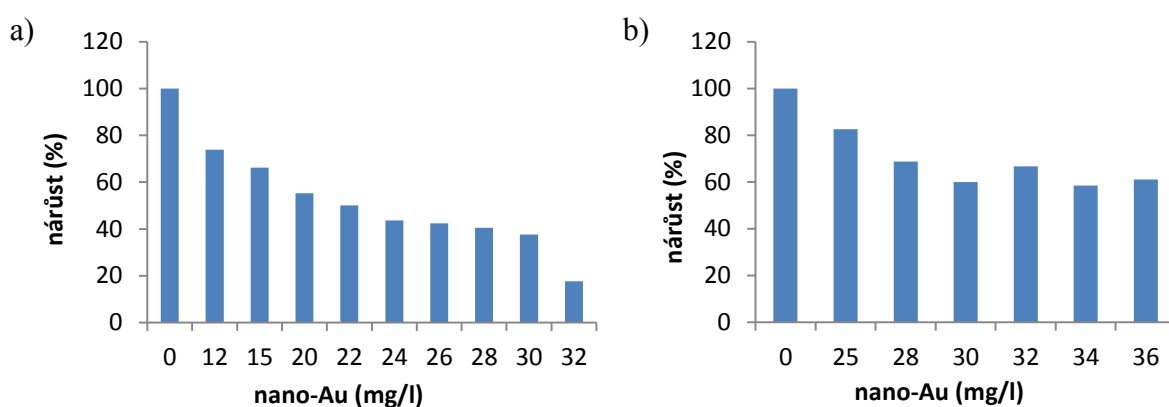
Obr. 1a 2 ilustruje účinek vybraných typů nanočástic na modelové mikroorganismy. Jedná se o screeningové experimenty, které byly provedeny za účelem stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC), a z naměřených hodnot bude vycházeno při navazujících experimentech. Měření potvrdila silný antimikrobiální účinek nano-Ag. V případě *P. aeruginosa* byla stanovena MIC již po expozici 16 mg/l nano-Ag, nárůst biomasy byl po 24 hodinové kultivaci necelá 2 % v porovnání s kontrolní populací (obr. 1 a). Výrazná inhibice růstu byla zaznamenána i u studované kvasinky *T. cutaneum*, 50 % poklesu nárůstu již po expozici 10 mg/l nano-Ag (obr. 1 b). Přesto hodnoty MIC bylo dosaženo až při koncentraci 31 mg/l (nárůst 2,7 %).



Obr. 1 a, b. Vliv různých koncentrací nano-Ag na růst modelových mikroorganismů; a) G- bakterie *Pseudomonas aeruginosa*; b) kvasinka *Trichosporon cutaneum*.

Mechanismus účinku nano-Ag je založen na adsorpci nanočástic na buněčnou membránu, kde v důsledku interakcí s proteiny vázající ve své molekule síru dochází k narušení její permeability. Zároveň nanočástice penetrují do cytosolu, kde interagují s dalšími makromolekulami, především DNA. Působení nano-Ag vede rovněž k poškození dýchacího řetězce. Toxické působení je ještě umocněno uvolňováním Ag^+ ionty, které indukují produkci reaktivních forem kyslíku (Huh a kol., 2011; Rai a kol., 2009).

Experimenty s nano-Au (obr. 2 a, b) potvrdily výrazně nižší antimikrobiální účinek tohoto typu nanočástic (Pelgrift a kol., 2013). U bakterie *P. aeruginosa* byl růst výrazněji inhibován až po expozici vyšším koncentracím a MIC nano-Au byla stanovena pro koncentraci 32 mg/l. V případě kvasinky (obr. 2 b) neměla žádná z testovaných koncentrací nano-Au výrazný toxický účinek. Byla pozorována pouze mírná inhibice růstu. Nárůst při maximální testované koncentraci (36 mg/l) byl 61 % v porovnání s kontrolní populací.



Obr. 2 a, b. Vliv různých koncentrací nano-Au na růst modelových mikroorganismů; a) G- bakterie *Pseudomonas aeruginosa*; b) kvasinka *Trichosporon cutaneum*.

Účinek jednotlivých typů nanočástic na mikroorganismy se značně liší. Závisí například na velikosti, tvaru nebo povrchovém náboji nanočástic. Například obecně platí, že s klesající velikostí nanočástic, roste jejich toxicita vůči exponovaným buňkám. Rovněž druh daného mikroorganismu a jeho aktuální fyziologický stav má značný vliv na rozsah toxického působení nanočástic. Mnohem citlivější jsou buňky prokaryotních mikroorganismů v porovnání s eukaryoty (Seil a kol., 2012). Potenciální aplikace nanočástic je proto vždy potřeba prozkoumat na konkrétním případě.

Závěr

Provedené experimenty jsou pouze pilotními testy, které mapují účinek vybraných typů nanočástic, které budou v budoucnu rozšířeny ještě o další typy (nano-Pd, nano-Pt). Účinky jednotlivých typů nanočástic budou porovnány nejen z hlediska jejich účinku na buněčnou viabilitu, ale také z hlediska vybraných projevů jejich působení (např. schopnost indukovat oxidativní stres). Získané výsledky budou rovněž použity jako vstupní informace pro studium účinků nanočástic na mikrobiální biofilmy.

Literatura

- Blecher, K., Nasir, A. a Friedman, A.: Virulence, 2, (2011).
- Durán, Nelson, Marcato, Priscyla D, Conti, Roseli De, Alves, Oswaldo L, Costa, Fabio a Brocchi, Marcelo. Journal of the Brazilian Chemical Society, 21, (2010).
- Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Cantisani, M., Marra, V. a Galdiero, M.: Molecules, 16, (2011).
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., Jimenez de Aberasturi, D., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J. a Mahmoudi, M.: Trends Biotechnol, 30, (2012).
- Huh, A. J. a Kwon, Y. J.: J Control Release, 156, (2011).
- Panacek, A., Kolar, M., Vecerova, R., Pucek, R., Soukupova, J., Krystof, V., Hamal, P., Zboril, R. a Kvitek, L.: Biomaterials, 30, (2009).
- Pelgrift, R. Y. a Friedman, A. J.: Adv Drug Deliv Rev, 65, (2013).
- Rai, M., Yadav, A. a Gade, A.: Biotechnol Adv, 27, (2009).
- Rice, L. B.: Current Opinion in Microbiology, 12, (2009).
- Seil, J. T. a Webster, T. J.: Int J Nanomedicine, 7, (2012).
- Zhang, L., Pornpattananankul, D, Hu, C-MJ a Huang, C-M. Current medicinal chemistry, 17, (2010).

Modelová predikce a skutečná adheze bakterií kazících pivo na koloidní částice nerezové oceli

Martina Brožová, Tomáš Brányik

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Striktně anaerobní bakterie rodu *Pectinatus* a *Megasphaera* představují v pivovarském průmyslu stále větší riziko a to díky dnešnímu trendu co nejvíce snížit obsah rozpuštěného kyslíku v pivu, za účelem zajištění jeho dlouhodobé senzorické a koloidní stability. Vychází se z předpokladu, že tyto anaerobní bakterie mohou dlouhodobě přežívat i v aerobním pivovarském prostředí, díky své schopnosti vytvářet, nebo se inkorporovat do mikrobiálních biofilmů. Adhezi mikroorganismů na pevný substrát lze považovat za přírodní formu imobilizace buněk a způsob přežití v nepříznivém prostředí. Porozumění a předpověď mechanismů uskutečňujících adhezi buněk na nosič vede k usnadnění kontroly mikrobiální kontaminace, k navržení účinnějšího způsobu, jakým předejít adhezi mikroorganismů, a k účinnějšímu předcházení poškození některých provozních zařízení. Cílem předložené práce bylo vyjádřit schopnost buněk bakterií *Pectinatus frisingensis* DSM 20465 a *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 interagovat s nerezovou ocelí. K predikci mikrobiální adheze na nano částice nerezové oceli byl použit model XDLVO a metody měření kontaktních úhlů a zeta potenciálu. Výsledky matematické predikce byly porovnány s výsledky reálné adheze zkoumaných bakterií na nano částice nerezové oceli. Bylo zjištěno, že účinnost separace závisí na přidaném množství nano částic nerezové oceli a na iontové síle a pH prostředí. Podle XDLVO teorie lze nejsilnější interakce mezi buňkami zkoumaných bakterií a nano částicemi nerezové oceli předpokládat v 10 mM roztoku KCl při pH 3 a pH 7. Tyto předpoklady byly potvrzeny i experimentálním ověřením adhezními testy. U *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 se reálná adheze buněk shoduje s predikcí adheze podle teorie XDLVO pro všechna testovaná prostředí. U *Pectinatus frisingensis* DSM 20465 se reálná adheze buněk shoduje s predikcí adheze podle teorie XDLVO pouze u 10 mM roztoků KCl. Z výsledků tedy obecně vyplývá, že je teorie XDLVO dobrým nástrojem pro pochopení fyzikálně-chemické podstaty adheze mikroorganismů. Je ovšem nutné brát v potaz, že tato teorie pracuje s řadou zjednodušujících předpokladů a že se reálné systémy nechovají ideálně.

Kutinázy v nových průmyslových aplikacích

Hana Bahounková, Jan Páca

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Kutináza z *Thermobifida cellulosilytica* byla rekombinantně exprimována v *Escherichia coli* BL21 (DE3) a porovnána s kutinázou z *Humicola insolens* pro různé aplikace. Hlavním cílem bylo nalezení potenciálu pro průmyslové využití. Byla prokázána schopnost kutinázy recyklovat syntetické polymery. Vysoký enzymsubstrátový poměr vedl při hydrolýze ke vzniku TA se vzrůstající inkubační dobou. S nízkými poměry byly pozorovány změny po delší inkubační době. Účinek přídavku dimethylsulfoxidu na hydrolýzu byl patrný po delším čase. Polyethylentereftalátový film byl kutinázou funkcionalizován. Bylo prokázáno, že kutináza vykazuje rozdílné vlastnosti při formování povrchových reaktivních skupin. Zvýšení hydrofilicity bylo stanoveno kontaktními úhly. Nejvyšší dosažený úbytek byl 28.4°. Kutináza má rovněž potenciál pro hydrolýzu kyseliny poly-L-mléčné, při které bylo dosaženo nejvyššího úbytku kontaktního úhlu 45,82° po 24 h a po delší době hodnoty již nebyly detekovatelné z důvodu vysoké hydrofilicity. Kutináza byla také z 99,84 % úspěšně imobilizována a poté katalyzovala polyesterovou syntézu, poly(1,4-butylen-adipátu) s M_n 137 g/mol. Výsledky byly na závěr porovnány s dostupnou literaturou.

Zvýšení trvanlivosti nefiltrovanosti piva pomocí vysokého hydrostatického tlaku

Markéta Ivanišová, Pavel Dostálek

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Nefiltrované pivo se vyznačuje obsahem živých kvasinek a proto je doba jeho trvanlivosti omezená. Klasická tepelná pasterace pro zvyšování trvanlivosti tohoto nápoje není vhodná, jelikož působení vysoké teploty vede nevyhnutelně k destrukci kvasinek, což nepříznivě ovlivňuje sensorický profil. Pro účely této práce byly pro tlakovou pasteraci nefiltrovaného piva vybrány dvě metody, které jsou průmyslově používány pro zvyšování biologické stability džusů a ovocných šťáv. Jednalo se o ošetření 400 MPa po dobu 25 minut a 550 MPa po dobu 10 minut. U takto ošetřených vzorků byl proveden mikrobiologický rozbor zaměřený na množství a viabilitu pivovarských kvasinek i kontaminujících mikroorganismů a GC-MS analýza sensoricky aktivních těkavých látek (alkoholů, karbonylů, esterů a organických kyselin). Poslední část této práce byla věnována sensorickému hodnocení tlakem ošetřených piv prostřednictvím trojúhelníkového testu shodnosti a deskriptivní analýzy, zaměřené zejména na intenzitu ovocné, kvasnicové, autolyzační, oxidační, lepenkové a máselné chutě piva.

Identifikace produktů termických a oxidačních reakcí polyfenolů ječmene a chmele

Aneta Lučoková, Marcel Karabín

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Tato diplomová práce byla věnována studiu degradačních reakcí polyfenolových sloučenin sladu a chmele v modelových a čtvrtprovozních podmínkách. V modelových experimentech byla u 21 polyfenolových sloučenin sledována míra degradační reakce a vznik nových produktů, k jejichž identifikaci bylo využito kombinace HPLC s UV detekcí a UHPLC s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií. U pěti zkoumaných polyfenolů byla prokázána úplná degradace za daných podmínek a u dalších devíti přesahovala míra degradace 70 rel. %. Bylo zjištěno, že na míru termické a oxidativní degradace polyfenolů má zásadní vliv nejen teplota prostředí a koncentrace kyslíku, ale i počet a poloha navázaných substituentů, případně také vzdálenost karboxylové skupiny od aromatického jádra fenolových kyselin. Výsledky modelové studie byly ověřeny i v reálných podmínkách čtvrtprovozních sladovacích pokusů. Byl potvrzen rozhodující vliv dotahování na obsah polyfenolů, nicméně velmi významný je i vliv podmínek klíčení, zejména s ohledem na uvolňování polyfenolových látek z vazby na ostatní složky zrna.

Mikrobiální produkce kyseliny jantarové

Adéla Urbanská, Jan Kolek, Petra Patáková

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Kyselina jantarová je součástí citrátového cyklu a ve formě sukcinátu nebo sukcinyl-CoA je přítomna téměř ve všech mikrobiálních, rostlinných a živočišných buňkách. Je používána jako antimikrobiální agens, regulátor kyselosti a má významný stabilizační účinek na aminokyseliny a vitaminy, čímž zvyšuje jejich využitelnost. Pravděpodobně nejznámějším producentem této kyseliny je bakterie *Actinobacillus succinogenes*, izolovaná z bachoru, která tvoří kyselinu jantarovou za anaerobních podmínek, obvykle zároveň s tvorbou kyseliny octové, mravenčí a mléčné. Uvádí se, že kyselina jantarová se tvoří za současné spotřeby CO₂ a sacharidického zdroje uhlíku. Experimenty však bylo zjištěno, že vysoké koncentrace (28,9 g/l), kyseliny jantarové se dosáhne i bez probublávání bioreaktoru pomocí CO₂. Výťažnost produkce kyseliny jantarové při tomto experimentu byla 39,7 % s produktivitou 0,7 g/l/h. Po kultivaci bez probublávání CO₂ byla jediným vedlejším produktem, pouze kyselina octová v koncentraci 6,37 g/l. V bioreaktoru s probubláváním CO₂ byla na konci experimentu přítomná vedle kyseliny jantarové o koncentraci 14,88 g/l, také kyselina octová o koncentraci 6,63 g/l a kyselina mléčná o koncentraci 12,37 g/l.

Úvod

Poslední dobou jsou mezi nejvýznamnějšími producenty kyseliny jantarové uváděny bachorové bakterie, proto jsme se v práci zabývali kultivací bakterie *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 v bioreaktorech a možnostmi jejího využití pro produkci kyseliny jantarové. Tyto kultivace byly realizovány za i bez dodávání oxidu uhličitého jako substrátu pro fosfoenolpyruvát karboxykinázu. Dále bylo produkční médium modifikováno za účelem zjednodušení a zlevnění. Bakterie *Actinobacillus succinogenes* byla kultivována také na médiích s hydrolyzátem peří a slámy, jako potenciálními zdroji dusíku a uhlíku. Získané vzorky byly analyzovány pomocí metody HPLC, čímž byly stanoveny koncentrace jednotlivých produkovaných kyselin a zbytkové glukózy.

Materiál a metody

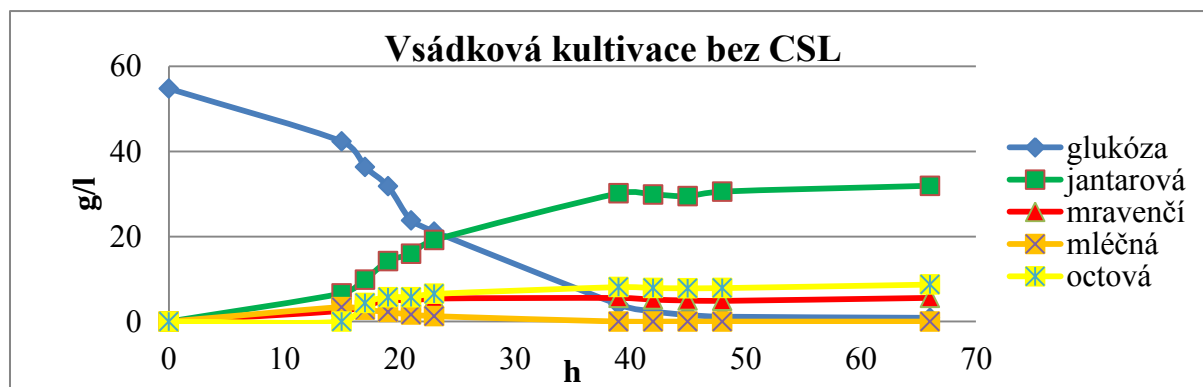
Pro vsádkové a přítokované kultivace v bioreaktorech byla použita bachorová bakterie *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 ze sbírky mikroorganismů „American Type Culture Collection“ (ATCC), jež byla uchovávána ve formě kryokonzerv. Bakterie *Actinobacillus succinogenes* byla kultivována v inokulačním thioglykolátovém médiu a následně v produkčním médiu o složení uvedeném v Tab. I. Kultivace probíhala nejprve anaerobně v tekutém inokulačním médiu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin a následně byla přeočkovávána do tekutých médií v Erlenmeyerových baňkách nebo do vsádkových či přítokovaných bioreaktorů. V bioreaktorech byly kultivace vedeny za i bez přístupu oxidu uhličitého po dobu až 72 hodin. Regulace pH byla zajišťována hydroxidem sodným a míchání bylo nastaveno na 350 otáček za minutu. Z důvodu sledování možné kontaminace a pozorování nárůstu bakterie byla v průběhu experimentu prováděna mikroskopická kontrola.

Tab. I: Produkční médium pro kultivaci bakterie *Actinobacillus succinogenes* (složení je uvedeno v g/l)

PRODUKČNÍ MÉDIUM	
Glukóza	60 g
kvasničný extrakt	14,5 g
kukuřičný výluh	12 g
KH_2PO_4	3 g
K_2HPO_4	1,5 g
NaCl	1 g
MgCl_2	0,3 g
CaCl_2	0,3 g
Voda	1000 ml

Výsledky

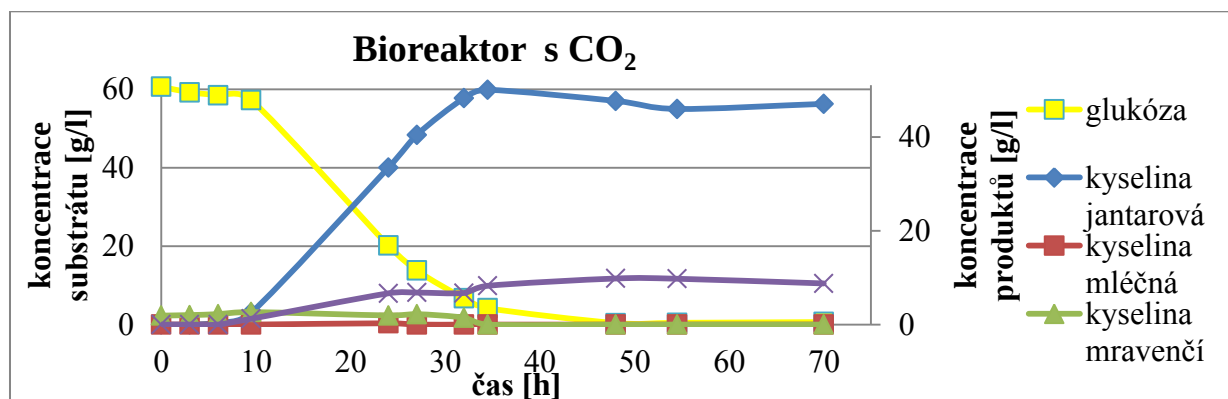
Při kultivaci bakterie *Actinobacillus succinogenes* se při modifikaci produkčního média, jako možné vhodné osvědčilo i médium bez kukuřičného výluhu, přičemž průběh vsádkové kultivace je zobrazen na Obr. č. 1.



Obr. č. 1: Průběh vsádkové kultivace bez kukuřičného výluhu

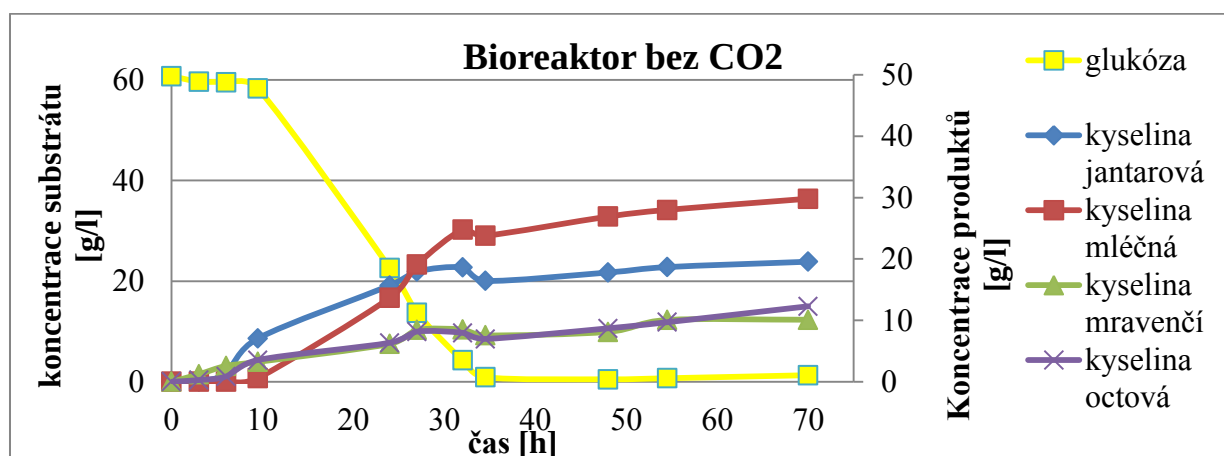
Při kultivacích na médiích z hydrolyzátů perí a slámy bohužel nebyla prokázána jejich vhodnost jako produkčního média pro produkci kyseliny jantarové.

Vsádková kultivace s dávkováním oxidu uhličitého byla provedena s počáteční koncentrací glukózy 60 g/l. Její průběh je znázorněn v grafu na Obr. č. 2, přičemž byla vedena až do 70-té hodiny, ale již ve 35-té hodině bylo dosaženo koncentrace kyseliny jantarové 50 g/l. Jediným vedlejším produktem byla pouze kyselina octová o koncentraci necelých 10 g/l.



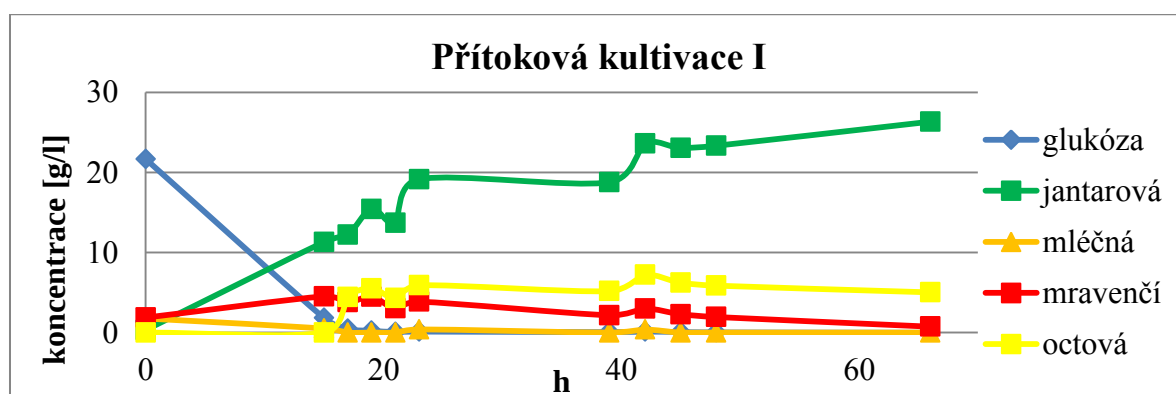
Obr. č. 2: Graficky znázorněný průběh kultivace ve vsádkovém bioreaktoru s přísunem CO₂.

Při kultivaci bez dodávání oxidu uhličitého byla výsledná koncentrace kyseliny jantarové, při stejné počáteční koncentraci glukózy 60 g/l, dle předpokladu vycházejícího z metabolismu bakterie *Actinobacillus succinogenes*, výrazně nižší než při kultivaci s oxidem uhličitým. Koncentrace kyseliny jantarové dosahovala maximálně necelých 20 g/l, přičemž nebyla majoritním produktem, kterým se stala kyselina mléčná o koncentraci téměř 30 g/l. Vedlejším produktem byla také kyselina octová, která dosahovala koncentrace 12 g/l. Celkový průběh kultivace je vyobrazen v grafu na Obr. č. 3.



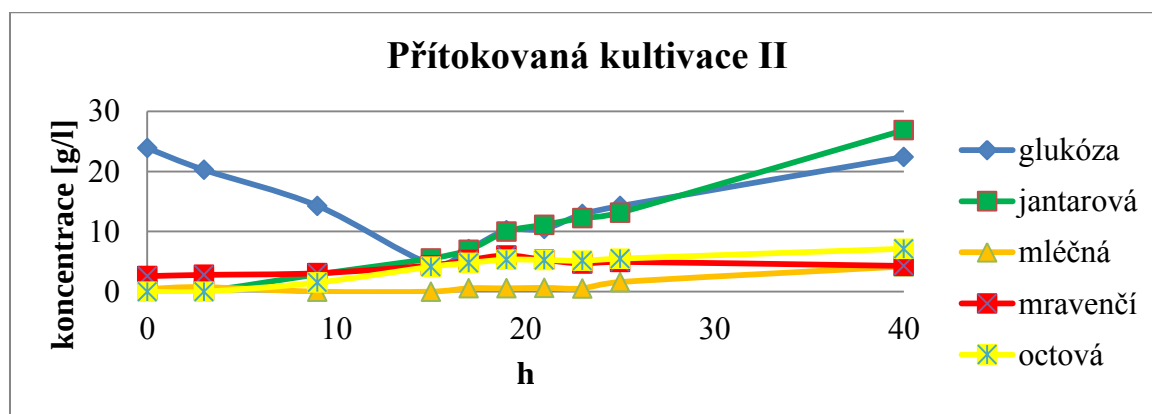
Obr. č. 3: Průběh vsádkové kultivace bez přísunu oxidu uhličitého.

Při přítokované kultivaci byla počáteční vsádková koncentrace glukózy 25 g/l a následně bylo mezi 15-tou a 25-tou hodinou přítokováno vždy 2,75 g/l/h glukózy. Přítokování glukózy bylo navrženo dle spotřeby glukózy v obdobných časových intervalech při vsádkové kultivaci. Glukóza byla beze zbytku spotřebována, avšak nepotvrdila se větší vhodnost přítokované kultivace oproti vsádkové z důvodu omezené limitace substrátem, jelikož konečné koncentrace kyseliny jantarové dosahovaly 27 g/l, jak je patrné v grafu na Obr. č. 4.

Obr. č. 4: Přítokovaná kultivace bakterie *Actinobacillus succinogenes*.

Při další přítokované kultivaci byla na počátku vsádka glukózy o koncentraci 25 g/l a následně mezi 15-tou a 25-tou hodinou bylo přítokováno vždy 3 g/l/h glukózy a mezi 25-tou a 40-tou hodinou přítokováno 0,725 g/l/h. Přítokování glukózy bylo zvýšeno z důvodu úplného spotřebování substrátu v předchozím měření. Kultivace byla vedena do 40-té hodiny a

glukóza za tuto dobu nebyla spotřebována. Konečná koncentrace kyseliny jantarové dosahovala 27 g/l, jak je patrné v grafu na Obr. č. 5.



Obr. č. 5: Průběh přítokované kultivace s celkovou koncentrací glukózy téměř 60 g/l.

Diskuze a závěr

Při kultivaci kmene *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 v Erlenmeyerových baňkách v pozmeněném produkčním médiu byl pozorován zřetelný nárůst. Následná analýza odebraných vzorků ukázala, že produkční médium bez kukuřičného výluhu by mohlo být téměř stejně tak vhodným pro produkci kyseliny jantarové pomocí *Actinobacillus succinogenes*, jako originální produkční médium. Koncentrace kyseliny jantarové v původním médiu dosahovala 17,9 g/l a koncentrace v médiu bez kukuřičného výluhu až 17,1 g/l. Při vsádkové kultivaci v bioreaktoru s počáteční koncentrací glukózy 60 g/l a s dávkováním oxidu uhličitého byl potvrzen předpoklad vysoké produkce kyseliny jantarové; až 50 g/l s minimem vedlejších produktů, vyvozený z metabolického schématu bakterie, kdy je oxid uhličitý významným regulátorem reakce katalyzované fosfoenolpyruvát karboxykinázou. To také souhlasí s údaji v literatuře (McKinlay et al., 2007, Zou et al., 2011). Zároveň kultivace v bioreaktoru bez dávkování oxidu uhličitého korespondovala s těmito předpoklady, jelikož bylo dosaženo necelých 20 g/l kyseliny jantarové, přičemž majoritním produktem byla kyselina mléčná o koncentraci až 30 g/l. Na základě výsledků z kultivací v Erlenmeyerových baňkách byl navržen a proveden experiment v bioreaktorech na produkčním médiu bez kukuřičného výluhu. Počáteční koncentrace glukózy byla pro následné porovnání stejně jako u předchozích kultivací v bioreaktorech 60 g/l. Bylo dosaženo koncentrace kyseliny jantarové okolo 30 g/l, což je nesrovnatelné 50 g/l kyseliny jantarové vyprodukované v klasickém produkčním médiu, avšak na druhou stranu je kukuřičný výluh jednou s nejdražších složek média, tedy náklady na produkci byly takto výrazně sníženy.

Podle rychlosti spotřeby glukózy v průběhu vsádkové kultivace byly navrženy přítokované kultivace, jež byly realizovány s počáteční vsádkou glukózy 25 g/l. Při přítokovaných kultivacích bylo dosaženo koncentrace kyseliny jantarové 27 g/l, přičemž výtěžnost kyseliny jantarové byla pouze necelých 50 %, avšak u původní vsádkové kultivace byla dosažena výtěžnost 83 %. Nepotvrdil se tedy předpoklad větší vhodnosti přítokované kultivace z důvodu snížení inhibice substrátem, resp. glukózou.

Literatura

Blackburn T. H., Hungate R.E.: Succinic acid turnover and propionate production in the bovine rumen. Appl. Microbiol. 11 (2), 132-135 (1963).

Guettler, D.; Jain, M. K.: Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants US 5573931 A, Nov 12, 1996.

McKinlay J. B., Shachar-Hill Y., Zeikus J. G., Vieille C.: Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ¹³C-labeled metabolic product isotopomers. Metabolic Engineering 9, 177–192 (2007).

National Center for Biotechnology Information.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=339671&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (accessed Feb 09, 2015).

Russell, J.: Rumen. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition) 163–174 (2009).

Song H., Jang S. H., Park J. M., Lee S. Y.: Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. Biochemical Engineering Journal 40, 107–115 (2008).

Song H., Lee S. Y.: Production of succinic acid by bacterial fermentation. Enzyme Microb. Technol. 39, 352–361 (2006).

Zeikus J. G., Jain M. K., Elankovan P.: Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. Applied Microbiology and Biotechnology 51, 545–552 (1999).

Zheng P., Dong J., Sun Z., Ni Y., Fang L.: Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. Bioresource Technology 100, 2425–2429 (2009).

Zou W., Zhu L. W., Li H.-M., Tang Y.-J.: Significance of CO₂ donor on the production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618. Microbial Cell Factories 10:87 (2011).

Produkce mastných kyselin psychrofilními kvasinkami

Veronika Zajícová, Irena Kolouchová

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Mastné kyseliny jsou významné sloučeniny s širokým uplatněním. Mezi nejzajímavější mastné kyseliny patří esenciální mastné kyseliny $\omega 3$ a $\omega 6$. Tyto kyseliny mají významné postavení ve výživě člověka, a proto se využívají jako doplněk stravy. Mezi významné esenciální mastné kyseliny patří linolová (18:2), α -linolenová (18:3), arachidonová, eikosa-pentaenová (EPA) a dokosa-hexaenová (DHA). V dnešní době jsou tyto mastné kyseliny získávány především z ryb. Nicméně stále stoupá zájem o výzkum nových zdrojů pro jejich výrobu. Mezi možné alternativy by se mohly zařadit psychrofilní kvasinky. Psychrofilní kvasinky si vyvinuly řadu mechanismů, které jim umožňují adaptaci na chladné prostředí. Mezi tyto mechanismy také patří vyšší obsah nenasycených mastných kyselin v buněčné membráně. V předložené práci jsme se proto zaměřili na studium profilu mastných kyselin u vybraných psychrofilních kvasinek *Cryptococcus vistoriae*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Holtermanniella wattica*, *Kondoa malvinella*, *Mrakiella aquatica*, *Mrakiella cryoconiti* a *Rhodotorula lignophila* získaných ze sbírky DBVPG Industrial yeast collection, a *Trichosporon* sp. izolované z jeskyně Domica na Slovensku. V první části experimentální práce byl sledován růst studovaných mikroorganismů v závislosti na čtyřech teplotách (4 °C, 10 °C, 20 °C a 28 °C). Druhá část práce je pak věnována kvantitativní a kvalitativní analýze lipidů v získané biomase.

Vliv nanočástic železa na růst mikrobiálních populací

Bajerová K., Pádrová K., Čejková A.

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

ÚVOD

Nanočástice železa našly své uplatnění především při řešení problematiky remediací kontaminovaného prostředí, v porovnání s ostatními dekontaminačními technologiemi se jedná o technologie účinné, rychlé a cenově dostupné. Díky rychlému rozvoji nanotechnologií se aplikace nanočástic železa postupně rozšířily i do dalších oborů, mezi nimiž jsou například farmaceutické obory a nanomedicína. Unikátní vlastnosti nanočástic železa závisí nejen na jejich tvaru a velikosti, ale také na povrchových modifikacích, a všechny tyto faktory umožňují aplikaci různých typů nanočástic železa pro dané, specifické účely (Calero M. a kol., 2014; Cundy A. B. a kol., 2008). Malé rozměry, velký specifický povrch a vysoká reaktivita nanočástic železa nulové valence však zároveň negativně ovlivňují jejich biologickou aktivitu. Přestože podrobný mechanismus, jakým nanočástice železa působí na buňky, zatím nebyl zcela objasněn, je zřejmé, že klíčovou úlohu hraje schopnost nanočástic indukovat vznik reaktivních forem kyslíku, jejichž nadměra může v buňkách zapříčinit vznik oxidativního stresu. Oxidativní stres lze vyjádřit jako nerovnováhu mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a schopností degradovat nebo opravovat chyby jimi způsobené, tedy pokud buňky nadále nemohou regulovat množství reaktivních forem kyslíku, může docházet k různým interakcím s biomolekulami (lipidy, proteiny i DNA), v krajních případech až k buněčné smrti. (Keenan Ch. R. a kol., 2009; Kunwar A. a kol., 2011; Lushchak V., 2001). Aby nebylo narušeno mikrobiální společenství v remediované půdě, je snaha snížit cytotoxicitu nanočástic železa a zároveň zachovat jejich účinnost pro dekontaminace. Toho lze dosáhnout například zabráněním interakcí nanočástic železa s buňkou. V této souvislosti se jako jedna z možností protekce nabízí aplikace huminových látek, které jsou přirozenou součástí organické hmoty a ochotně se váží na buněčný povrch (Chen J. a kol., 2011; Johnson R. L. a kol., 2009; Kosobucki P. a Buszewski B., 2014).

METODY

Pomocí komerčně dostupných nanočástic železa NANOFE 25 (NanoFe 25) od firmy Nanoiron s.r.o. (Česká republika) byla u kvasinky *Trichosporon cutaneum* (CCY 30.5.10) zkoumána míra oxidativního stresu stanovením vybraných projevů oxidativního stresu – peroxidace lipidů, hladiny karbonylovaných proteinů, aktivita superoxiddismutasy (SOD) a míry akumulace reaktivních forem kyslíku (ROS). Jako protektanty vůči toxickému působení nanočástic byly použity huminové kyseliny (HK) (SJ02b/oA a V00A1). HK byly získány izolací z oxyhumolitu, který pocházel z odlišných lokalit České republiky (Výzkumný ústav anorganické chemie, a.s. Ústí nad Labem).

Buněčná populace byla vystavena účinkům studovaných látek vždy na konci exponenciální fáze buněčného růstu. Následně byly buňky odděleny centrifugací (9000g, 10 min), promyty a převedeny do 10 ml 0,05 M fosfátového pufru (PB). Buňky byly

zkoumány v různém uspořádání experimentů – působení samotného NanoFe 25 (do PB přidáno NanoFe 25 a buněčná suspenze $OD_{400} = 0,600 \pm 0,005$); současné působení NanoFe 25 a HK (do PB přidáno NanoFe 25, HK a buněčná suspenze $OD_{400} = 0,600 \pm 0,005$); působení NanoFe na preinkubované buňky s HK (do PB přidána HK a buněčná suspenze $OD_{400} = 0,600 \pm 0,005$, buňky byly preinkubovány 15 min, poté byly odstředěny (9000 g, 10 min, 10 °C) a následně resuspendovány v 10 ml PB, k takto připravené buněčné populaci bylo přidáno NanoFe 25); preinkubace NanoFe 25 s HK a následné působení na buněčnou populaci (do PB přidáno NanoFe 25 a HK, po 15 min preinkubace byly nanočástice separovány centrifugací (9000 g, 10 min, 10 °C), poté byla přidána buněčná suspenze $OD_{400} = 0,600 \pm 0,005$). Vždy bylo přidáváno NanoFe 25 a HK tak, aby výsledná koncentrace NanoFe 25 byla 1 g/l a výsledná koncentrace HK 0,3 g/l. Účinkům studovaných látek byly buněčné populace vystaveny po dobu 15, 30 a 60 min, po uplynutí příslušného časového intervalu byla buněčná populace odstředěna (9000g, 10 min, 10 °C). Pro účel stanovení produktů lipoperoxidace, karbonylace a stanovení aktivity SOD byla provedena dezintegrace buněk.

Pro **stanovení produktu lipoperoxidace** byl jako standard použit malondyaldehyd, nejběžnější produkt lipoperoxidace. Malondyaldehyd reaguje s kyselinou 2-thiobarbiturovou za vzniku barevného aduktu. K 1 ml dezintegrovaných buněk byl přidán 1 ml roztoku thiobarbiturátu (0,029 M kyseliny 2-thiobarbiturové v 8,75 M kyselině octové), směs byla uzavřena bakteriologickým uzávěrem, inkubována 60 min při 95 °C a následně prudce zchlazena na ledu. K chladné směsi bylo přidáno 3,5 ml *n*-butanolu a směs byla vortexována 2 minuty. Následnou centrifugací (9000 g, 10 min, 4 °C) byla oddělena butanolvá frakce a změřena její absorbance (532 nm). Míra lipoperoxidace byla vyjádřena v jednotkách TBARS/g sušiny (thiobarbituric acid reactive substances).

Pro **stanovení produktů karbonylace** byla nejprve, na základě metody dle Bradfordové, stanovena koncentrace celkových proteinů ve vzorcích dezintegrované populace. Principem této metody je kolorimetrická reakce barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s molekulou proteinu. Pro sestrojení kalibrační křivky byl jako standard použit hovězí sérový albumin. Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 µl vzorku nebo standardu. Poté bylo přidáno 200 µl naředěného barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (1 díl koncentrovaného barviva a 4 díly demineralizované vody). Absorbance byla měřena při vlnové délce 595 nm.

Stanovení produktů karbonylace proteinů je metoda založená na derivatizaci karbonylové skupiny proteinu dinitrofenylhydrazinem (DNPH) a následném spektrofotometrickém stanovení vzniklého produktu (375 nm). Metodika stanovení byla provedena dle protokolu, který byl součástí OxiSelect™ Protein Carbonyl Spectrophotometric Kit (Cell Biolabs, INC.).

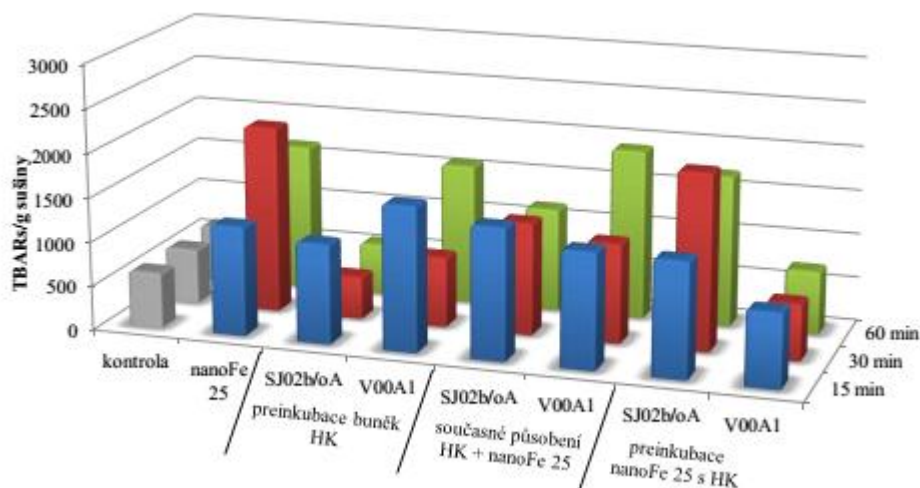
Pomocí fluorescenčního barvení byla **sledována akumulace ROS**. Po expozici byly buňky separovány centrifugací (9000 g, 10 min, 10 °C) a resuspendovány v 10 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH = 7,0), poté byl přidán 2,7-dichlorfluorescein diacetát (DCFH-DA) tak, aby jeho koncentrace byla 0,052 M. Buňky byly vystaveny DCFH-DA po dobu 15 minut. Lipofilní molekula DCFH-DA ochotně prostupuje membránou do cytosolu, kde je štěpena na nefluorescenční sloučeninu 2,7-dichlorfluorescein, jejíž oxidace molekulami ROS vede ke vzniku vysoce fluorescenční sloučeniny 2,7-dichlorfluoresceinu. Míra fluorescence

je přímo úměrná koncentraci ROS v cytosolu (Jakubowski W. a Bartosz G., 2000). Po 15 min inkubace s DCFH-DA byly buňky odstředěny (9000 g, 10 min, 10°C), dvakrát promyty v 10 ml chlazené demineralizované vody a resuspendovány v 1 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH = 7,0). Fluorescence byla měřena při vlnové délce excitačního maxima $\lambda = 488$ nm a při vlnové délce emisního maxima $\lambda = 520$ nm.

Aktivita SOD byla stanovena jednou z nepřímých metod, která je založena na redukci tetrazolinové soli reakcí se superoxidovým radikál-aniontem ($O_2^{\cdot-}$) na barevný formazan (450 nm). V přítomnosti SOD $O_2^{\cdot-}$ interaguje primárně s tímto enzymem a tvorba barevného formazanu je inhibována. Metodika byla provedena dle SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich, INC.).

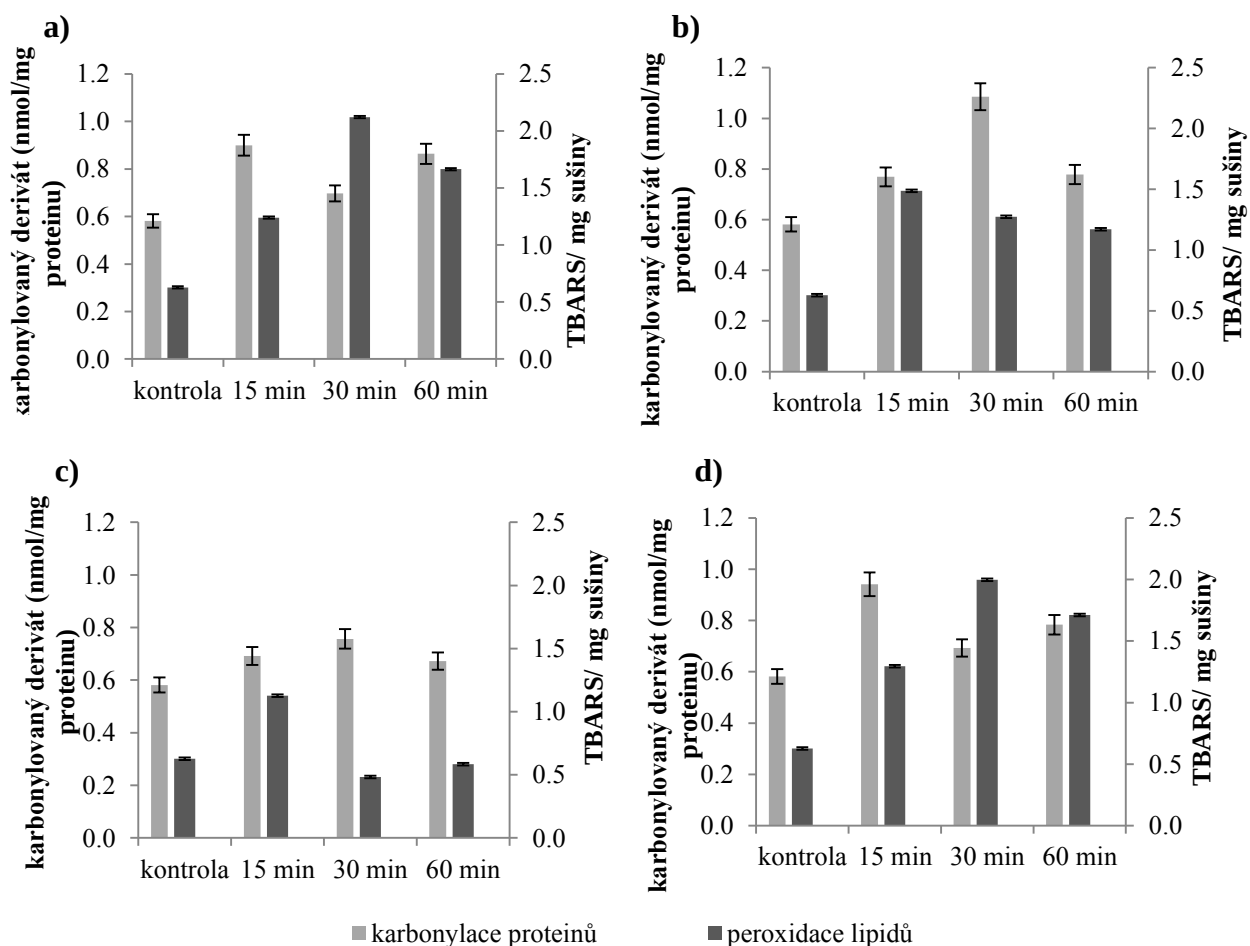
VÝSLEDKY A DISKUZE

Jednou z prokázaných příčin cytotoxického působení nanočástic je jejich schopnost generovat reaktivní formy kyslíku a tím vyvolávat oxidativní stres (Keenan Ch. R. a kol., 2009). Stanovení produktů peroxidace lipidů, jako jednoho z projevů přítomnosti oxidativního stresu, může poukázat na míru buněčného poškození způsobeného aplikací nanočástic nulamocného železa. Získané hodnoty mohou dát představu především o míře oxidačního poškození buněčné membrány, kde je nejvyšší zastoupení lipidických složek (Boggs J. M., 1980). Na obr. 1 je znázorněna míra lipoperoxidace po expozici NanoFe 25 a vliv HK na modulaci účinku NanoFe 25. Vlastnosti huminových látek jsou rozmanité a vliv na ně má nejen složitá struktura a zastoupení funkčních skupin v molekule, ale také způsob jejich izolace (Madronová L. a kol., 2010).



Obr. 1: Míra lipoperoxidace po expozici *Trichosporon cutaneum* nanoFe 25 (1 g/l) a HK (0,3 g/l) v čase za různého experimentálního uspořádání; SJ02b/oA a V00A1 jsou označení pro danou HK.

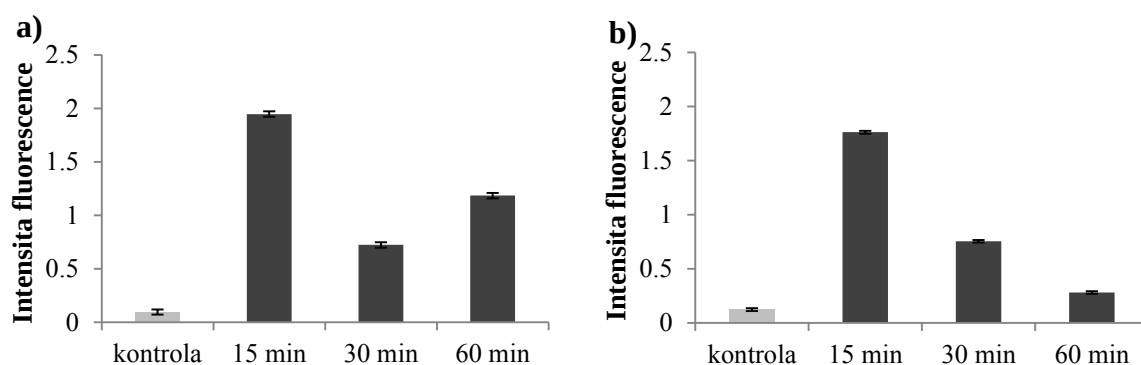
Z obrázku 1 je patrné, že přítomností HK se hodnoty TBARS (a tedy míra lipoperoxidace) snižují v porovnání s hodnotami, kdy jsou buňky *T. cutaneum* vystaveny pouze účinkům nanoFe 25. Bylo také zjištěno, že efektivita protekce závisí nejen na typu použité HK, ale také na pořadí, ve kterém jsou HK, respektive nanočástice, přidávány k buněčné populaci. Největší protektivní účinek HK byl prokázán v případě, kdy buňky byly nejprve preinkubovány s HK SJ02b/oA a následně vystaveny působení nanočástic železa, hodnoty TBARS byly v tomto případě srovnatelné s hodnotami TBARS naměřenými u neexponované populace (628,0 nmol/g sušiny TBARS). Po 30 min působení nanoFe 25 na preinkubované buňky s HK SJ02b/oA byla získána hodnota 481,8 nmol/g sušiny TBARS. Další významné snížení hodnoty TBARS lze pozorovat za podmínek, kdy byly buňky vystaveny účinkům nanoFe 25 preinkubovaných s HK V00A1 – po 60 min expozici byla hodnota 583,5 nmol/g sušiny TBARS oproti kontrole. Protektivní charakter HK byl potvrzen také Chen a kol. (2011) na *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli* a také Li a kol. (2010) na *Escherichia coli* (zkoumali působení nanončástic železa a huminových látek o koncentraci 10 – 80 mg/l).



Obr. 2a, b, c, d: Porovnání karbonylace proteinů a peroxidace lipidů po vystavení *Trichosporon cutaneum* a) účinkům nanoFe 25 1 g/l, b) současnému působení nanoFe 25 (1 g/l) a HK SJ02b/oA (0,3 g/l) c) preinkubaci buněk s HK SJ02b/oA (0,3 g/l) a následné vystavení působení nanoFe 25 (1 g/l) a d) působení preinkubovaných nanoFe 25 (1 g/l) s HK SJ02b/oA (0,3 g/l) v čase.

Dalším možným projevem přítomnosti oxidativního stresu je karbonylace proteinů. Stanovení produktů karbonylace proteinů může rovněž poukázat na míru buněčného poškození způsobenou aplikací nanoFe 25. Na následujícím obrázku (obr. 2) jsou znázorněny závislosti charakterizující změnu v zastoupení karbonylovaných proteinů v čase za různých podmínek experimentu a porovnány s hodnotami TBARS naměřených za stejných podmínek. Aplikací huminových látek bylo ve většině případů zaznamenáno snížení dopadů oxidativního stresu. Bylo také zjištěno, že efektivita protekce závisí nejen na typu použité HK, ale také na pořadí, ve kterém jsou HK, respektive nanočástice, přidávány k buněčné populaci.

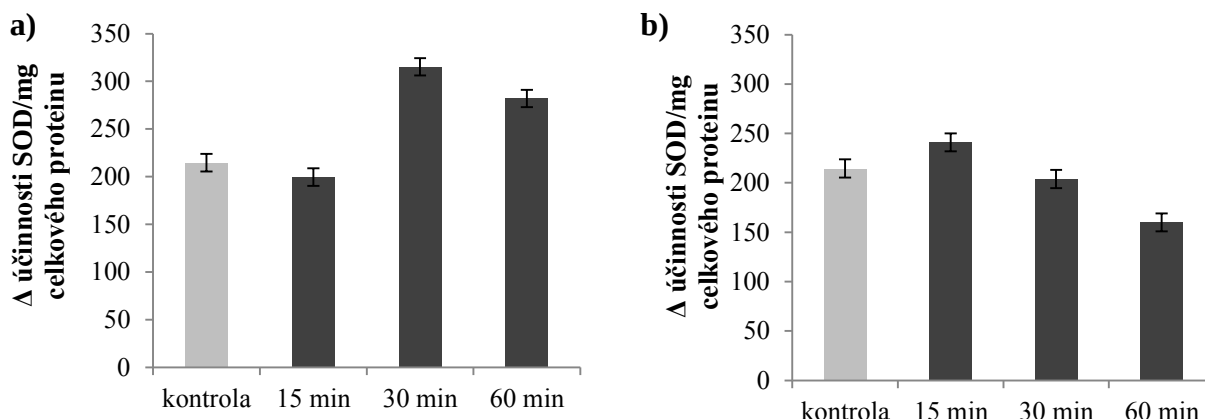
Pro detekci akumulace reaktivních forem kyslíku (ROS) v buněčném cytosolu bylo použito fluorescenční barvení (přidání 2,7-dichlorfluorescinu, obr. 3). Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství přítomných reaktivních forem kyslíku. Tímto způsobem je možné získat představu o schopnosti nanočástic železa generovat reaktivní formy kyslíku. Akumulace reaktivních forem kyslíku byla měřena po vystavení účinkům nanoFe 25 a u preinkubovaných buněk s HK SJ02b/oA, které byly následně exponovány účinkům nanoFe 25. Tento způsob uspořádání experimentu byl z hlediska snížení toxického působení nanoFe, na základě předchozích experimentů, zhodnocen jako nejúčinnější.



Obr. 3a, b: Intenzita fluorescence po vystavení *Trichosporon cutaneum* a) účinkům nanoFe 25 (1 g/l), b) preinkubovaných buněk s HK SJ02b/oA (0,3 g/l) a následnému vystavení účinkům nanoFe 25 (1 g/l) v čase.

Z obrázku 3 je patrné, že po expozici nanoFe 25 je v buňkách přítomno zvýšené množství ROS. I u preinkubovaných buněk s HK SJ02b/oA byla intenzita fluorescence celkově nižší (obr. 3b), než u buněk vystavených samotnému působení nanoFe 25. Intenzita fluorescence po 15 min je až 20 krát vyšší než v buňkách neexponovaných (obr. 3a). Po 30 min působení je intenzita fluorescence snížena (oproti neexponovaným buňkám je hodnota vyšší pouze 8 krát). Tento jev může být způsoben mobilizací obranných reakcí mikroorganismu na stresové prostředí. Zapojení obranných buněčných mechanismů proti přemíře ROS potvrzují také data charakterizující aktivitu superoxiddismutasy (obr. 4). U exponovaných buněk byl po 30 min působení NanoFe 25 pozorován výrazný nárůst aktivity tohoto enzymu. Také v práci Nair a Chung (2015), která byla zaměřená na toxické působení nanočástic stříbra, byl prokázán značný nárůst regulace exprese genu pro Cu/ZnSOD po expozici nanočástic stříbra jako odpověď na zvýšené množství ROS v cytosolu buněk.

Jak již bylo zmíněno, schopnost buněk vystavených podmínkám oxidativního stresu bránit se před působením ROS může být také sledována měřením aktivity antioxidačních enzymů. Změna účinnosti jednoho z klíčových antioxidačních enzymů, superoxiddismutasy (SOD), je znázorněna na obrázku 4a, b. U kvasinkové populace *Trichosporon cutaneum* byla aktivita tohoto enzymu sledována po vystavení účinkům nanoFe 25 a účinkům nanoFe 25 na preinkubované buňky s HK SJ02b/oA.



Obr. 4a, b: Změna účinnosti aktivity SOD po vystavení *Trichosporon cutaneum* a) účinkům nanoFe 25 (1 g/l) a b) preinkubovaných buněk s HK SJ02b/oA (0,3 g/l) a následnému vystavení účinkům nanoFe 25 (1 g/l).

Po expozici nanoFe 25 (1 g/l) byla aktivita SOD zvýšena až po 30 min působení, kdy byla zároveň aktivita SOD nejvyšší (oproti neexponovaným buňkám byla téměř 1,5 krát vyšší). Aktivita SOD u preinkubovaných buněk s HK SJ02b/oA byla po jejich expozici nanoFe 25 výrazně nižší. K mírnému navýšení došlo jen po 15 min působení nanočástic, poté aktivita tohoto enzymu klesala. Aplikací NanoFe 25 na preinkubované buňky s HK však bylo množství reaktivních forem kyslíku v cytosolu sníženo a aktivita superoxidismutasy byla srovnatelná s kontrolní populací. V souladu s prací Aeschbacher a kol. (2012), jejichž práce byla zaměřena na antioxidační vlastnosti HK, je možné, že HK může působit také jako antioxidant, vychytává volné kyslíkové radikály a tak přispívá ke snížení jejich množství a obraně proti oxidativnímu stresu.

Literatura

- Boggs, J. M. Intermolecular hydrogen bonding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **1980**, 58(10), 755–770.
- Calero, M.; Gutiérrez, L.; Salas, G.; Luengo, Y.; Lázaro, A.; Acedo, P.; Morales, P.; Miranda, R.; Villanueva, A. Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomed. Nanotechnol.* **2014**, 10, 733–743.
- Cundy, A. B.; Hopkinson, L.; Whitby, R. L. D. Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: A review. *Sci. Total Environ.* **2008**, 400, 42–51.
- Chen, J.; Xiu, Z.; Lowry, G. V.; Alvarez, P. J. J. Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron. *Water Res.* **2011**, 45, 1995–2001.
- Jakubowski, W.; Bartosz, G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?. *Cell Biol. Int.* **2000**, 24 (10), 757–760.

Johnson, R. L.; Johnson, G. B.; Nurmi, J. T.; Tratnyek, P. G. Natural Organic Matter Enhanced Mobility of Nano Zerovalent Iron. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 5455–5460.

Keenan, Ch. R.; Regine, G.; Lucas, D.; Sedlak, D. L. Oxidative Stress Induced by Zero-Valent Iron Nanoparticles and Fe(II) in Human Bronchial Epithelial Cells. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 5444–5460.

Kosobucki, P.; Buszewski, B. Natural organic matter in ecosystems – a review. *Nova Biotechnologica et Chimica* **2014**, *13* (2), 109–129.

Kunwar, A.; Priyadarsini, K. I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J. Med. Allied Sci.* **2011**, *1* (2), 53–60.

Li, Z.; Greden, K.; Alvarez, P. J. J.; Gregory, K. B.; Lowry, G. V. Adsorbed polymer and NOM limits adhesion and toxicity of nano scale zerovalent iron to *E. coli*. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 3462–3467.

Lushchak, V. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry* **2001**, *66* (5), 476–489.

Madronová, L.; Novák, J.; Kozler, J.; Janoš, P.; Čežíková, J.; Tokarová, V. Humic acids from coals of the North-Bohemian coal field: I. Preparation and characterisation. *React. Funct. Polym.* **2001**, *47*, 101–109.

Nair, P. M. G.; Chung I. M. Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Acta Physiol. Plant.* **2015**, *37*, 1719–1730.

Vliv bazické oblasti nukleokapsidového proteinu na tvorbu zralé a nezralé retrovirové částice

Alžběta Dostálková, Michaela Rumlová

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

V mé diplomové práci jsem se zaměřila na studium bazické oblasti nukleokapsidového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru a jejího vlivu na tvorbu a infektivitu částic. Byla připravena série tří provirových konstruktů kódujících mutace bazické oblasti. Nejprve byla u připravených konstruktů studována schopnost tvořit nezralé, intacytoplasmatické, částice v tkáňových buňkách HEK 293 pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). K ovlivnění tvorby nezralých částic nedošlo ani u jednoho z mutantů. Ze snímků je však patrné, že dva mutantní konstrukty ovlivnily proces pučení virových částic z buněk. Pro stanovení infekitivity byla zavedena a optimalizována imunochemická metoda ELISA. Dvě ze zavedených mutací infektivitu zásadně ovlivnily, oproti divokému kmenu u nich došlo ke snížení na 13 % až 60 % infekitivity divokého kmenu. Kvantifikací inkorporované virové genomové RNA jsme zjistili, že u mutantů se sníženou infektivitou také dochází k nižší inkorporaci RNA. Z mé práce vyplývá, že bazická oblast se podílí na inkorporaci virové genomové RNA a ovlivňuje proces pučení. Zda tyto kroky spolu souvisí je předmětem dalšího studia.

Vliv baicaleinu na tvorbu a stabilitu biofilmu kvasinek

Heřmanová A., Kvasničková E., Čejková A.

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Úvod

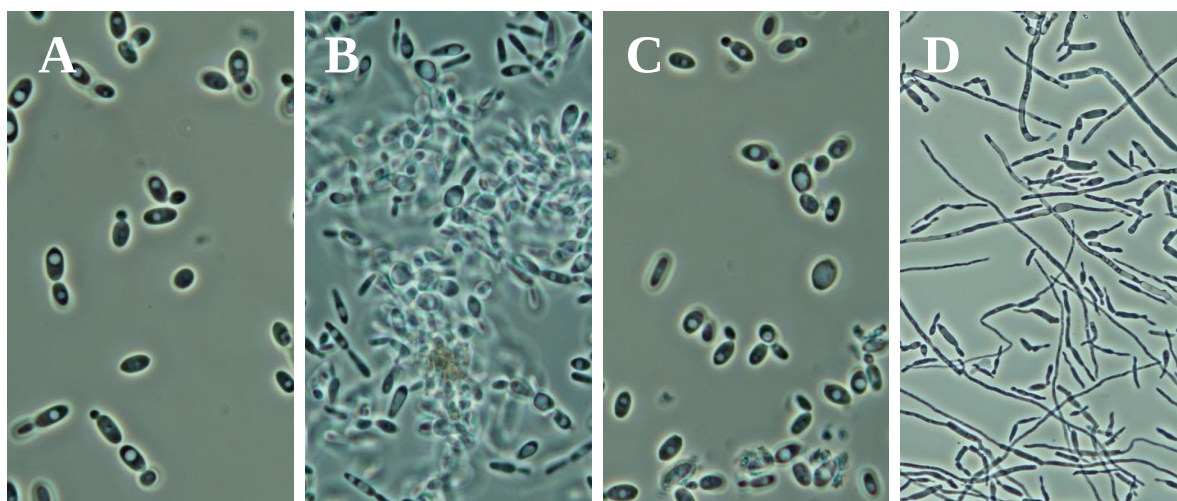
Strukturované mikrobiální společenství jedné či více populací reversibilně připojené k abiotickému či biotickému povrchu se běžně označuje jako biofilm (Cao a kol. 2008). Jedná se o dynamické mikrobiální komunity, které střídavě přechází mezi planktonní a přisedlou formou růstu v reakci na různé podněty okolního prostředí (Uppuluri a kol. 2010). Vliv tvorby biofilmu na patogenitu a rezistenci mikroorganismů zdůrazňuje potřebu nových antibiofilmových látek, které by mohly inhibovat tvorbu biofilmu nebo zničit předem vytvořený biofilm a zároveň by nebyly toxické pro člověka (Kagan a kol. 2014).

Biofilmy jednobuněčných eukaryot

Mikrokolonie, které jsou základem biofilmu, mohou být tvořeny jedním či více mikrobiálními druhy v závislosti na podmínkách prostředí, ve kterém biofilm vzniká (Davey a O'Toole 2000). V přírodním prostředí se biofilmy vyskytují ve vícedruhové podobě. Složení biofilmů je rozmanité, mohou být tvořeny bakteriemi (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella* a *Rhodococcus*, aj.), kvasinkami (*Candida*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*), plísněmi (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) a v neposlední řadě i sinicemi (*Anabaena flosaquae*) či řasami (*Pediastrum boryanum*) (Rulík a kol. 2011). U zralých biofilmů na rozdíl od planktonních kultur byla málokdy pozorována mezidruhová konkurence. I když jeden z kmenů dominuje v důsledku vyššího tempa růstu, druhý si zachovává vysokou životaschopnost (Nikolaev a Plakunov 2007). K nejvýznamnějším jednobuněčným eukaryotním mikroorganismům tvořícím biofilm patří kvasinky, nicméně studium těchto biofilmů je stále ve vývoji oproti biofilmům bakteriálním, které jsou již poměrně detailně prostudovány (Kuhn 2002). Vhodný modelový organismus pro popsání eukaryotických biofilmů je hlavní patogen rodu *Candida* kvasinka *C. albicans* (Obr. 1). Biofilm rodu *Candida* je obecně trojrozměrné struktury, liší se v závislosti na druhu materiálu, na kterém roste, druhem kvasinky (Estivill a kol. 2011), a dále je jeho uspořádání ovlivněno i parametry životního prostředí (Kumamoto 2002). Mikroskopické studie ukazují, že *C. albicans* tvoří komplexní biofilmy, jejichž tloušťka může být 50-350 μm (Ramage a kol. 2009), které se skládají ze souvislé vrstvy bazálních blastospor, pokrytou silnou maticí extracelulárního polymerního materiálu (EPS) a buněk hyf. Formování biofilmu je sekvenční proces zahrnující adhezi mikroorganismů k abiotickému či slizničnímu povrchu i k substrátu (Fanning a Mitchell 2012). Dle studie Chandra a kolektiv, 2011 lze tvorbu biofilmu kvasinky *C. albicans* na fázovém rozhraní vodné prostředí – pevný povrch rozdělit do tří vývojově odlišných fází: raná, střední a fáze zrání. Dle délky trvání: raná fáze 0 – 11 hod, střední fáze 12 – 30 hod a fáze zrání 38 – 72 hod. Okolo jedenácté hodiny kultivace buněk dochází k odlišné genové expresi u planktonní formy růstu a biofilmu. Dále se uplatňují faktory adherence, které jsou důležité pro formování biofilmu. Střední fáze charakterizuje vznik EPS, který překrývá houbové mikrokolonie (Chandra a kol. 2001). V průběhu vývoje biofilmu dochází nepřetržitě k disperzi buněk, v závislosti na fázi růstu biofilmu. Maximální počet buněk se uvolní během střední fáze, avšak úplné zastavení disperze buněk nebylo nikdy pozorováno. Rozsah a rychlost disperze biofilmu *C. albicans* do značné míry ovlivňuje dostupnost zdroje uhlíku a pH. Kromě

negativních projevů biofilmů popsaných níže, lze využít i pozitivních vlastností biofilmů v řadě biotechnologických odvětví průmyslu (Rulík a kol. 2011).

Zástupci rodu *Candida* jsou v současné době často izolovány z lidských těl jako patogeny, které způsobují lidská onemocnění (Silva a kol. 2011). Infekce krevního řečiště jsou často spojené se zavedenými implantáty do lidského těla (Silva-Dias a kol. 2014) a obvykle jsou spojeny s tvorbou biofilmu (Evensen a Braun 2009). Kandidóza se může lišit ve svém projevu od relativně mírných kožních mykóz až po život ohrožující systémové nebo diseminované onemocnění (Serpa a kol. 2012). Recidivující kandidóza je běžná, avšak závažná systémová infekce, obvykle s fatálně vysokou morbiditou a mortalitou (Kang a kol. 2010). Mortalita u pacientů s invazivní kandidózou může být až 40 % (Chandra a kol. 2001). Jako další významný lidský patogen byla hlášena *C. parapsilosis* (Obr. 1), přestože se jedná o typického komenzála lidské kůže (Gacser a kol. 2007). Během posledních deseti let dochází k dramatickému zvýšení jejího výskytu. Nyní je druhým nejvíce rozšířeným druhem rodu *Candida* v krevních kulturách (Kuhn a kol. 2002). Nejedná se však o obligátní lidský patogen, protože dochází k izolaci i z jiných zdrojů jako jsou zvířata, půda a mořské prostředí (Trofa a kol. 2008). Kvasinka *C. krusei* (Obr. 1) se výrazně liší od jiných druhů rodu *Candida* a to strukturálními a metabolickými funkcemi. Na rozdíl od většiny ostatních druhů, které mají vejcovitý tvar, jsou buňky *C. krusei* obecně podlouhlé. Z důvodu vysoké hydrofobnosti svého buněčného povrchu kolonizuje inertní povrchy, jako jsou implantáty a katétry zavedené v lidském těle (Samaranayake a Samaranayake 1994). Tyto infekce jsou velkým problémem v klinické praxi z důvodu vysoké úmrtnosti pacientů (až 60 %) (Kang a kol. 2010) a jsou silně spojeny s předchozí léčbou flukonazolem a neutropenií, která se projevuje jako pokles absolutního počtu bílých krvinek (Sardi a kol. 2013). Vláknité mikroorganismy rodu *Trichosporon* mají také schopnost zapojit se do infekcí souvisejících s tvorbou biofilmu. Několik druhů této kasky je pro člověka oportunně patogenní (Colombo a kol. 2011) a mohou způsobit šíření životu nebezpečné infekce, které souvisejí též se zdravotnickými zařízeními zavedenými do těla včetně katétrů, prsních implantátů a srdečních transplantátů (Ramage a kol. 2009). Infekce rodu *Trichosporon* se objevují zejména u pacientů s rozsáhlými popáleninami, nádory a nemocí AIDS (Di Bonaventura a kol. 2006). *T. cutaneum* (Obr. 1) také způsobuje vážnou oportunní plísňovou infekci trichosporonózu, která se může stát systémovou nemocí u imunitně ohrožených osob. I když je tato nemoc neobvyklá má často fatální následky (Carvalho a kol. 2008).



Obr. 1: Suspenzní populace jednobuněčných eukaryot; snímky ze světelného mikroskopu; A – *C. albicans*, B – *C. parapsilosis*, C – *C. krusei*, D – *T. cutaneum*, zvětšení 100×, (foto Andrea Heřmanová).

Antibiotika

Biofilmy mají zásadní význam pro infekce vykazující odolnost proti dostupným antimikrobiálním činidlům. Tyto poznatky upozorňují na nutnost nalezení nových léčebných přípravků, které by inhibovaly problematický biofilm nebo předcházely jeho vzniku (Kullberg a kol. 2005), protože mikroorganismy rostoucí v biofilmu jsou 100× a více odolnější ve srovnání s buňkami planktonními (Kumamoto 2002). Biofilm je sám o sobě odolný nejen proti antibiotikům, ale i proti obranným mechanismům hostitele, a tak představuje dlouhodobý zdroj infekce (Baille a Douglas 2000). Při snaze imunitního systému o narušení biofilmu může dojít k většímu poškození okolních tkání. Mechanismy zvýšené **rezistence** biofilmů oproti planktonním buňkám jsou stále málo objasněné (Rulík a kol. 2011). K rezistenci přispívají faktory strukturální složitosti biofilmu, přítomnost extracelulární matrix a podstatná metabolická heterogenita v biofilmu. Stupeň rezistence mikroorganismu se mění jak s druhem léčiva, tak s druhem mikroorganismu (Fanning a Mitchell 2012). **Faktory**, které by potenciálně mohly mít zodpovědnost za zvýšenou rezistenci buněk v biofilmu k antimykotikům, jsou konstrukční složitost biofilmu, zvýšená hustota buněk přisedlých populací, fyziologický stav buněk a odlišná genová exprese. Architektura biofilmů a přítomnost EPS může snížit difúzi antimykotika dovnitř struktury biofilmu. U *C. albicans* byla poprvé popsána mezidruhovná signalizace *quorum sensing*, jedná se tak o první publikaci tohoto systému komunikace u eukaryotických organismů (Ramage a kol. 2009). Molekulární mechanismy zapojené do antifungální rezistence biofilmu zůstávají stále málo pochopeny (Vediyappan a kol. 2010). **Léčba** invazivní kandidózy je stále obtížný zdravotní problém i navzdory dostupnosti rozšířeného spektra triazolů (Serpa a kol. 2012) a často vyžaduje odstranění zavedeného infikovaného zdravotnického materiálu z těla pacienta k odvrácení potenciálně fatálním následkům (Blankenship a Mitchell 2006). Výskyt invazivních infekcí a zvyšující se odolnosti kvasinek proti antimykotické terapii roste. Široké používání antimykotik by mohlo být vysvětlení vzniku rezistence u druhů *Candida* (Serpa a kol. 2012).

Současná antimykotika jsou buď vysoce toxická, nebo se stávají neefektivní kvůli výskytu rezistentních kmenů. Běžná antimykotika používaná v klinické praxi jsou polyeny (amphotericin B) a azoly (flukonazol). Triazolové antibiotikum **flukonazol** je díky své nízké ceně, dobré snášenlivosti a silné aktivitě využíván pro profylaxi a léčbu *C. albicans* infekcí (Aher a kol. 2009). Další jeho výhody jsou minimum vedlejších účinků (Li a kol. 2014), jedinečné farmakokinetické vlastnosti (rozpustnost ve vodě), a proto je dobře absorbován při perorálním podání. Účinek flukonazolu je zacílen na biosyntézu ergosterolu, což je hlavní složka houbových buněčných membrán (5 – 30 %) (Volmer a kol. 2010). V současné době je používán jako antibiotikum první volby (Kullberg a kol. 2005), i když byly zjištěny rezistence biofilmů *C. krusei* (Orozco a kol. 1998) a *C. albicans* (Cao a kol. 2008). **Amphotericin B** izolovaný z druhu *Streptomyces nodosus* získal svůj název díky amfifilnímu charakteru laktonového kruhu, který obsahuje hydrofobní polyenovou oblast a hydrofilní polyolová oblast. Molekula se dále skládá z polárních cukerných složek (mycosaminy) (Volmer a kol. 2010). Toto silné polyenové makrolidové antibiotikum je využíváno pro léčení mnoha systémových mykóz a podává se zejména perorálně. Vzhledem k jeho špatné propustnosti přes membránu je nutné podávat pacientům jeho zvýšené množství, což často vede k závažným nežádoucím účinkům a nefrotoxicitě vyskytující se časně v průběhu léčby (Kullberg a kol. 2005). Amphotericin B má vliv na interakci a narušení buněčné membrány (Volmer a kol. 2010). Vytváří komplex se steroly v buněčné membráně hub a vyvolává tak strukturální změny. Díky nimž dojde ke vzniku pórů v mykotických buňkách, které umožňují přechod malým iontům přes buněčnou membránu, což vede k následné buněčné smrti (Fu a kol. 2011). Kvasinky *C. krusei* i *C. albicans* mají

zvýšenou odolnost proti antibiotiku amphotericinu B. Snížená citlivost mikroorganismů byla popsána i u dalších antimykotik jako jsou nystatin a flucytosin (Hawser a Douglas 1995).

Biologicky aktivní látky

Z důvodu vznikajících rezistencí daných mikroorganismů k dostupným antibiotikům je naléhavé a nutné studovat a charakterizovat nové antimykotické látky. Za tímto účelem dochází k hledání nových látek z různých zdrojů (Kang a kol. 2010). K překonání tohoto problému jsou hledány látky, které by mohly nabídnout alternativu k antibiotikům. V současné době se biologické izoláty z přírodních zdrojů využívají ve výzkumu v souvislosti s omezením tvorby a rozvoje zubního kazu, stejně tak jako jejich antimikrobiálnímu vlivu na tvorbu a vlastnosti biofilmu (Duan a kol. 2007). Jedním z hledaných izolátů by mohla být **kyselina usnová** neboli 2,6-diacetyl-1,2,3,9b-tetrahydro-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyldibenzo furan-1,3-dion, která je sekundárním metabolitem lišejníku *Usnea barbata* („stříbrný mech“) z rodu *Usnea* (Provazovka). Kyselinu lze izolovat i z jiných rodů. Tato kyselina má antimikrobiální, antivirové, antiprotazoální, antiproliferační, analgetické a protizánětlivé účinky. Svojí antimikrobiální aktivitou účinkuje proti řadě gram-pozitivních bakterií, také má schopnost řídit tvorbu biofilmu *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Mechanismus činnosti kyseliny usnové je však stále neznámý (Pires a kol. 2012).

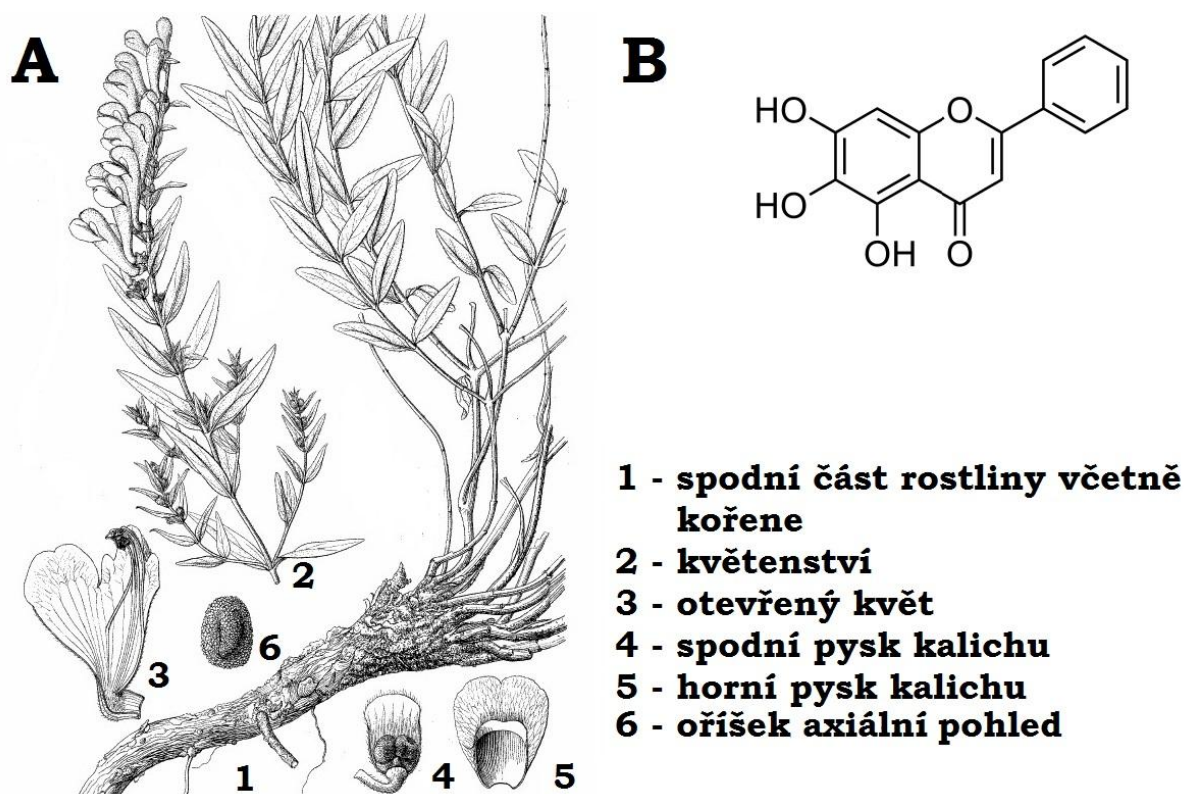
Přírodní aminopolysacharidový polymer (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan složený z β-(1→4) glukosidických vazeb (Yang a kol. 2005), neboli **chitosan** se v současné době vyrábí především alkalickou tepelnou deacetylací chitinu při několikahodinovém ostrém varu s hydroxidem sodným, což vede k heterogenní distribuci acetylových skupin podél svých řetězců (Tran a kol. 2011). Další možností je enzymatická cesta pomocí enzymu *N*-deacetylasy (EC 3.5.1.41), který hydrolyzuje acetoamidové skupiny *N*-acetylglukosaminu v chitinu. Chitosan na rozdíl od chitinu je rozpustný ve vodě (Kaur a kol. 2012) a má kladný náboj při nízkých hodnotách pH (pod jeho hodnotou pKa) (Hamman 2010). Antimikrobiální účinnost však vzrůstá s klesajícím pH. Nemodifikovaný chitosan je nerozpustný a antibakteriálně neúčinný při pH 7 (Vavříková a Vinšová 2009). Z čehož plyne omezení použití chitosanu navzdory rozpustnosti při pH vyšším a neutrálním (Yang a kol. 2005). Chitosan vykazuje pozoruhodné biologické vlastnosti, není toxický pro člověka a má vhodnou biologickou rozložitelnost. Má antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru mikroorganismů, k nimž patří řasy (Silva-Dias a kol. 2014), bakterie gram-negativní i gram-pozitivní a houby při pH < 6. Přesný mechanismus účinku chitosanu není zcela objasněn. Je pravděpodobné, že kladně nabitě aminoskupiny glukosaminových jednotek chitosanu reagují s negativně nabitými buněčnými membránami (Vavříková a Vinšová 2009), což navozuje únik intracelulárních složek, zpomalení metabolismu a to vede k buněčné smrti. Druhým navrhovaným mechanismem účinku je pronikání nízkomolekulárního chitosanu do jádra kvasinky, kde vznikne jeho vazba na DNA, tím dochází k inhibici syntézy RNA a syntézy proteinů se zřejmým důsledkem na buněčný metabolismus. Bylo zjištěno, že chitosan může účinně snížit nebo zcela zabránit bakteriální tvorbě biofilmu *in vitro* i *in vivo*. Tyto výsledky naznačují, že nízkomolekulární chitosanový hydrogel se svojí trvalou antimykotickou aktivitou a netoxickými účinky na člověka by se mohl stát vhodnou hledanou látkou v boji proti biofilmům (Silva-Dias a kol. 2014).

Baicalein

Baicalein neboli 5,6,7-trihydroxyflavon (Obr. 2) je žlutý flavon z jedné ze čtyř podskupin flavonoidů (Ng a kol. 2005) původně izolovaný z čínské léčivé byliny *Scutellaria baicalensis* Georgi (Šišák bajkalský) (Moghaddam a kol. 2014) Používá se po tisíce let

v tradiční čínské medicíně pro různé účely, jak je dokumentováno v lékopisu Čínské lidové republiky, zároveň je považován za levný a bohatý zdroj nových biomolekul (Kang a kol. 2010). Tato bylina se vyskytuje po celém světě, zejména v Asii. Její kořeny obsahují přes 30 druhů flavonů s různými farmakologickými účinky a komplikovaným chemickým složením. K jeho biologickým aktivitám se řadí anti-oxidační, protizánětlivé, antibakteriální, antivirové (Duan a kol. 2007), antimykotické (Cao a kol. 2008), antialergické, antihypertenzivní a diuretické účinky. Nové poznatky ukazují i na jeho výhody v prevenci nebo adjuvantní léčbě karcinomu (Arweiler a kol. 2011). Mechanismus antimikrobiální aktivity není zcela znám.

Extrakt z Šišáku bajkalského obvykle obsahuje složky jako flavony, aminokyseliny, steroly a esenciální oleje (Duan a kol. 2007). Obecně platí, že flavonoidy se v rostlinách vyskytují ve formě aglykonů nebo glykosidů. Aglykony mohou být volně absorbovány střevem pasivní difúzí, zatímco flavonoidní glykosidy se obvykle hydrolyzují na odpovídající molekuly aglykonů před gastrointestinální absorpcí. Nicméně nebyla shledána vysoká biologická dostupnost ani jedné z forem, jak se očekávalo zejména díky jejich lipofilitě. K problému dochází pravděpodobně při prvním průchodu tenkým střevem. Zdá se, že glukuronizace nebo sulfatace je hlavní metabolickou cestou flavonoidů (Ng a kol. 2005). Protože je baicalein špatně rozpustný ve vodném roztoku při teplotě 37 °C, je nutné zvýšit rozpustnost použitím dimethylsulfoxidu (DMSO).



Obr. 2: **A** - *Scutellaria baicalensis* Georgi (Šišák bajkalský): (1) spodní část rostliny včetně kořene, (2) květenství, (3) otevřený květ, (4) spodní pysk kalichu, (5) horní pysk kalichu, (6) oříšek axiální pohled; **B** - baicalein (5,6,7-trihydroxyflavon); převzato z Chunrong 1977.

Baicalein byl v experimentálních studiích testován ve vzájemných kombinacích s dostupnými antibiotiky. Tyto interakce byly hodnoceny použitím mikrodiluční metody v šachovnicovém uspořádání dle Ústavu klinických a laboratorních norem. Byl pozorován

synergistický účinek mezi testovanou kombinací koncentrací baicaleinu a flukonazolu (Serpa a kol. 2012), a dále baicaleinu a amphotericinu B (Fu a kol. 2011). Již dříve byla prokázána synergie mezi baicaleinem a tetracyklinem, baicaleinem a β -laktamovými antibiotiky proti methicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus*. Dále byly pozorovány synergie baicaleinu a gentamicinu proti vankomycin-rezistentnímu *Enterococcus faecalis* (Fu a kol. 2011). Nicméně jsou hlášeny protichůdné výsledky antifungálních kombinací – synergistické nebo antagonistické (Huang a kol. 2008). Účinek baicaleinu proti kvasinkám rezistentním na flukonazol může být částečně způsoben snížením vytlačování léčiva z kvasinkových buněk inhibicí efluxních pump. Dále se zdá, že baicalein inhibuje kvasinky indukci programované buněčné smrti (apoptózy). Dle jiných autorů dochází k inhibici tvorby biofilmu působením baicaleinu na hydrofobnost buněčného povrchu buněk. Závěrem lze říci, že došlo k potvrzení fungicidní schopnosti baicaleinu v kombinaci s flukonazolem, se jedná o slibnou roli látek proti infekcím rodu *Candida* (Serpa a kol. 2012). Bylo zjištěno, že kombinace baicaleinu a amphotericinu B zrychluje apoptózu doprovázenou zvýšením produkce intracelulárních reaktivních forem kyslíku (ROS), které patří k jednomu z indikátorů buněčné apoptózy. Nicméně mechanismus, kterým dochází k apoptóze zůstává prozatím nejasný. Jedná se o první zmínku zapojení apoptózy do synergistického efektu mezi amphotericinem B a další sloučeniny. Tato kombinace se zdá další nadějnou v boji proti lékově rezistentním houbám (Fu a kol. 2011).

Literatura

- Aher N. G., Pore V. S., Mishra N. N., Kumar A., Shukla P. K., Sharma A. a Bhat M. K. (2009): Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, **19**, str. 759-63.
- Arweiler N. B., Pergola G., Kuenz J., Hellwig E., Sculean A. a Auschill T. M. (2011): Clinical and antibacterial effect of an anti-inflammatory toothpaste formulation with *Scutellaria baicalensis* extract on experimental gingivitis. *Clin Oral Investig*, **15**, str. 909-913.
- Baillie G. S. a Douglas L. J. (2000): Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemoth*, **46**, 397-403.
- Blankenship J. R. a Mitchell A. P. (2006): How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*, **9**, str. 588-594.
- Cao Y., Dai B., Wang Y., Huang S., Xu Y., Cao Y., Gao P., Zhu Z. a Jiang Y. (2008): *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, **32**, str. 73-77.
- Carvalho A. M. R., Melo L. R. B., Moraes V. L. a Neves R. P. (2008): Invasive *Trichosporon cutaneum* infection in an infant with Wilms' tumor. *Braz J Microbiol*, **39**, str. 59-60.
- Colombo A. L., Padovan A. C. a Chaves G. M. (2011): Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev*, **24**, str. 682-700.
- Davey M. E., O'toole A. G. (2000): Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Molecul Biol Rev*, **64**, 847-867.
- Di Di Bonaventura G., Pompilio A., Picciani C., Iezzi M., D'Antonio D. a Piccolomini R. (2006): Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Ch*, **50**, str. 3269-3276.
- Duan C., Matsumura S., Kariya N., Nishimura M. a Shimono T. (2007): *In vitro* antibacterial activities of *Scutellaria baicalensis* Georgi against cariogenic bacterial. *Pediatric Dental Journal*, **17**, str. 58-64.
- Estivill D., Arias A., Torres-Lana A., Carrillo-Munoz A. J. a Arevalo M. P. (2011): Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods*, **86**, str. 238-242.
- Evensen N. A. a Braun P. C. (2009): The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Can J Microbiol*, **55**, str. 1033-1039.
- Fanning S. a Mitchell A. P. (2012): Fungal biofilms. *PLoS Pathog*, **8**, str. e1002585.
- Fu Z. J., Lu H., Zhu Z. Y., Yan L., Jiang Y. Y. a Cao Y. Y. (2011): Combination of baicalein and amphotericin B accelerates *Candida albicans* apoptosis. *Biol Pharm Bull*, **34**, 214-218.
- Gacser A., Schafer W., Nosanchuk J. S., Salomon S. a Nosanchuk J. D. (2007): Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*, **44**, str. 1336-1341.
- Hamman J. H. (2010): Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar Drugs*, **8**, str. 1305-1322.
- Hawser S. P. a Douglas L. J. (1995): Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Ch*, **39**, str. 2128-2131.
- Huang S., Cao Y. Y., Dai B. D., Sun X. R., Zhu Z. Y., Cyo Y. B., Wang Y., Gao P. H. a Jiang Y. Y. (2008): *In vitro* synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Biol Pharm Bull*, **31**, 2234-2236.

- Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T. a Ghannoum M. A. (2001): Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J Bacteriol*, **183**, str. 5385-5394.
- Chunrong L. (1977): FOC 92; FRPS, **65** (2), str. 42 [online]. Dostupné z: <http://foc.eflora.cn/content.aspx?TaxonId=200020285>
- Kagan S., Jabbour A., Sionov E., Alquntar A. A., Steinberg D., Srebnik M., Nir-Paz R., Weiss A. a Polacheck I. (2014): Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds. *J Antimicrob Chemother*, **69**, str. 416-427.
- Kang K., Fong W. P. a Tsang P. W. (2010): Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis. *Mycopathologia*, **170**, str. 391-396.
- Kaur K., Dattajirao V., Shrivastava V. a Bhardwaj U. (2012): Isolation and characterization of chitosan-producing bacteria from beaches of chennai, India. *Enzyme Res*, **2012**, str. 421683.
- Kuhn D. M. (2002): Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infect Immun*, **70**, str. 878-888.
- Kuhn D. M., George T., Chandra J., Mukherjee P. K. a Ghannoum M. A. (2002): Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. *Antimicrob Agents Ch*, **46**, str. 1773-1780.
- Kullberg B. J., Sobel J. D., Ruhnke M., Pappas P. G., Viscoli C., Rex J. H., Cleary J. D., Rubinstein E., Church L. W. P., Brown J. M., Schlamm H. T., Oborska I. T., Hilton F. a Hodges M. R. (2005): Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *The Lancet*, **366**, str. 1435-1442.
- Kumamoto C. A. (2002): *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 608-611.
- Li H., Zhang C., Chen Z., Shi W. a Sun S. (2014): A promising approach of overcoming the intrinsic resistance of *Candida krusei* to fluconazole (FLC)--combining tacrolimus with FLC. *FEMS Yeast Res*, **14**, str. 808-11.
- Moghaddam E., Teoh B. T., Sam S. S., Lani R., Hassandarvish P., Chik Z., Yueh A., Abubakar S. a Zandi K. (2014): Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. *Sci Rep*, **4**, str. 5452.
- Ng S. P., Wong K. Y., Zhang L. a Zuo Z. (2005): Evaluation of the first-pass glucuronidation of selected flavones in gut by Caco-2 monolayer model. *J Pharm Pharm Sci*, **8**, str. 1-9.
- Nikolaev Y. A. a Plakunov V. K. (2007): Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology*, **76**, str. 125-138.
- Orozco A. S., Higginbotham L. M., Hitchcock CH. A., Parkindon T., Falconer D., Ibrahim A., Ghannoum M. A. a Filler A. G. (1998): Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Ch*, **42**, str. 2645-2649.
- Pires R. H., Lucarini R. a Mendes-Giannini M. J. (2012): Effect of usnic acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. *Antimicrob Agents Ch*, **56**, str. 595-597.
- Ramage G., Mowat E., Jones B., Williams C. a Lopez-Ribot J. (2009): Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol*, **35**, str. 340-355.
- Rulík M., Holá V., Růžička F., Votava M. (2011): *Mikrobiální biofilmy*. 1. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 447 stran.
- Samaranayake Y. H. a Samaranayake L. P. (1994): *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol*, **41**, str. 295-310.
- Sardi J. C., Scorzoni L., Bernardi T., Fusco-Almeida A. M. a Mendes Giannini M. J. (2013): *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*, **62**, str. 10-24.
- Serpa R., Franca E. J., Furlaneto-Maia L., Andrade C. G., Diniz A. a Furlaneto M. C. (2012): *In vitro* antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *J Med Microbiol*, **61**, str. 1704-1708.
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D. W. a Azeredo J. (2011): Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*, **19**, str. 241-247.
- Silva-Dias A., Palmeira-de-Oliveira A., Miranda I. M., Branco J., Cobrado L., Monteiro-Soares M., Queiroz J. A., Pina-Vaz C. a Rodrigues A. G. (2014): Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. *Med Microbiol Immunol*, **203**, str. 25-33.
- Tran D. L., Pham G. D., Nguyen X. P., Vu D. H., Nguyen N. T., Tran V. H., Mai T. T. T., Nguyen H. B., Le Q. D., Nguyen T. N. a Ba T. C. (2011): Some biomedical applications of chitosan-based hybrid nanomaterials. *Advances in Natural Sciences: J Nanosci Nanotechnol*, **2**, str. 045004.
- Trofa D., Gacser A. a Nosanchuk J. D. (2008): *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, **21**, str. 606-625.
- Uppuluri P., Chaturvedi A. K., Srinivasan A., Banerjee M., Ramasubramaniam A. K., Kohler J. R., Kadosh D. a Lopez-Ribot J. L. (2010): Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*, **6**, str. e1000828.
- Vavříková E. a Vinšová J. (2009): Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chem. Listy*, **103**, str. 56-65.
- Volmer A. A., Szpilman A. M. a Carreira E. M. (2010): Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. *Nat Prod Rep*, **27**, str. 1329-1349.
- Yang T. C., Chou C. C. a Li C. F. (2005): Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *Int J Food Microbiol*, **97**, str. 237-245.

Vliv biologicky aktivních látek na tvorbu biofilmu na titanových materiálech používaných v ortopedii

T. Kubů, E. Kvasničková, O. Schreiberová

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Úvod

Mikrobiální biofilmy vznikající na biomateriálech používaných ve zdravotnictví se stávají často diskutovaným tématem, zejména z důvodu jejich vysoké rezistence vůči antimikrobiálním látkám. V současné době vyžaduje nejúčinnější strategie pro léčbu těchto infekcí chirurgické odstranění kontaminovaného materiálu v kombinaci s dlouhodobou antibiotickou léčbou infikované okolní tkáně. Proto se v posledních letech mnoho vědeckých týmů zaměřilo na sledování vlivu různých biologicky aktivních látek, izolovaných z přírodních zdrojů, na buňky rostoucí ve formě biofilmu.

Biofilm

V přirozeném prostředí se mikroorganismy nevyskytují jen jako samostatné, izolované buňky, ale často rostou a přežívají v organizovaném společenství - biofilmu. Tyto mikrobiální komunity se mohou vytvářet na fázových rozhraních, jako jsou pevná látka-kapalina nebo vzduch-kapalina. Biofilm je tedy organizovaná, spolupracující skupina mikroorganismů, u kterých dochází k přichycení buněk k povrchu a následné tvorbě. Mohou se vyskytovat na velkém množství povrchů – na skle, kovech, plastech, půdních částicích, v kanalizaci a vodovodech, kde se podílí na korozi kovů či jako součást zubního plaku, kde přispívají k tvorbě zubního kazu. Dále v poškozených tkáních, kde jsou schopny vytvořit ložisko infekce, či jako součást mikrobiální flóry trávicího ústrojí, napomáhající trávení potravy (Jenkinson a Lappin-Scott, 2001; Kokare a kol., 2009).

Biofilm se může vyskytovat jako monomerní vrstva nebo jako trojdimenzionální struktura s kanálky, které umožňují proudění kapalin a plynů, živin či odpadních látek (Chavant a kol., 2007). Mikrobiální buňky přítomné v kapalině se mohou s pevným biotickým či abiotickým substrátem spojit několika mechanismy. Jedním z nich je adheze buněk reverzibilně či ireverzibilně. Za předpokladu, že buňky budou na povrchu adherované delší dobu, začnou vylučovat extracelulární polymerní látky (EPS), které napomáhají k lepšímu přichycení buněk k substrátu (Bryers, 1993). Tvorba biofilmu se tedy vyznačuje produkcí extracelulární matrix samotnými mikroorganismy, která je složena převážně z polysacharidů a proteinů. Tato matrix zajišťuje vnitřní kostru 3D architektury biofilmu a je odpovědná za adhezi na povrch substrátu. Ve většině biofilmů představují mikroorganismy méně než 10 % sušiny, zatímco matrix tvoří až 90 % (Flemming a Wingender, 2010; Wilking a kol., 2011).

Růst mikroorganismů ve formě biofilmu je hlavní příčinou poškození materiálů. Vede ke snížení kvality výrobků a obecně představuje riziko pro veřejné zdraví. Biofilmy jsou také významnou příčinou chronických zánětlivých a infekčních onemocnění u rostlin a živočichů. U lidí se biofilmy podílejí například na chronickém zánětu středního ucha, na vzniku gastrointestinálních vředů, při infekcích močových cest či dolních cest dýchacích u pacientů s cystickou fibrózou (Davies a Marques, 2009). Důvodem, proč jsou mikrobiální biofilmy zodpovědné za tato infekční, obtížně léčitelná onemocnění, je skutečnost, že mikroorganismy tvořící biofilm vykazují mnohem větší odolnost vůči antibiotikům než jejich volně žijící formy. Tato zvýšená rezistence se může projevat právě díky tvorbě EPS, jejichž funkce je převážně protektivní a zároveň z důvodu změny exprese genů buněk biofilmu oproti jejich

planktonním formám, což vede ke změně fenotypu buněk přítomných v biofilmu (Chavant a kol., 2007; Wang a kol., 2010).

Rezistence biofilmu k antibiotikům

Zavedení antibiotik k léčbě mikrobiálních infekcí vedlo v relativně krátkém časovém rozpětí k popsání mikroorganismů rezistentních k příslušné antimikrobiální léčbě. Mikrobiální rezistence k antibiotikům je tedy úzce spjata s užíváním antimikrobiálních přípravků v klinické praxi. Dlouhodobá léčba antibiotiky může vést ke vzniku rezistence mikroorganismu, které původně bylo k danému antibiotiku citlivé. Postupná adaptace mikroorganismu na působení antimikrobiálních látek a následný vývoj odolnosti vůči antibiotiku svědčí o rychlé a efektivní schopnosti mikroorganismu přizpůsobit se změněným vnějším podmínkám v důsledku nadměrného užívání antibiotik (Giedraitienė a kol., 2011). Rezistence může být primární, kdy je organismus odolný vůči léku již před podáním, a která je dána druhem mikroorganismu a jeho vlastnostmi. Mezi tuto skupinu patří i rezistence způsobená tvorbou biofilmu. Sekundární neboli získaná rezistence se vyvíjí až v reakci na podání léku a je výsledkem přizpůsobení se daného patogenu k účinkům antibiotika. Druhý mechanismus je odpovědný kupříkladu za vznik rezistence řady mikroorganismů k antibiotikům ze skupiny azolům v posledních letech (Jabra-Rizk, 2004). Významnou roli v rychlém šíření odolnosti vůči antibiotikům hraje kromě selekce rezistentních mikroorganismů v přítomnosti antibiotika i horizontální přenos genů. Geny, které kódují odolnost vůči antibiotikům, se mohou vyskytovat na plasmidech, přičemž takto kódované geny se mohou rychle šířit v rámci druhu nebo rodu či dokonce na nepříbuzné kmeny mikroorganismů. Také může být rezistence kódovaná na chromosomu mikroorganismu, kde šíření této vlastnosti probíhá pomaleji (Carattoli, 2001; Giedraitienė a kol., 2011). Hlavní geny přispívající k rezistenci mikroorganismů jsou ty, které kódují efluxní pumpy, jejichž výsledkem je multirezistentní fenotyp (Jabra-Rizk, 2004).

Příčina této zvýšené odolnosti biofilmu je také spjata s přítomností extracelulární matrix, která zabraňuje antibiotiku proniknout skrz matrix biofilmu. Další příčina vyšší odolnosti biofilmu je nízký mikrobiální nárůst buněk v biofilmu, anebo zvýšená exprese genů kódujících pumpu efluxního toku, která vede ke snížení intracelulární koncentrace toxických látek či produkce enzymů degradujících antibiotika – např. β – laktamáza (Hawser a Douglas, 1995; Hoiby a kol., 2010). Další důvod, díky kterému se buňky v biofilmu stávají odolnějšími, je ireverzibilní přichycení buněk k substrátu a tvorba ložiska, které uvolňuje jednotlivé buňky do těla hostitele, ačkoli jsou ostatní volné bakterie či kvasinky odstraněny antibiotiky. Jedinou možností pro úspěšnou léčbu je chirurgické odstranění tohoto ložiska (Shinde a kol., 2012). Rezistence mikroorganismů k antibiotikům se stává velkým problémem v léčbě infekcí. To má za následek drastické zvýšení výskytu oportunních a systémových mykotických infekcí. Klinická rezistence je definována jako přetrvávání nebo progresse infekce přes příslušnou antimikrobiální léčbu (Jabra-Rizk, 2004).

Biofilmové infekce kloubních náhrad

Biomateriály jsou umělé nebo přírodní materiály použité k výrobě implantátů, které mají nahradit ztracené nebo poškozené biologické struktury a zároveň obnovit jejich biologickou funkci. Tyto struktury pomáhají při zlepšování kvality života lidí - při zmírnění bolesti, zlepšení mobility a podporují dlouhověkost pacienta. Biomateriály mohou nahradit různé části lidského těla, jako jsou umělé srdeční chlopně, stenty v cévách, náhradní implantáty v ramenou, kolenech, kyčlích či páteři. Lidské klouby podléhají degenerativním onemocněním, jako je např. artritida, které vedou k bolesti, ztrátě funkce a degradaci mechanických vlastností kosti v důsledku nadměrného zatížení či absence přirozeného procesu hojení. Odhaduje se, že 90 % populace ve věku nad 40 let trpí některým druhem degenerativních

onemocnění. Materiály používané v současné době k výrobě chirurgických (ortopedických) implantátů jsou většinou z nerezové oceli 316L, slitin kobalt – chrom (Co – Cr) či z titanu a titanových slitin. Využití titanu pro výrobu implantátů je výhodné díky vynikající kombinaci vlastností, jako je vysoká pevnost, nízká hustota, vysoká odolnost vůči korozi v důsledku tvorby tenké pasivní ochranné vrstvy oxidu TiO₂, zvýšená biologická kompatibilita a schopnost titanových slitin spojit se s kostí a dalšími tkáněmi (osseointegrace). Mezi nejčastěji používané titanové materiály k výrobě umělých náhrad patří čistý titan a slitina Ti6Al4V. Titan je kov vyskytující se ve dvou krystalových (alotropních) modifikacích, které jsou označovány α a β a slitina Ti6Al4V představuje slitinu těchto dvou fází. Při nízkých teplotách zaujímá titan stabilní hexagonální krystalovou strukturu, která je známá jako α , zatímco při teplotách vyšších než 883 °C strukturu kubickou prostorově centrovanou, označovanou β . Vzhledem k tomu, že slitiny titanu dosahují výrazně vyšších pevnostních vlastností než je tomu v případě použití čistého kovu, jako legující prvky bývají nejčastěji používány hliník, vanad, cín či chrom. V případě slitiny Ti6Al4V se jako stabilizátor α fáze používá hliník a β fáze vanad (Geetha a kol., 2009; Vojtěch, 2006).

Onemocnění spojené s infikovanými protetickými materiály mohou být klasifikovány jako brzké (vznikající nejpozději do 3 měsíců po operaci), opožděné (projevující se 3 – 24 měsíců po operaci), nebo pozdní - ty, které manifestují po více než 24 měsících po operaci (Zimmerli, 2006). Tabulka I uvádí celkový počet zdravotnických implantátů vložených každý rok do pacientů v USA a udává riziko infekce s vložením zdravotnického materiálu do pacienta společně s rizikem úmrtnosti (Darouiche, 2001).

Tab. I Závažnost problému infekcí spojených s aplikací implantátů osídlených mikrobiálních biofilmem (Darouiche, 2001)

Zdravotnické zařízení	Odhadované počty aplikovaných zařízení za rok	Míra infekce [%]	Úmrtnost
Katétry močového měchýře	>30 000 000	10-30	Nízká
Žilní katétry	5 000 000	3-8	Střední
Zubní implantáty	1 000 000	5-10	Nízká
Kloubní protézy	600 000	1-3	Nízká
Kardiostimulátory	300 000	1-7	Střední
Prsní implantáty	130 000	1-2	Nízká
Umělé srdeční chlopně	85 000	1-3	Vysoká

Mikroorganismy podílející se na infekcích kloubních náhrad

Biofilm vytvořený na zdravotnickém materiálu může být tvořen především bakteriemi či kvasinkami. Bakterie, které jsou běžně izolovány z těchto materiálů, zahrnují gram-pozitivní *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* a druhy rodu *Streptococcus*; a gram-negativní *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Donlan, 2001). Mezi nejčastěji izolované kvasinky, které způsobují svým osídlením medicínského materiálu nozokomiální infekce, patří obzvláště kvasinky z rodu *Candida*. Nejčastější komenzál z kvasinek, který tvoří biofilm u lidí, je *C. albicans*. Nicméně

ta není jedinou kvasinkou z rodu *Candida*, která kolonizuje biomateriály. Jsou to také například *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* a *C. glabrata* (Shinde a kol., 2012; Silva a kol., 2009). Tabulka II zobrazuje nejčastěji izolované mikroorganismy schopné tvořit biofilm ze zavedeného medicínského materiálu.

Tab. II Mikroorganismy tvořící biofilm, izolované ze zdravotnického materiálu (Donlan, 2001)

Zavedený zdravotnický implantát	Mikroorganismus
Žilní katétry	koagulasa-negativní stafylokoky, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>
Umělé srdeční chlopně	<i>Streptococcus</i> , koagulasa-negativní stafylokoky, enterokoky, <i>Staphylococcus aureus</i>
Katétry močového měchýře	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
Umělé kyčelní náhrady	koagulasa-negativní stafylokoky, β -hemolytické streptokoky, enterokoky, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Bacterioides species</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Nitroděložní tělíska	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Candida albicans</i>

Přírodní látky jako inhibitory tvorby biofilmu

Přírodní látky mohou mít vliv na všechny fáze tvorby biofilmu a mohou interagovat i se zralým biofilmem. Jsou schopny měnit fyzikálně-chemické vlastnosti prostředí (např. povrchové napětí) nebo interferovat s buněčnými membránami, které se podílejí na adhezi buněk. Jak již bylo řečeno, bakteriální biofilmy jsou relativně odolné na léčbu antibiotiky oproti jejich planktonní formě a eradikace biofilmu související s vloženým zdravotnickým zařízením často vyžaduje odstranění infikovaného implantátu (Hawser a Douglas, 1995). Proto má zvyšující se bakteriální rezistence vůči antibiotikům za následek zvýšenou snahu o hledání alternativní léčebných možností. Pro zvýšení účinnosti těchto nových léčebných strategií proti bakteriálním a mykotickým infekcím je žádoucí využívat různé látky, které vedou k inhibici růstu biofilmu, narušení struktury biofilmu nebo eradikaci biofilmu. Tyto látky mohou zahrnovat enzymy, kovové nanočástice, antibiotika, kyseliny, biosurfaktanty, deriváty chitosanu nebo různé rostlinné extrakty, jako jsou například polyfenolické látky. V lidovém léčitelství se již od pradávna využívají izolované látky z velkého množství rostlin (Taraszkiewicz a kol., 2012).

Jednu z nejdůležitějších skupin biosurfaktantů z hlediska jejich antimikrobiální aktivity představují rhamnolipidy. Jedna se o amfipatické glykolipidy složené z cukerné hydrofilní složky (rhamnosy) a hydrofobní β -hydroxy mastných kyselin (Randhawa a Rahman, 2014). Chitosan je polykationtový polymer se specifickou strukturou a vlastnostmi. Obsahuje více než 5000 glukosaminových jednotek a komerčně je získáván derivací chitinu z pláštěů korýšů a krevet. Takto izolovaný chitin je následnou alkalickou deacetylací převeden na chitosan. Nedávné pokroky v biotechnologiích naznačují, že kultivace hub (*Aspergillus niger*) může

zajistit alternativní zdroj chitosanu (Rabea a kol., 2003). Další skupinou látek s antimikrobiální aktivitou jsou polyfenoly (např. resveratrol, pterostilben či pinosylvin). Jedná se o sekundární metabolity rostlin, které mají důležitou roli při obraně proti rostlinným patogenům či jako reakce při stresových podmínkách, například nadměrné množství ultrafialového záření (Daglia, 2012). Mechanismus antimikrobiálního působení stilbenů není v současné době přesně znám (Chong a kol., 2009).

Literatura

- Bryers J. D. (1993) Bacterial Biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, str. 197-204.
- Carattoli, A. (2001) Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32, str. 243-259.
- Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hébraud M., Bernardi T. (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68, str. 605-612.
- Chong J., Poutaraud A., Hugueney P. (2009) Metabolism and role of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177, str. 143-155.
- Daglia M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, str. 174-181.
- Darouiche R.O. (2001) Device-associated infections: A macroproblem that starts with microadherence. *Healthcare Epidemiology*, 33, str. 1567-1572.
- Davies D.G., Marques C.N.H. (2009) A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *American Society for Microbiology*, 191 (5), str. 1393-1403.
- Donlan R.M. (2001) Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Healthcare Epidemiology*, 15, str. 1387-1392.
- Flemming H. C., Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, str. 623-633.
- Geetha M., Singh A.K., Asokamani R., Gogia A.K. (2009) Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science*, 54, str. 397-425.
- Giedraitienė A., Vitkauskienė A., Naginienė R., Pavilionis A. (2011) Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 47 (3), str. 137-146.
- Hawser S.P., Douglas L.J. (1995) Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (9), str. 2128-2131.
- Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, str. 322-332.
- Jabra-Rizk M. A., Falkler W. A., Meiller T. F. (2004) Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 10, str. 14-19.
- Jenkinson H. F., Lappin-Scott H. M. (2001) Biofilms adhere to stay. *Trends in Microbiology*, 9, str. 9-10.
- Kokare C. R., Chakraborty S., Khopade A. N., Mahadik K. R. (2009) Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, str. 159-168.
- Randhawa K.K.S., Rahman P.K.S.M. (2014) Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 5 (454), str. 1-7.
- Rabea E.I., Badawy M.E.-T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. (2003) Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4 (6), str. 1457-1465.
- Shinde R. B., Raut J. S., Karuppayil M. S. (2012) Biofilm formation by *Candida albicans* on various prosthetic materials and its fluconazole sensitivity: a kinetic study. *Mycoscience*, 53, str. 220-226.
- Silva S., Henriques M., Martins A., Oliveira R., Williams D., Azaredo J. (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*, 47, str. 681-689.
- Taraszkiewicz A., Fila G., Grinholz M., Nakonieczna J. (2012) Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed Research International*, 2013, str. 1-13.
- Vojtěch D. (2006) Slitiny neželezných kovů (Kovové materiály), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, str. 125-151.
- Wang Y., Wang T., Hu J., Ren Ch. J., Lei H., Hou Y., Brantner H. A. (2010) Anti-biofilm activity of TanReQing, a traditional Chinese medicine used for the treatment of acute pneumonia. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, str. 165-170.
- Wilking J. N., Angelini T. E., Seminara A., Brenner M. P., Weitz D. A. (2011) Biofilms as complex fluids. *Material Research Society*, 36, str. 385-391.
- Zimmerli W. (2006) Prosthetic-joint-associated infections. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20 (6), str. 1045-1063.

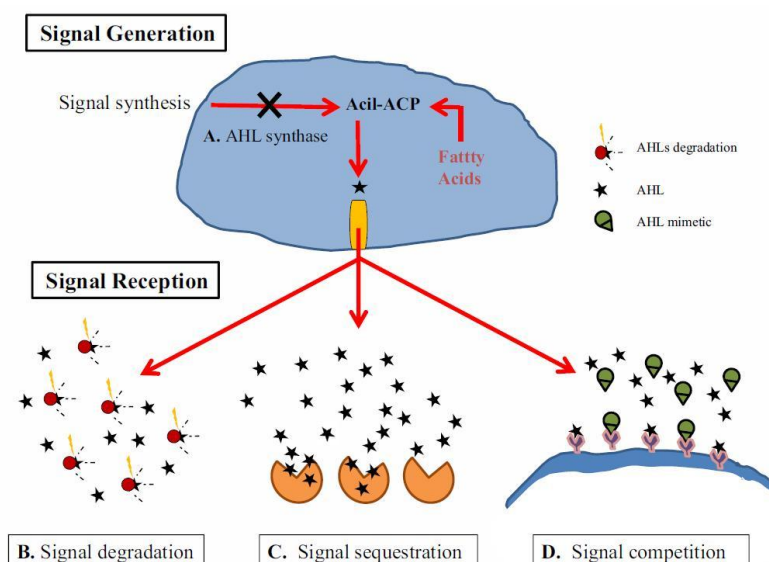
Využití přírodních látek k regulaci tvorby biofilmu

Paldrychová M., Kolouchová I., Kvasničková E., Pádrová K.

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Úvod

Infekce způsobené oportunně patogenními a patogenními mikroorganismy představují pro lidstvo závažný problém již odpradáвна. S nástupem antibiotik se věřilo, že jde o definitivní řešení tohoto problému, iracionální používání antibiotik však v konečném důsledku vedlo k rychlému nástupu mikrobiální rezistence, která staví lidstvo před nutnost hledání nových alternativních řešení. Možným řešením této problematiky by kromě jiného mohla být i aplikace některých přírodních látek. Mnoho látek izolovaných z rostlin disponuje antimikrobiální aktivitou, jedná se především o alkaloidy, kumariny, saponiny, taniny, chinony a fenoly (Gyawali a Ibrahim, 2014). Přírodní látky bývají účinné již v nižších koncentracích a nepodporují vznik rezistence. Na rozdíl od syntetických molekul jsou produkty rostlinného původu (zejména sekundární metabolity) účinné při eradikaci extracelulárních polymerních struktur a při blokování mezibuněčné komunikace prostřednictvím quorum sensing (obr. 1) (Sen a kol., 2015; Thebault a kol., 2013).



Obr. 1: Schéma možných mechanismů působení fytochemikálií jako inhibitorů quorum sensing (QS). Proces QS může být narušen snížením aktivity receptorů pro N-acylhomoserin laktony (AHLs), což jsou molekuly využívané ke komunikaci gram-negativními bakteriemi, inhibicí AHL syntázy nebo inhibicí produkce signálních molekul degradací, sekvestrací a také kompeticí AHL s fytochemikáliemi, které mají podobnou strukturu jako AHLs (Truchado a kol., 2015).

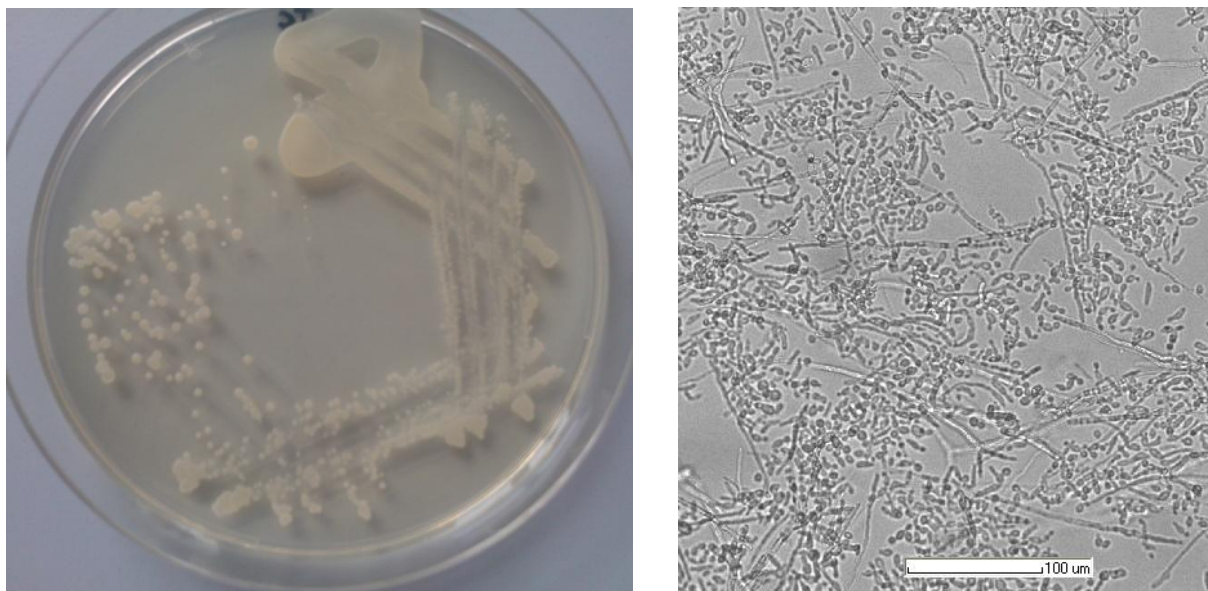
Biofilm

Existuje celá řada evolučních výhod pro buňky žijící v biofilmu. V průběhu kolonizace musí bakterie nebo kvasinky odolávat obranným mechanismům hostitele, mezi něž patří např. změna pH nebo atak fagocytů. Mikroorganismy žijící v biofilmovém společenství se s těmito překážkami vyrovnávají lépe než buňky planktonní (Wilkins a kol., 2014).

Je známo nesčetně mechanismů, kterými buňky přichází do těsného kontaktu s povrchem, pevně se k němu váží, interagují spolu a rostou jako jedna komplexní struktura. Formace biofilmu zahrnuje několik kroků zahájených přichycením prvních buněk na povrch. Obecně platí, že přichycení je pravděpodobnější na površích, které jsou hydrofobní a hrubší. Po připevnění k povrchu se buňky shlukují do struktur známých jako mikrokolonie a dále se dělí. Po vzniku mikrokolonií je započata produkce extracelulárních polymerních struktur (EPS), které se sestávají z polysacharidů, proteinů, nukleových kyselin, lipidů, fosfolipidů a huminových látek, přičemž nejvíce jsou zastoupeny proteiny a polysacharidy. EPS jsou odpovědné za soudržnost buněk a jejich adhezi k povrchu, působí jako počáteční obranná bariéra před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí (např. vysoký osmotický tlak, nízká koncentrace živin a dostupnost kyslíku, přítomnost antibiotik či imunitní reakce hostitelského organismu). Hnačí silou ve vývoji biofilmového společenství je sebe-organizace a kooperace mezi buňkami, proto spolu buňky komunikují prostřednictvím quorum sensing. Životní cyklus biofilmu končí liberací planktonních buněk nebo malých segmentů, které se šíří a osidlují další povrch (Wilkins a kol., 2014, Simões a kol., 2010).

Biofilm *Trichosporon cutaneum*

Infekce touto vláknitou kvasinkou představují třetí nejčastější kvasinkovou infekci u imunosuprimovaných pacientů a souvisejí s tvorbou biofilmu (obr. 2). Ten se tvoří zejména na žilních katetrech. Schopnost kvasinky adherovat a tvořit biofilm na implantátech vede k rozvoji systémové trichosporonózy. První případ invazivní trichosporonózy byl popsán v roce 1970. V roce 1997 byla popsána endoftalmitida u pacientky a akutní myeloblastickou leukémií. *T. cutaneum* je také jedním z mikroorganismů, které mohou způsobit méně závažné onemocnění nehtového lůžka (onychomykózu). Léčba pacientů s trichosporonózou zůstává výzvou, protože existuje jen velmi málo dostupných údajů týkajících se aktivity antimykotik *in vivo* a *in vitro*. Většinou není možné dosáhnout minimálních inhibičních koncentrací (MIC) amphotericinu B v plasmě, léčba triazoly (flukonazol) naproti tomu přináší lepší výsledky (Colombo a kol., 2011).



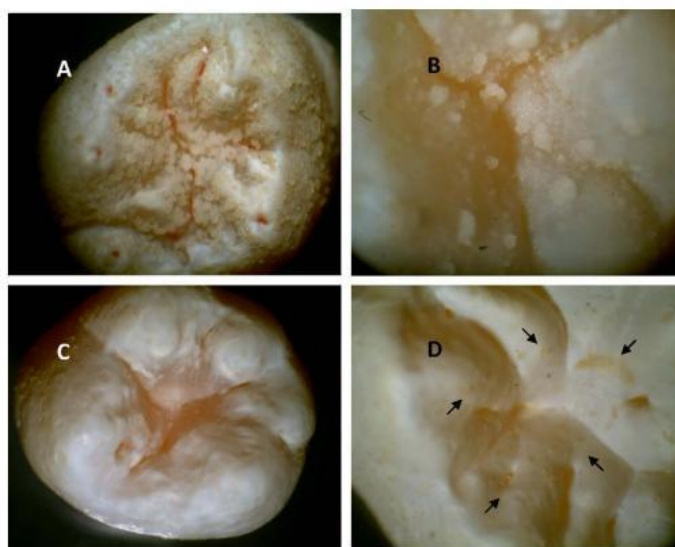
Obr. 2: *T. cutaneum*, nárůst na živném agaru (vlevo), adherované buňky *T. cutaneum*, snímek z automatického mikroskopu Cellavista (vpravo)

Fenolové látky s antimikrobiální a antibiofilmovou aktivitou

Polyfenoly jsou sekundární metabolity produkované vyššími rostlinami, hrají zásadní roli ve fyziologii těchto rostlin, podílejí se na obraně proti rostlinným patogenům, býložravcům a slouží také jako odpověď na abiotický stres. Mají vysoký potenciál z hlediska lidského zdraví, působí totiž jako antioxidanty, antialergika a antihypertenziva, ale mají také protizánětlivé a protirakovinné účinky. Během posledních dvaceti let jsou tyto látky studovány především pro svou antimikrobiální aktivitu proti široké škále mikroorganismů (Daglia, 2012). Za antimikrobiální aktivitu fenolových látek jsou zodpovědné hydroxylové skupiny. Za míru aktivity zodpovídá počet těchto skupin a také počet a poloha dvojných vazeb. Aktivita látek izolovaných z rostlin záleží také na způsobu extrakce, typu mikroorganismu, velikosti inokula a kultivačním médiu (Gyawali a Ibrahim, 2014). Z hlediska chemické struktury dělíme fenoly na flavonoidní a nonflavonoidní. Flavonoidy můžeme dále dělit na flavonoly, flavony, flavanony, anthokyany, flavanoly a isoflavony. Hlavní skupiny nonflavonoidů představují fenolové kyseliny a stilbeny, (Daglia, 2012).

Poměrně nedávno vzrostl zájem o fenolické sloučeniny přirozeně se vyskytující v potravě, jelikož mnohé z nich mají příznivý vliv na zdraví člověka. Mnoho antioxidantů izolovaných z rostlin jsou právě polyfenoly. Antioxidační účinek těchto látek spočívá v jejich schopnosti deaktivovat nebo stabilizovat volné radikály. Hlavními zdroji přírodních polyfenolů jsou čaj, káva, zelenina, luštěniny, celozrnné obiloviny a ovoce. Extrakty ze zeleného čaje inhibují např. růst bakterie *Helicobacter pylori*. Extrakty z černého čaje inhibují tvorbu biofilmu u orálních streptokoků (Bansal a kol., 2013). Mnoho experimentálních studií se také zabývá účinností rostlinných esenciálních olejů, např. eukalyptového, při zneškodňování biofilmů. Potvrzena byla mimo jiné antifungální aktivita esenciálních olejů z Dobromyslu obecného (*Origanum vulgare*), Rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) nebo Levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*). Přičemž antifungální účinky *O. vulgare* byly vyšší nebo téměř stejné v porovnání s benzalkonium chloridem, a to pravděpodobně z důvodu vysokého obsahu fenolické sloučeniny karvakuolu v tomto oleji. *O. vulgare* brání růstu mycelia a sporulaci rodů *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* (Stupar a kol., 2014). Rozvoj bakteriálního biofilmu *Propionibacterium acnes* může být tlumen výtažky z kořene křídlatky japonské (*Polygonum cuspidatum*), které obsahují antibiofilmově aktivní fenolové látky icarin, resveratrol a salidrosid (Coenye a kol., 2012).

Látky izolované z *Vitis amurensis* (Réva amurská) jako jsou piceatannol, *trans*-resveratrol a *trans*- ϵ -viniferin byly studovány jako antimikrobiální látky u bakterie *Streptococcus mutans* (obr. 3) a *Streptococcus sanguis*.



Obr. 3: Biofilm *S. mutans* na povrchu zubu po sedmi dnech (A), při větším zvětšení (B), v přítomnosti extraktu z *V. amurensis* (C), při větším zvětšení (D) (Yim a kol., 2010).

Tyto bakterie žijí v ústní dutině člověka, způsobují zubní kaz a paradentózu. Přichytávají se na zuby pomocí sacharidového polymeru, který tvoří hlavní část zubního plaku. Výše uvedené látky, obsažené ve *V. amurensis* slouží k redukci zubního plaku a jako prevence zubního kazu. Tyto sloučeniny a jejich deriváty by mohly v budoucnu sloužit jako alternativa k běžně užívaným chemikáliím v zubním lékařství (Yim a kol., 2010).

V této práci byl studován vliv komerčně dostupného potravinového doplňku Regrapexu-R-forte, který obsahuje výtažek z hroznů vinné révy (*Vitis vinifera*) a výtažek z kořene křídlatky japonské (*Polygonum cuspidatum*), na růst kvasinky *T. cutaneum* v suspenzi, dále jeho vliv na tvorbu biofilmu této kvasinky a také účinky tohoto preparátu na dvoudenní biofilm *T. cutaneum*. Tento potravinový doplněk je indikován především k podpoře správné funkce oběhového systému. Má deklarované množství resveratrolu 9 % a polydatinu 30 %, proto byl v této práci studován rovněž samostatný vliv těchto látek na růst kvasinky *T. cutaneum*.

Literatura

- Bansal, S.; Choudhary, S.; Sharma, M.; Kumar, S. S.; Lohan, S.; Bhardwaj, V.; Syan, N.; Jyoti, S., Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Research International* **2013**, 53 (2), 568-584.
- Colombo, A. L.; Padovan, A. C. B.; Chaves, G. M., Current Knowledge of Trichosporon spp. and Trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews* **2011**, 24 (4), 682-700.
- Daglia, M., Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* **2012**, 23 (2), 174-181.
- Gyawali, R.; Ibrahim, S. A., Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* **2014**, 46, 412-429.
- Sen, T.; Karmakar, S.; Sarkar, R., Chapter 15 - Evaluation of Natural Products against Biofilm-Mediated Bacterial Resistance. In *Based Validation of Herbal Medicine*, Mukherjee, P. K., Ed. Elsevier: Boston, **2015**; 321-338.
- Simões, M.; Simões, L. C.; Vieira, M. J., A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* **2010**, 43 (4), 573-583.
- Stupar, M.; Lj. Grbić, M.; Džamić, A.; Unković, N.; Ristić, M.; Jelikić, A.; Vukojević, J., Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African Journal of Botany* **2014**, 93, 118-124.
- Thebault, P.; Lequeux, I.; Jouenne, T., Antibiofilm strategies. *Journal of Wound Technology* **2013**, 21, 36-39.
- Truchado, P.; Larrosa, M.; Castro-Ibáñez, I.; Allende, A., Plant food extracts and phytochemicals: Their role as Quorum Sensing Inhibitors. *Trends in Food Science & Technology* **2015**, 43 (2), 189-204.
- Yim, N.; Ha, D. T.; Trung, T. N.; Kim, J. P.; Lee, S.; Na, M.; Jung, H.; Kim, H. S.; Kim, Y. H.; Bae, K., The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 20 (3), 1165-1168.
- Wilkins, M.; Hall-Stoodley, L.; Allan, R. N.; Faust, S. N., New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *Journal of Infection* **2014**, 69, 47-52.

Příprava rekombinantních nukleas s potenciálním farmakologickým účinkem

Tereza Streckerová, Petra Lipovová

VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28, Praha

Cílem této práce byla příprava dvou rekombinantních nukleas s farmakologickým potenciálem – TBN1 z rajčete (*Lycopersicon esculentum*) a TrypN z prvoka *Trypanosoma brucei*. Jako produkční organismus pro tyto nukleasy byla zvolena kvasinka *Pichia pastoris*. Kvasinky byly transformovány různými formami genu pro TBN1 a sekrečního signálu α -MF, který směřuje produkci rekombinantních proteinů do extracelulárního prostoru. Gen pro TBN1 byl modifikován tak, aby vznikl jednak neaktivní mutant bez nukleasové aktivity, jednak forma s kodonovou optimalizací pro *P. pastoris*. Nejlepším dosaženým výsledkem byla intracelulární stabilní produkce nukleasy. Příčina neúspěšné sekrece a nízké hladiny exprese TBN1 kvasinkami nebyla zjištěna. V případě produkce TrypN byl nejdříve gen pro nukleasu vnesen do vhodného plasmidu, kterým byly kvasinky transformovány. Stejně jako v případě TBN1, i u nukleasy TrypN byla pozorována pouze intracelulární exprese proteinu. Ten byl v buňkách navíc pravděpodobně degradován. Rekombinantní nukleasy se z buněk *P. pastoris* nepodařilo purifikovat.

Biofiltrace těkavých látek za použití termofilní populace

Lukáš Linha, Ing. Martin Halecký

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Tato práce se zabývá degradací organických těkavých látek emitovaných do životního prostředí v odpadních plynech pomocí termofilních mikroorganismů. První část práce byla zaměřena na izolaci a kultivaci termofilních mikroorganismů schopných degradace vybraných těkavých organických látek a přípravy inokula pro kombinovaný biofiltrační reaktor. Čisté mikrobiální kmeny byly podrobeny identifikaci a základním testům, v nichž byla ověřena schopnost degradace vybraných látek a teplotní rozmezí růstu. Identifikace odhalila přítomnost rodů *Bacillus*, *Geobacillus*, *Aeribacillus* a *Thermobacillus*. Druhá část práce zahrnuje biofiltraci plynu kontaminovaného směsí těkavých organických látek (ethyl acetát, propionová kyselina, triethylamin a α -pinen) při 55 °C. Byla stanovena eliminační kapacita pro jednotlivé látky při různých vstupních podmínkách, kdy se měnily hodnoty vstupní koncentrace, průtoku plynu a organické zátěže. Nejlépe byl odstraňován ethyl acetát a nejhůře triethylamin. S výjimkou testů při 25°C byla koncentrace rozpuštěného kyslíku rovna nule, biologické procesy při 55 °C tedy byly limitovány kyslíkem. Kromě rozpuštěných vstupujících látek byly detekovány také metabolity a to formaldehyd, acetaldehyd, mravenčí kyselina, octová kyselina, butanol, aceton, L-pinokarveol, 2-pinen-4-on a cis-karveol. Byla také pozorována schopnost bioreaktoru účinně odstraňovat polutanty i při teplotě 25°C.

Fenotypová analýza produkce rhamnolipidů

Natálie Moravcová, Vladimír Jirků

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Rostoucí snaha o nahrazení některých syntetických surfaktantů látkami biologického původu, tj. biosurfaktanty produkovanými mikrobiálními producenty, vyžaduje (mimo další) detekci faktorů, které indukují i potlačují jejich biosyntézu. Produkce rhamnolipidů je závislá na mnoha faktorech, zejména pak na produkčním mikroorganismu, způsobu vedení kultivace, složení média, pH, teplotě, míchání či vzdušnění. V tomto kontextu, byla předcházející charakterizace třech producentů vícesložkových směsí rhamnolipidů: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* 188, získaných ze sbírky: ARS Culture Collection (Bacterial Foodborne Pathogens and Mycology Research Unit, USA), doplněna charakteristikou vlivu složení média a vlivu dvojmocných kationtů. Další (fenotypově necharakterizovaný) producent rhamnolipidů: *Enterobacter hormaechei* (ARS Culture Collection) byl použit pro detekci vlivu již dříve testovaných zdrojů C a N (viz výše uvedené kmeny). Výsledky získané v této souvislosti umožnily pro tento kmen navrhnout různé poměry C/ N, a tyto ověřit jako faktory ovlivňující reprodukovatelnost s růstem spojené produkce rhamnolipidů. Dále se práce zabývá vlastnostmi směsi rhamnolipidů produkované na upraveném médiu.

Struktura a vlastnosti biofilmů vláknitých eukaryot

Paulíček V., Masák J., Kvasničková E.

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Úvod

Problematika biofilmů vláknitých eukaryot je velice mladé téma. Dlouhou dobu se mezi odbornou veřejností diskutovalo, zda jsou mikroorganismy patřící do této skupiny (tedy vláknité kvasinky a plísně) schopny tvořit biofilm. Tyto pochybnosti vyvrátili studie, sledující expresi genů. Hlavní úsilí, které je věnováno studiu biofilmů vláknitých eukaryot, je směřováno na jejich využití v průmyslu pro produkci primárních a sekundárních metabolitů. Druhou větev tohoto zájmu tvoří studium zdravotních komplikací, které jsou spojeny s výskytem těchto biofilmů. Tato práce má za cíl uvést čtenáře do této problematiky (Harding a kol., 2009).

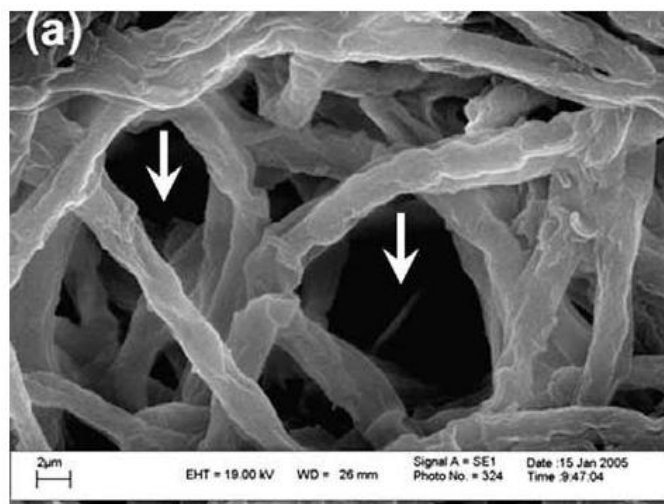
Biofilm

Většina známých mikroorganismů preferuje růst v komplexním konsorciu, ve formě strukturovaného polymikrobiálního biofilmu asociovaného k biotickým či abiotickým povrchům. Více než 99 % mikroorganismů je schopno růst ve formě tohoto buněčného společenství. Mikroorganismy rostoucí společně v biofilmu produkují extracelulární matrix (ECM), která pomáhá udržovat jeho strukturu, a zároveň plní funkci ochranného štítu vůči nepříznivým vnějším podmínkám (např. odpověď hostitelského organismu a účinkem antimikrobních látek). Dále dochází ke změně fenotypu těchto buněk v porovnání s buňkami planktonními neboli suspenzními. Mezi hlavní tyto změny patří zvýšená rezistence vůči fyzikálním, chemickým a biologickým stresovým faktorům, rozdílná hodnota růstové rychlosti a rozdíl v genové expresi. Vznik biofilmů patogenních či oportunně patogenních mikroorganismů v hostitelském organismu je zdrojem invazivních infekcí, přičemž u 80 % těchto onemocnění hovoříme o chronických infekcích (Kaur a Singh, 2014; Singh a kol., 2011).

Struktura biofilmu

Pro mikrobiální biofilmy je charakteristická jejich trojrozměrná struktura, která je u biofilmů vláknitých eukaryot tvořena myceliem a složkami ECM. Při detailnějším pohledu na strukturu biofilmů zjistíme přítomnost vodních kanálků (Obr. 1), které hrají důležitou roli při intenzifikaci přestupu hmoty jak ve směru z okolí do biofilmu tak i v opačném směru (Villena a kol., 2010).

ECM je tvořena převážně z vody a extracelulárních polymerních látek (EPS), které se podílejí vedle hyfální struktury na tvorbě lešení a trojrozměrné struktury biofilmu. Hydrofobní ECM u *A. fumigatus* je složena z galaktomananů, α – 1,3 – glukánů, galaktózaaminogalaktanů, monosacharidů, polyolů, DNA, melaninu a proteinů. Tyto biopolymery jsou zodpovědné za adhezi biofilmu, jako celku, k povrchům a zároveň i pomáhají udržet biofilm v kompaktním stavu. Současně lze říci, že EPS tvoří tzv. rezervoár stavebních látek a vody (Flemming a Wingender, 2010; Kaur a Singh, 2014).

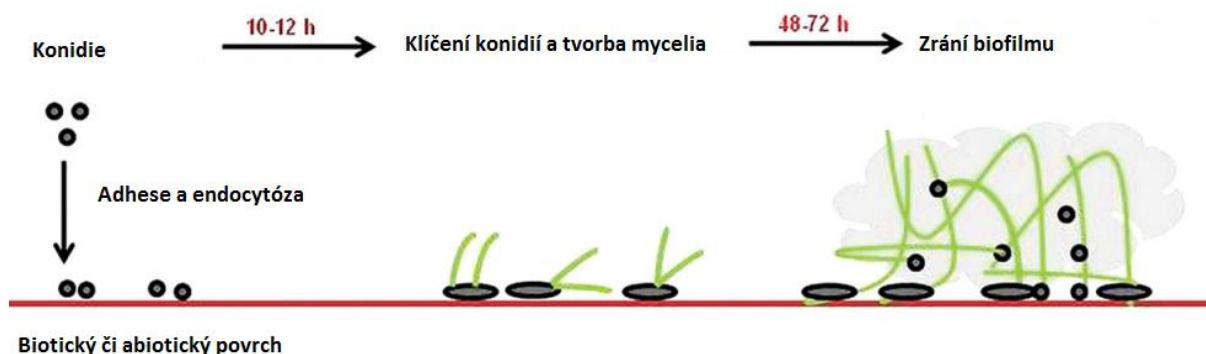


Obr. 1: Struktura biofilmu *A. niger*. Šipkami jsou znázorněny vodní kanálky (Villena a kol., 2010).

Významným strukturním rozdílem u biofilmů vláknitých eukaryot v porovnání s bakteriálními a kvasinkovými biofilmy je výskyt invazivních hyf, prostřednictvím kterých dochází k penetraci hostitelské tkáně či povrchu. Tato filamentizace neboli tvorba hyf u biofilmů kvasinek vede ke zvýšení robustnosti a virulenci těchto biofilmů (Singh a kol., 2011).

Formování biofilmu

Proces formování biofilmu u plísně *A. fumigatus* (Obr. 2) začíná adhezí konidií k *in vivo* či *in vitro* povrchům. Po zhruba 10 ti hodinové lag fázi dochází k jejich klíčení, růstu hyf a tvorbě tzv. monovrstvy (10 – 16 h). Následně se zvyšuje robustnost biofilmu a dochází k jeho zrání, během kterého se výrazněji rozvíjí jeho komplexivní trojrozměrná struktura (20 – 24 h) (Kaur a Singh, 2014).



Obr. 2: Formování biofilmu *A. fumigatus* (Kaur a Singh, 2014).

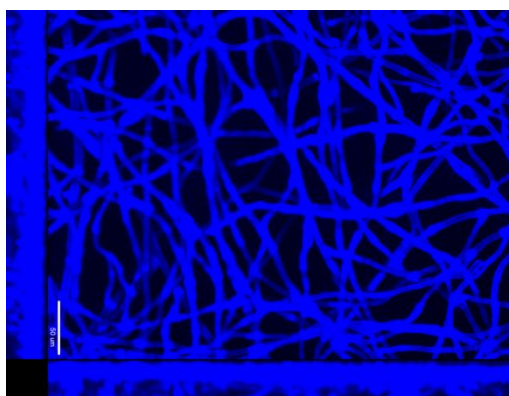
Látky interferující s procesem tvorby biofilmu

V současné době představují biofilmy, pokud jsou tvořeny patogenními či oportunně patogenními mikroorganismy, závažné riziko vzniku invazivních a chronických infekcí. Jak již bylo zmíněno výše, biofilmy vykazují zvýšenou rezistenci vůči antibiotikům. U některých

zástupců rodu *Candida* hovoříme dokonce o multirezistenci. Z tohoto důvodu je snaha odborné veřejnosti nalézt nové alternativní látky, u kterých by se nevyskytovala rezistence, a zároveň by byly málo toxické pro lidský organismus. Zástupcem antibiotik, které se používají pro léčbu fungálních onemocnění obecně, a tedy i proti biofilmům tvořených vláknitými eukaryotami, je polyenové makrolidové antibiotikum amfotericin B, který i přes svou značnou toxicitu, především se jedná o jeho nefrotoxický účinek, je považován za zlatý standard. Avšak klinické studie poukazují na stoupající procento rezistentních kmenů vůči tomuto antibiotiku. Mechanismus účinku amfotericinu B je založen na tvorbě ireversibilního komplexu makrolidového kruhu se sterolovou složkou eukaryotické membrány. Tato interakce má za následek permeabilizaci cytoplazmatické membrány. Alternativní látkou, která vykazuje vhodné antimikrobní účinky a prakticky nulovou toxicitu vůči lidským buňkám i ve vysokých koncentracích je chitosan. Tento deacetylovaný derivát chitinu je polykationtní sloučenina která díky svému náboji interaguje s negativně nabitými fosfolipidovými hlavicemi v buněčné membráně prokaryot i eukaryot a způsobuje vznik rigidních oblastí, ve kterých dochází ke zlomům a ztrátě důležitých vnitrobuněčných komponent. Na základě studií prováděných s tímto polysacharidem lze usuzovat na jeho vysoký potenciál v boji proti prokaryotním i eukaryotním biofilmům (Colombo a kol., 1994; Kong a kol., 2010, Ramage a kol., 2012).

Biofilm *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus je saprofytická houba, která se v přírodě podílí na rozkladu organických materiálů. Tato plíseň je druhým nejčastějším zdrojem fungálních onemocnění u hospitalizovaných pacientů. U imunokompetentních jedinců dochází k eliminaci inhalovaných konidií prostřednictvím buněk imunitního systému a to konkrétně pulmonárními makrofágy a neutrofily. Inhalace konidií u imunodeficientních pacientů (např. s nízkou hladinou neutrofilů) způsobuje řadu závažných onemocnění respiračního systému jako jsou např. aspergilom, invazivní pulmonární aspergilóza a broncho pulmonální aspergilóza. Po inhalaci konidií dochází u těchto pacientů k jejich klíčení a následnému rozvoji biofilmové struktury a tvorbě invazivních hyf, které penetrují pulmonární epitelní a endotelní buňky (Kaur a Singh, 2014).



Obr. 3: Orthogonální zobrazení biofilmu *A. fumigatus*; 72 h; SDCM; DAPI (foto Vít Paulíček).

Literatura

- Colombo A.L., McGough D.A., Rinaldi M.G. (1994) Discrepancies between MIC and MLC values of amphotericin B against isolates of *Aspergillus* species. *Mycopathologia*, 128(3), str. 129-133.
- Flemming H.C., Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), str. 623-633.
- Harding M.W., Marques L.L., Howard R.J., Olson M.E. (2009) Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol*, 17(11), str. 475-480.
- Kaur S., Singh S. (2014) Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, 52(1), str. 2-9.
- Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J. (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol*, 144(1), str. 51-63.
- Ramage G., Rajendran R., Sherry L., Williams C. (2012) Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*, DOI:10.1155/2012/528521.
- Singh R., Shivaprakash M.R., Chakrabarti A. (2011) Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiology*, 157(9), str. 2611-2618.
- Villena G.K., Fujikawa T., Tsuyumu S., Gutiérrez-Correa M. (2010) Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresour Technol*, 101(6), str. 1920-1926.

Vliv kultivačních podmínek na produkci rhamnolipidů

Andrej Suchánek, Olga Schreiberová

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Rhamnolipidy jako povrchově aktivní látky biologického původu přitahují pozornost, protože představují ekologickou alternativu k jejich syntetickým protějškům. Velká výhoda v použití biosurfaktantů oproti chemickým surfaktantům spočívá v jejich velmi malé toxicitě a vysoké stabilitě vůči extrémním vnějším podmínkám prostředí (pH, obsah solí, teplota). V nízkých koncentracích rhamnolipidy zároveň nabízí vyšší aktivitu v kombinaci s velmi dobrou biologickou degradovatelností, což z nich dělá ekologicky šetrné sloučeniny. Biosurfaktanty nabízejí možnost širokého uplatnění například ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu, využití nachází také v ochraně životního prostředí při degradacích hydrofobních polutantů. Biosyntéza rhamnolipidů je regulována složitým genetickým regulačním systémem. Ve značné míře také závisí na vnějších podmínkách kultivace, jako jsou například teplota, pH, či složení média. Tato práce je zaměřena na sledování produkce rhamnolipidů v reaktoru pod vlivem vnějších podmínek kultivace a také systému quorum sensing. Byl sledován vliv přídavku jak autoinduktorů tak inhibitorů QS a také vliv vzdušnosti, pH, teploty, salinity a zdroje uhlíku. Zkoumána byla také možnost změny vedení kultivace. Byl také pozorován průběh koncentrace HSL molekul během kultivace na produkci rhamnolipidů.

Sklízení jednobuněčných sladkovodních řas metodou flokulace

Jana Smolová, Tomáš Brányik

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Řasová biomasa obsahuje kromě polysacharidů a triacylglyceridů, které jsou využitelné k výrobě bioethanolu či bionafty, mnoho dalších cenných látek, které jsou hodnotné pro další aplikace. Sklizení jednobuněčných řas se v průmyslovém měřítku provádí např. centrifugací, ale jelikož řasová biomasa dosahuje při fototrofních kultivacích obvykle jen velmi malých koncentrací (0,5 až 5 g.l⁻¹), je nutné zpracovávat velké objemy, což je energeticky náročné. Proto je snaha řasovou biomasu nejprve více zakonzentrovat, aby se zpracovávaný objem zmenšil a s ním i ekonomická náročnost procesu. Jednou z možností je použití metody flokulace, kdy se řasy shlukují do větších útvarů, které pak snadněji a rychleji sedimentují. Tato práce se zabývá sklizením zelené řasy *Chlorella vulgaris* pomocí dvou flokulačních činidel, která byla připravena z vedlejších produktů pivovarského průmyslu, konkrétně se jedná o použité kvasinky a mláto. Tyto materiály lze účinně modifikovat pomocí činidla 2-chloro-N,N-diethylamin hydrochloridu (DEAE), díky kterému dochází k výměně iontů na povrchu částic a k vnášení kladných nábojů aminoskupinami. Takto připravená kationtová činidla velmi dobře interagují se záporně nabitými buňkami řas a způsobují tak jejich flokulaci. V provedených flokulačních experimentech byla tato činidla testována jak v modelovém prostředí 10 mmol.l⁻¹KCl, tak v reálných podmínkách kompletních minerálních medií, ať již se jednalo o čerstvě připravená media, ve kterých byl sledován vliv nejdůležitějších prvků (P, N), či o použitá media po sedmidenní kultivaci. Pro každé prostředí byla určena dávka flokulačního činidla (mg/g) účinná pro nejméně 90% účinnost flokulace. Byla provedena bilance výrobních a provozních nákladů vyvinutých flokulantů a tyto ekonomické parametry byly srovnány s flokulačními činidly z dostupné literatury.

Odbourávání směsí nitroaromatických látek v různých typech reaktorů volnými a imobilizovanými buňkami

Magda Ševčíková, Jan Páca

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Nitroaromatické látky patří do skupiny toxických polutantů vznikajících při výrobě barev, výbušnin, pesticidů, plastů, rozpouštědel a léčiv. Jednou z možností jejich odstranění z životního prostředí je jejich mikrobiální degradace. Její průběh může být ovšem značně ovlivněn, je-li v prostředí přítomno více nitroaromatických sloučenin zároveň. Cílem této práce bylo zkoumat odbourávání směsí nitrofenolů a nitrotoluenů z modelové odpadní vody imobilizovanými buňkami v jednostupňovém a dvoustupňovém náplňovém reaktoru a volnými buňkami směsné mikrobiální populace a posoudit vliv jednotlivých látek na odbourávání ostatních látek ve směsi. Rychlost odbourávání imobilizovanými buňkami byla 10x větší než u volných buněk v suspenzi. Nejvyšší dosažená rychlost odbourávání v náplňovém reaktoru byla 37,9 mg.l⁻¹ .h⁻¹ . Pro odbourávání směsí špatně odbouratelných látek se ukázal vhodný dvoustupňový reaktor tvořený dvěma sériově zapojenými náplňovými reaktory. Tento systém vykazoval vyšší celkovou účinnost odbourávání a vyšší stupeň nitrifikace uvolněných dusitanů. U třepaných baněk s volnými buňkami byla prokázána interakce mezi mononitrofenoly a mononitrotolueny jak na substrátové úrovni, tak kompetice mezi degradéry mononitrofenolů a mononitrotoluenů ve směsné populaci. Velkým vlivem byla prokázána adaptace. Rychleji se indukovala degradace mononitrofenolů než mononitrotoluenů. Nejobtížněji odbouratelný substrát a nejhorší růstový substrát byl 3-nitrotoluen. Účinnost odbourávání byla zvýšena pouze prodloužením doby zdržení, nikoliv však přidávkem kosubstrátů. Ty zvýšily pouze nárůst mikroorganismů, které se nepodílejí na degradaci 3-nitrotoluenů.

Antibiofilmová aktivita rhamnolipidů

Karel Zeman, Jan Masák

VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28, Praha

Biofilmy jsou společenství jednoho či více mikroorganismů, žijících přisedle na fázovém rozhraní. V případě patogenních mikroorganismů je tvorba biofilmu nežádoucím efektem, jelikož se buňky v tomto stavu stávají odolnějšími vůči vnějším vlivům. Tato odolnost vychází z tvorby tzv. extracelulárního matrixu, který například zvyšuje rezistenci vůči antibiotikům. Z tohoto důvodu je nutné nalézt nové strategie k zabraňování tvorby a eradikaci biofilmu. Jednou z možností je použití biosurfaktantů, které jsou schopné destabilizovat strukturu biofilmu, ovlivňují hydrofobitu povrchových struktur buněk a v některých případech mají antibakteriální účinek. Zároveň jsou biodegradovatelné a méně toxické, což je značnou výhodou oproti chemickým surfaktantům. Tato práce je zaměřena na sledování eradikace biofilmu podmíněně patogenní kvasinky *Trichosporon cutaneum*, aplikací rhamnolipidových směsí různého složení. Eradikace biofilmu je sledována za statických i dynamických podmínek na skleněném povrchu. Vyhodnocení eradikace biofilmu je prováděno analýzou obrazu.

**Sborník souhrnů a plných textů konference
KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2015**

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

Editoři: **Olga Schreiberová**

Rok vydání: 2015

Počet stran: 79

Jedná se o elektronickou verzi publikace ve formátu PDF na CD-ROM.