

Antimikrobiální působení kolicinů na bakterie produkující biogenní aminy

Andrea Martinková

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea Martinková**
Osobní číslo: **T15555**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Antimikrobiální působení kolicinů na bakterie produkující biogenní aminy**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Základní charakteristika kolicinů
2. Struktura a funkce kolicinů
3. Využití kolicinů
4. Biogenní aminy v potravinách a možnosti jejich redukce

II. Praktická část

1. Testování inhibičních účinků kolicinogenních kmenů na dekarboxyláza pozitivní bakterie
2. Vyhodnocení účinků
3. Diskuze získaných výsledků a formulace závěrů práce

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] CASCALES, E., S. K. BUCHANAN, D. DUCHE, et al. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2007, 71(1), 158–229 [cit. 2017-08-18]. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06. ISSN 1092- 2172.

[2] ŠMARDA, Jan, David ŠMAJS, Hana LHOTOVÁ a Daniela DĚDIČOVÁ. Occurrence of Strains Producing Specific Antibacterial Inhibitory Agents in Five Genera of Enterobacteriaceae. *Current Microbiology* [online]. 2007, 54(2), 113–118 [cit. 2018-01-08]. DOI: 10.1007/s00284-006-0196-1. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-006-0196-1>

[3] MAJEED, Hadeel, Osnat GILLOR, Benjamin KERR a Margaret A RILEY. Competitive interactions in Escherichia coli populations: the role of bacteriocins. *The ISME Journal* [online]. 2010, 5(1), 71–81 [cit. 2017-08-18]. DOI: 10.1038/ismej.2010.90. ISSN 1751-7362.

[4] CALCUTTAWALA, Fatema, Chellaram HARIHARAN, Gururaja P. PAZHANI, Santanu GHOSH a Thandavarayan RAMAMURTHY. Activity Spectrum of Colicins Produced by Shigella sonnei and Genetic Mechanism of Colicin Resistance in Conspecific S. sonnei Strains and Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2014, 59(1), 152–158 [cit. 2017-08-18]. DOI: 10.1128/AAC.04122-14. ISSN 0066-4804.

[5] CURSINO, Luciana, Jan MARDA, Edmar CHARTONE-SOUZA a Andréa M.A NASCIMENTO. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. Sociedade Brasileira De Microbiologia, 2002, 33(3), 185–195 [cit. 2017-08-18]. DOI: 10.1590/S1517-83822002000300001. ISSN 15178382.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

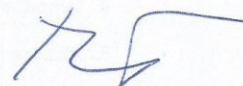
Termín odevzdání bakalářské práce:

3. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MARTINKOVÁ ANDREA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 7.5.2018

Martinková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Biogenní aminy jsou obsaženy téměř ve všech potravinách rostlinného, ale zejména živočišného původu. Nejčastěji jsou produktem mikrobiálních dekarboxyláz. Výskyt biogenních aminů v potravinách může představovat závažné zdravotní riziko pro citlivé konzumenty. Redukce množství biogenních aminů v potravinách je otázkou snížení či likvidace dekarboxyláza pozitivní mikroflóry. Cílem této práce bylo otestovat potenciál použití gramnegativních bakteriocinů (koliciny, mikrocin) k redukci biogenních aminů v maso. Koliciny a mikrocin jsou antimikrobiálně působící proteiny na taxonomicky blízce příbuzné bakterie. Nejdříve byl sledován antimikrobiální účinek bakteriocinů na dekarboxyláza pozitivní bakterie izolované z masa bažantů. Z tohoto testování byly vybrány čtyři kmeny *Escherichia coli* s nejširším spektrem účinku, z nichž byly izolovány surové bakteriociny. Bylo zjištěno, že vzhledem k tomu, že gramnegativní bakteriociny neinhibují dostatečné množství dekarboxyláza pozitivních kmenů a jsou nestabilní při skladování v chladničce, nejsou ideálním prostředkem pro redukci biogenních aminů v maso.

Klíčová slova: biogenní aminy, *Escherichia coli*, koliciny, maso, redukce

ABSTRACT

Biogenic amines are found almost in all the food of plant, but especially of animal origin. Most often, they are the product of microbial decarboxylases. The occurrence of biogenic amines in food can represent a serious health risk to sensitive consumers. The quantity reduction of biogenic amines in food is a matter of reducing or eliminating the decarboxylase and the positive microflora. The aim of this work was to test the potential of using gram-negative bacteriocins (colicins, microcins) to reduce biogenic amines in meat. Colicins and microcins are antimicrobially active proteins which affect taxonomically closely related bacteria. The first thing being done was monitoring the antimicrobial effect of bacteriocins on the decarboxylase and the positive bacteria from pheasant meat. From this testing, four strains of *E. coli* with the widest spectrum of effect were selected, from which the crude bacteriocins were isolated. It was found that since gram-negative bacteriocins do not inhibit sufficient amount of decarboxylase positive strains and are unstable when stored in the refrigerator, they do not serve as an ideal way of reducing biogenic amines in meat.

Keywords: biogenic amines, colicins, *Escherichia coli*, meat, reduction

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D. za odborné vedení, rady, konzultace a připomínky, které mi poskytovala při zpracování. Ráda bych také poděkovala laborantkám Ing. Olze Vlčkové a Bc. Veronice Kučabové za pomoc v mikrobiologických laboratořích. Mé zvláštní poděkování patří rovněž Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA KOLICINŮ	12
1.1 BAKTERIOCINY	12
1.2 KOLICINY	12
1.3 MIKROCINY	13
2 STRUKTURA A FUNKCE KOLICINŮ	15
2.1 PRODUKCE KOLICINŮ.....	18
2.2 MECHANISMUS PŮSOBENÍ.....	18
3 VYUŽITÍ KOLICINŮ	19
3.1 PROBIOTIKA	19
3.2 LÉČBA ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ PATOGENNÍM MIKROORGANISMEM.....	20
3.3 LÉČBA RAKOVINY.....	20
4 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH	22
4.1 BIOGENNÍ AMINY	22
4.2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ	22
4.2.1 Biogenní aminy ve vínu	23
4.2.2 Biogenní aminy v pivu	23
4.2.3 Biogenní aminy v mléčných výrobcích	23
4.2.4 Biogenní aminy v mase a masných výrobcích	24
4.3 MOŽNOSTI REDUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	26
5 CÍL PRÁCE	27
6 MATERIÁL A METODY	28
6.1 MATERIÁL	28
6.1.1 Seznam bakteriálních kmenů	28
6.1.1.1 Kmeny produkující a potenciálně produkující bakteriociny	28
6.1.1.2 Dekarboxyláza pozitivní kmeny	29
6.1.2 Laboratorní přístroje.....	30
6.1.3 Kultivační média	30
6.1.4 Chemikálie	31
6.1.5 Použité roztoky.....	32
6.2 METODY.....	32
6.2.1 Stanovení biologické aktivity bakteriocinů - vpichový pokus	32
6.2.2 Izolace surového bakteriocinu.....	32
6.2.3 Kapková metoda.....	33
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	34

7.1	VÝBĚR KOLICINOGENNÍCH KMENŮ	34
7.2	INHIBICE DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍCH KMENŮ	36
7.3	IZOLACE SUROVÝCH BAKTERIOCINŮ	37
7.4	APLIKACE BAKTERIOCINŮ NA CITLIVÉ DEKARBOXYLÁZA POZITIVNÍ KMENY	39
ZÁVĚR		41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		42
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		46
SEZNAM OBRÁZKŮ		47
SEZNAM TABULEK		48
SEZNAM PŘÍLOH		49

ÚVOD

Biogenní aminy jsou organické dusíkaté látky odvozené od aminokyselin. Vyskytují se v buňkách rostlin i živočichů, kde zajišťují řadu důležitých funkcí. Ve velkém množství mohou působit až toxicky. Biogenní aminy jsou obsaženy prakticky ve všech potravinách, jelikož jsou přirozenou součástí živočichů i rostlin. Více se nacházejí v živočišných potravinách, kde vznikají z bílkovin působením dekarboxyláz mikroorganismů. Ve vyšší míře vznikají při výrobě a skladování fermentovaných potravin. Při výrobě těchto potravin se totiž využívá mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Výskyt biogenních aminů v potravinách, zejména histaminu a tyraminu, může představovat závažný zdravotní problém pro citlivé osoby. Redukce množství biogenních aminů v potravinách je otázkou snížení či likvidace dekarboxyláza pozitivní mikroflóry. Existují různé možnosti, jedna z nich je aplikace bakteriocinů. Gramnegativní bakteriociny (koliciny, mikrocin) jsou antimikrobiální proteiny produkované bakterií *Escherichia coli*. Koliciny zabíjejí citlivé bakteriální buňky kmenů taxonomicky blízce příbuzných bakterií *Escherichia coli*. Do této oblasti patří také řada mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou izolovaných z potravin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA KOLICINŮ

1.1 Bakteriociny

Bakteriociny jsou ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy bakterií, které mohou zabíjet nebo inhibovat bakteriální kmeny, které jsou blízce příbuzné produkčnímu kmenu. Produkční kmen sám sebe nepoškozuje díky ochraně imunitními proteiny, které si sám produkuje. Bakteriociny se stávají jednou ze zbraní proti mikroorganismům díky jejich velké rozmanitosti struktury a funkce, a jejich schopnosti být stabilní při vyšších teplotách. Mnoho nedávných studií identifikovalo bakteriociny, které lze používat při potravinářských technologiích, jejichž cílem je prodloužit dobu konzervace potravin, léčit choroby způsobené patogeny, léčit rakovinné onemocnění a celkově udržovat zdraví člověka. Proto se bakteriociny mohou stát nástupci antibiotik a vyřešit problém s narůstající rezistencí člověka na antibiotika (Yang a kol., 2014).

V současné době jsou definovány tři základní skupiny bakteriocinů, a to koliciny, mikrocinny a korpuskulární bakteriociny. Pouze dva typy bakteriocinů jsou produkovány *E. coli* a to jsou koliciny a mikrocinny (Gordon a kol., 2006).

1.2 Koliciny

Kolicinogenie je produkce specifických baktericidních proteinů -kolicinů- bakteriemi *Escherichia coli* a příbuzných druhů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou kódovány Col plazmidy. Koliciny zabíjejí bakteriální buňky kmenů patřících do stejného či příbuzného rodu a druhu. Díky této schopnosti mají koliciny úzké spektrum antimikrobiálních účinků (Šmarda a Obdržálek, 2001; Šmarda a kol., 2007).

První kolicin byl identifikován v roce 1925 (Gratia) jako tepelně labilní produkt přítomný v kulturách *E. coli*. Dále byly charakterizovány další řady kolicinů produkováných různými kmeny enterické skupiny bakterií (*E. coli*, *Shigella* a *Citrobacter*). V roce 1946 Gratia a Fredericq prokázali proteinovou povahu a specifičnost spektra účinku kolicinů (Cascales a kol., 2007).

Od té doby mnoho autorů zveřejnilo své výzkumy o výskytu kolicinogenních kmenů lidského původu a i dalších kmenů z příbuzných druhů *Enterobacteriaceae*. Tato data se velmi lišila. Široká variace údajů o výskytu kolicinů byla způsobena různými metodami a od-

lišnými indikačními systémy, což vedlo k různorodým výsledkům. Ekologický význam kolicinogenie je do určité míry neznámý. Obecně se věří tomu, že koliciny se účastní intraspecifické nebo mezidruhové konkurence v mikroflóře tlustého střeva. Avšak obecnou schopnost kolicinů působit na obsah tlustého střeva nebyl doposud prokázán. *Escherichia coli* byla popsána v močovém traktu u potkanů. Proto se zdá být užitečné sledovat výskyt kolicinogenie u případů, u kterých se liší tzv. patologické podmínky. V tlustém střevě pacientů trpících kolorektálním karcinomem je incidence kolicinogenních kmenů *Escherichia coli* významně snížena na 46,9 % ve srovnání s normálním stavem tlustého střeva (63,8 %). Kromě toho byl pokles zaznamenán i u osob trpících na nespecifické záněty střev a to např. u Crohnovy nemoci na 58,7 %. Přesto nebylo nalezeno žádné spojení mezi klinickým stavem pacienta a kolicinogenií (Šmarda a Obdržálek, 2001).

1.3 Mikrociny

Mikrociny jsou nízkomolekulární ribozomálně syntetizované hydrofobní antimikrobiální peptidy (<10 kDa) a jsou velikostně menší od kolicinů. Mikrociny jsou produkovány jako prekurzorové peptidy. Mikrocínové prekurzory mohou, ale nemusí, podstoupit posttranslační modifikační proces v průběhu zrání na aktivní mikrocín. Mikrociny jsou převážně produkovány bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, které vykazují vysokou toleranci vůči teplu, extrémnímu pH a proteázám (Rebuffat, 2012). Baktericidní mechanismy mikrocínů jsou různé, včetně typu tvořícího póry, nukleázového typu, jako jsou funkce DNázy a RNázy, a inhibitory syntézy proteinů nebo replikace DNA (Cascales a kol., 2007; Yang a kol., 2014).

Mikrociny jsou klasifikovány jako dvě kategorie (Tab. 1) podle molekulových hmotností, disulfidových vazeb ve struktuře a posttranslačních modifikací. Mikrociny třídy I jsou mikrociny, které mají nízkou molekulovou hmotnost (<5 kDa) a jsou to posttranslačně modifikované peptidy s nízkou molekulovou hmotností (<5 kDa). Molekulová hmotnost mikrocínů třídy II je větší (5-10 kDa) než u mikrocínů třídy I. Mikrociny třídy II lze dále rozdělit do dvou podtříd, včetně tříd IIa a IIb. Mikrociny třídy IIa vyžadují tři různé geny pro syntézu a sestavení funkčních peptidů. Mikrociny třídy IIb jsou lineární peptidy s posttranslačními modifikacemi nebo bez nich na C-konci (Cascales a kol., 2007; Yang a kol., 2014).

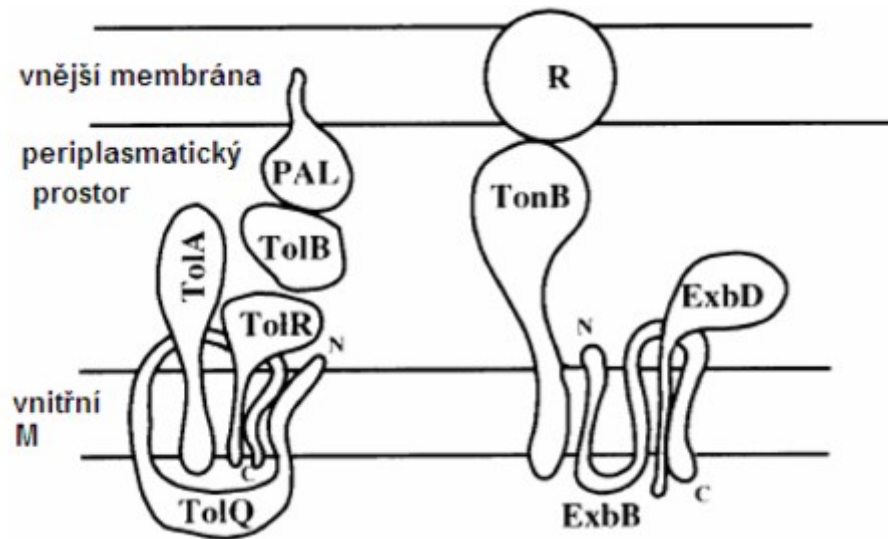
Tab. 1. Klasifikační schéma pro gramnegativní mikrocinny (upraveno a převzato z: Yang a kol., 2014).

Klasifikace	Charakteristika	Mikrociny	Molekulová hmotnost (Da)	Produkční kmen
Třída I	Peptidy s nízkou molekulovou hmotností (<5 kDa), post-translačně modifikované	B17	3094	<i>E. coli</i>
		C7/C51	1177	<i>E. coli</i>
		D93	<1000	<i>E. coli</i>
		J25	2107	<i>E. coli</i>
Třída II	Větší (5-10 kDa) peptidy, s post-translačními modifikacemi nebo bez nich			
Třída IIa	Vyžadují více než jeden gen pro syntézu a sestavení funkčních peptidů	L	8884	<i>E. coli</i>
		V	8741	<i>E. coli</i>
		N/24	7274	<i>E. coli</i>
Třída IIb	Lineární peptidy s post-translačními modifikacemi nebo bez ní na C-konci	E492	7886	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		M	7284	<i>E. coli</i>
		H47	4865	<i>E. coli</i>

2 STRUKTURA A FUNKCE KOLICINŮ

Všechny koliciny mají stejný typ organizace, který je v souladu s jejich účinkem. Standardní sekvence funkčních domén všech molekul je od N'(amino) až do C'(karboxy) konce. Koliciny jsou uspořádány do tří specifických domén: N-koncová translokační doména (T), která se podílí na přenosu kolicinu přes vnější membránu translokačním proteinem, centrální receptorovou doménou (R), která se váže na receptor bakteriální vnější membrány, a C-koncová cytotoxická doména (C), která má antibakteriální účinnost. Pro vykonání jejich působení musí koliciny překročit fyzickou bariéru, vnější membránu s lipopolysacharidovými molekulami na vnějším povrchu její dvojvrstvy a jejími malými póry, a musí být převzata citlivými buňkami. Koliciny tedy vyvinuly mechanismus parazitismu multiproteinového systému používaného citlivými buňkami pro důležité biologické funkce. Byly popsány dva odlišné, ale homologní translokační systémy, systémy Ton a Tol (Cursino a kol., 2002; Cascales a kol., 2007).

Tyto dva systémy jsou také parazitovány fágů k infikování bakterií. Pro injektování jednovláknové DNA skrze obal gramnegativních bakterií používají vláknité bakteriofágy protein g3p, který interaguje s koncem konjugačního pilu a vyžaduje systém Tol k další translokaci jednovláknové DNA skrze buněčný obal. Stejně jako kolicin, g3p následuje dvoustupňový proces importu, který zahrnuje vazbu receptoru a translokaci v membráně. Na druhou stranu fágy T1 a 80 používají vnější membránový ferrichromreceptor Fhu a Ton systém vnější membrány. Nicméně fágové proteiny interagující se systémem Ton jsou špatně popsány. Zatímco fágové buňky interagují s bakteriemi pro injekci jejich genomu a pro množení, kolicin zabíjejí vnímavé bakterie během třetího kroku působením buď nukleázovou aktivitou nebo tvorbou pórů v cytoplazmatické membráně. Systém Ton (Obr. 1) je tvořen třemi vnitřními membránovými proteiny TonB, ExbB a ExbD, zatímco systém Tol obsahuje stejné topologie a lokalizace TolA, TolQ a TolR plus periplazmatický protein TolB. Zahrnuje také Pal, vnější lipoprotein zakotvený v membráně, který se zdá být nepotřebný pro přenos kolicinů a fágů (Cascales a kol., 2007).



Obr. 1. Tol a Ton- B translokační systémy (Upraveno a převzato z: Benedetti a Geli, 1996).

Koliciny jsou rozděleny do 2 skupin: skupiny A a B (Tab. 2). Skupiny A kolicinů používají Tol systém a koliciny skupiny B používají Ton systém k proniknutí přes vnější membránu citlivých bakterií. Obecně platí, že koliciny skupiny A jsou kódovány na malých plazmidech s lytickým genem a mohou být uvolňovány z bakterií, zatímco koliciny skupiny B jsou kódovány na velkých plazmidech bez lytického genu (Yang a kol., 2014).

Podle letálního účinku se koliciny rozdělují:

- na koliciny tvořící póry: tvorba pórů nebo kanálů ve vnitřní membráně způsobuje únik cytoplasmatických sloučenin, destruktivní elektrochemický gradient, ztráty iontů a buněčné smrti.
- na koliciny typu nukleázy: koliciny obsahující DNázu, 16S rRNázu a tRNázu k nespecifické digesci DNA a RNA bakterií.
- na peptidoglykanázový typ kolicinů: tyto proteiny mohou štěpit peptidoglykanový prekurzor, což vede k neschopnosti syntetizovat peptidoglykan a bakteriální smrt (Cascales a kol., 2007; Yang a kol., 2014).

Tab. 2. Klasifikace kolicinů různých translokačních systémů: Tol- a Ton- v *E. coli* (upraveno a převzato z: Šmarda a Šmajš, 1998).

Skupina A					
Koliciny	Antibakteriální aktivita	Receptor	Translokátor	Molekulová hmotnost (Da)	Produkční kmen
A	tvorba pórů	BtuB	OmpF, TolABQR	62989	<i>Citrobacter freundii</i>
E1	tvorba pórů	BtuB	TolC, TolAQ	57279	<i>Escherichia coli</i>
K	tvorba pórů	Tsx	OmpAF, TolABQR	59611	<i>Escherichia coli</i>
N	tvorba pórů	OmpF	OmpF, TolAQR	41696	<i>Escherichia coli</i>
S4	tvorba pórů	OmpW	OmpF, TolABQR	54085	<i>Escherichia coli</i>
U	tvorba pórů	OmpA	OmpF, TolABQR	66289	<i>Shigella boydii</i>
28b	tvorba pórů	OmpA	OmpF, TolABQR	47505	<i>Serratia marcescens</i>
E2	Dnáza	BtuB	OmpF, TolABQR	61561	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella sonnei</i>
E7	Dnáza	BtuB	OmpF, TolABQR	61349	<i>Escherichia coli</i>
E8	Dnáza	BtuB	OmpF, TolABQR	70000	<i>Escherichia coli</i>
E9	Dnáza	BtuB	OmpF, TolABQR	61587	<i>Escherichia coli</i>
E3	16S rRNáza	BtuB	OmpF, TolABQR	57960	<i>Escherichia coli</i>
E4	16S rRNáza	BtuB	OmpF, TolABQR	ND	<i>Escherichia coli</i>
E6	16S rRNáza	BtuB	OmpF, TolABQR	58011	<i>Escherichia coli</i>
DF13	16S rRNáza	IutA	OmpF, TolAQR	59293	<i>Escherichia coli</i>
E5	tRNáza	BtuB	OmpF, TolABQR	58254	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella sonnei</i>
Skupina B					
Koliciny	Antibakteriální aktivita	Receptor	Translokátor	Molekulová hmotnost (Da)	Produkční kmen
B	tvorba pórů	FepA	TonB-ExbBD	54742	<i>Escherichia coli</i>
Ia	tvorba pórů	Cir	TonB-ExbBD	69429	<i>Escherichia coli</i>
Ib	tvorba pórů	Cir	TonB-ExbBD	69923	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella sonnei</i>
5	tvorba pórů	Tsx	TolC, TonB-ExbBD	53137	<i>Escherichia coli</i>
10	tvorba pórů	Tsx	TolC, TonB-ExbBD	53342	<i>Escherichia coli</i>
D	tRNáza	FepA	TonB-ExbBD	74683	<i>Escherichia coli</i>
M	Peptidoglykanáza	FhuA	TonB-ExbBD	29453	<i>Escherichia coli</i>

2.1 Produkce kolicinů

Za běžných podmínek je produkce kolicinů velmi malá, což neplatí při stresových situacích jako je např. nedostatek živin, kyslíku, nebo při poškození DNA, kdy se produkce kolicinu podstatně zvýší a dojde k tzv. SOS odpovědi (Gillor a kol., 2005; Braun a kol., 1994).

Tato reakce vede k aktivaci proteázy RecA, která degraduje protein LexA. LexA je transkripční represor, který potlačuje gen odpovědi SOS kódující primárně DNA polymerázy. DNA poškozující činidla vedou k velmi vysokým hladinám syntézy kolicinů a následnému usmrcení buněk (Spangler a kol., 1985).

Produkční buňky produkují na ochranu před vlastními koliciny specifické imunitní proteiny, které jsou schopny koliciny inaktivovat (Kleanthous, 2010). Citlivý kmen je takový, který má protein pro rozpoznávání kolicinů a proteinový systém translokátorů, kterými jsou koliciny transportovány do bakterie a způsobují její smrt. U konkrétního kolicinu jsou ne-receptorové proteinové bakterie klasifikovány jako rezistentní kmeny. Bakterie s deficiencí translokačního proteinového systému jsou klasifikovány jako tolerantní kmeny, a ty, které produkují imunitní proteiny, jsou klasifikovány jako imunní kmeny. Rezistentní, tolerantní a imunní kmeny bakterií nejsou zabity odpovídajícími koliciny (Yang a kol., 2014).

2.2 Mechanismus působení

Nejčastějším mechanismem je tvorba iontových kanálů v plazmové membráně (tvorba pórů), což vede k depolarizaci membrány. Otevírání pórů také vyvolává fosfát a někdy K^+ eflux, což vede k vyčerpání cytoplazmatického ATP. Méně častá je aktivita nukleázy kolicinů, která může být zaměřena proti chromozomální DNA (působící jako nespecifická DNA endonukleáza) nebo specifickou endonukleázu proti 16S-rRNA. Nejméně se vyskytuje rozklad, který katalyzuje hydrolýzu vazby β -1,4 mezi N-acetylglukosaminem a N-acetylmuramovou kyselinou v glykanové kostře stěny bakteriální buňky nebo inhibicí syntézy peptidoglykanu nebo mureinu na stěně, což vyvolává tvorbu sféroplastů a následně buněčnou lyzi (Cursino a kol., 2002).

3 VYUŽITÍ KOLICINŮ

Koliciny jsou používány ve farmaceutickém průmyslu. V současné době se koliciny začínají používat k lékařským účelům (Yang a kol., 2014).

3.1 Probiotika

Termín "probiotikum" je odvozen z řeckého slova pro bios, což znamená "pro život" nebo "na podporu života". Probiotikum je obecně považováno za podporu rovnováhy střevní mikroflóry a zvýšení zdravotních přínosů. Světová zdravotnická organizace (WHO) definuje probiotika jako "živé mikroorganismy, které se při podávání vhodných množství, přinášejí hostiteli zdravotní přínos". Mnoho antibakteriálních látek, jako jsou bakteriociny, mastné kyseliny s krátkým řetězcem a peroxid vodíku jsou produkované probiotiky pro inhibici gastrointestinálních mikroorganismů nebo patogenů. V současné době se mnoho probiotik používá v každodenním životě, včetně BMK, nepatogenní *Escherichia coli*, bacilů a kvasinek. Čištěné bakteriociny nebo probiotika produkující bakteriocin mohou snížit počet patogenů nebo změnit složení střevní mikroflóry u zvířecích jedinců jako jsou myši, kuřata a prasata. Kolicin Ib, E1 a mikrocin C7 z kmene *Escherichia coli* H22, mají schopnost inhibovat růst patogenních nebo nepatogenních bakterií *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*. Kmen *Escherichia coli* H22 ukázal schopnost redukce populace *Shigella flexneri* 4 na nezjištěné úrovni ve stolici myši po 6ti denním perorálním očkování. Výsledky ukázaly, že bakteriocinogenní kmen *E. coli* H22 má potenciál být použit jako probiotikum pro hospodářská zvířata a lidi (Yang a kol., 2014; Cursino a kol., 2006).

V jedné ze studií bylo izolováno šest různých plazmidů kódujících bakteriociny, včetně kolicinů A, E1, E2, E7, K a N za účelem transformace do *E. coli*. Čtyři týdny staré myši byly naočkovány kontrolním kmenem *E. coli*, nebo jedním ze šesti kolicinogenních kmenů *E. coli*. Po dobu 112 dnů bylo sledováno množství fekální bakterií v myších výkalech. Kolicinogenní účinek *E. coli* byl po 112 dnech významně vyšší než u kontrolní *E. coli*. Výsledky ukazují, že výroba bakteriocinů může hrát roli při kolonizaci *E. coli* v gastrointestinálním traktu (Gillor a kol., 2009).

3.2 Léčba onemocnění způsobené patogenním mikroorganismem

Od prvního objevu antibiotika penicilinu v roce 1928 Alexandrem Flemingem, bylo mnoho antibiotik aplikováno na léčbu onemocnění způsobeného patogenním mikroorganismem. Antibiotika byla nejprve schválena Úřadem pro potraviny a léčiva v roce 1951 a poté používána v krmení zvířat, což významně snížilo počet úmrtí na bakteriální infekce. Nicméně, po čase nastal problém s rezistencí na určité léky. Bakteriociny jsou schopny eliminovat významné patogeny zvířat a rostlin, jako je např. *E. coli* produkující Shiga toxiny (STEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), VRE, *Agrobacterium* a *Brenneria* spp. Bylo zjištěno, že 20 druhů *E. coli* může produkovat kolicin, který je schopen inhibovat pět druhů *E. coli* produkujících Shiga toxin (O26, O111, O128, O145 a O157). Tyto kmeny *E. coli* mohou způsobovat průjem a hemolyticko-uremický syndrom u lidí. V simulovaném prostředí hovězího dobytka, koliciny E1, E4, E8-J, K a S4 produkované *E. coli*, mohou výrazně inhibovat růst STEC (Yang a kol., 2014). Profylaktické použití antibiotik v živočišném zemědělství je v současné době podrobně zkoumáno kvůli obavám ohledně jeho role v přispívání k rezistenci vůči antibiotikům. Tato kontrola vedla k větší regulaci užívání antibiotik u zvířat. Proto je důležité zkoumat alternativy na konvenční antibiotika ke zlepšení zdraví zvířat. Byl využit purifikovaný kolicin E1 a kolicin N pro účinnou inaktivaci kmenů ETEC F4 (K88) a F18 *in vitro*, které způsobovaly průjem selat po odstavení. Kromě toho byly purifikované proteiny kolicinu E1 smíchány s dietním příjmem mladých prasat. Výsledky ukázaly snížení výskytu průjmu po odstavu. Růst prasat se tak zlepšil (Stahl a kol., 2004).

3.3 Léčba rakoviny

Během uplynulého půlstoletí se rakovina stala vážným problémem lidského zdraví. Při rakovinové terapii některé výzkumy potvrzují aktivitu bakteriocinů proti nádorovým buňkám. Některé bakteriociny inhibovaly růst jedné lidské standardní fibroblastové linie a 11 lidských nádorových buněčných linií. Inhibiční účinky kolicinů na eukaryotické buněčné linie (včetně nádorových) se liší a jsou specifické, podobně jako jejich baktericidní účinky. Naopak, účinek kolicinu U RNAázy, která tvoří póry, nevykazovala tuto schopnost inhibice růstu. Kolicin D, E2 a E3 a kolicin A tvořící póry by mohly inhibovat životaschopnost myších leukemických buněk. Absence kolicinogenní *E. coli* může být jedním z faktorů přispívající ke vzniku a vývoji kolorektálního karcinomu (Chumchalová a Šmar-

da, 2003). Byla izolována *E. coli* z výkalů u 77 pacientů s kolorektálním karcinomem, kde 32 pacientů mělo *E. coli* produkující bakteriociny. Ve výkalech 160 zdravých lidí mělo 102 lidí kmen *E. coli*, který produkoval bakteriociny. Koliciny mohou mít potenciál moderního léčiva proti rakovině (Yang a kol., 2014; Bureš a kol., 1986).

4 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH

4.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností produkované v biologických systémech enzymatickou dekarboxylací určitých aminokyselin (např. histamin). Biogenní aminy (BA) jsou přirozenými antinutričními faktory a jsou z hygienického hlediska důležité, neboť způsobují otravy potravinami a jsou schopné vyvolat různé farmakologické reakce. Tryptamin, tyramin, spermin, spermidin, putrescin, kadaverin a histamin jsou považovány za nejdůležitější biogenní aminy vyskytující se v potravinách. Analýza BA je důležitá kvůli jejich toxicitě a jejich použití jako indikátorů stupně čerstvosti. Pro stanovení biogenních aminů je vyvinuto několik metod (Alvarez a kol., 2014).

Schopnost mikroorganismů dekarboxylovat aminokyseliny je vysoce proměnná, často je specifická pro kmen a proto detekce bakterií, které mají dekarboxylázovou aktivitu, je důležitá pro odhad pravděpodobnosti, že potraviny obsahují BA a pro zabránění jejich akumulaci v potravinářských produktech. Zlepšení znalostí o faktorech spojených se syntézou a akumulací BA by navíc mělo vést ke snížení výskytu v potravinách (Önal, 2006).

4.2 Výskyt biogenních aminů

Nízké koncentrace biogenních aminů jsou přirozenými vlastnostmi řady potravin, jako je ovoce a zelenina, kde jsou přítomny jako přirozené látky metabolických drah. V potravinách a nápojích se tvoří enzymy surové nebo jsou generovány mikrobiální dekarboxylací aminokyselin během stárnutí a skladování. Nejvíce důležitými BA, které se vyskytují v potravinách a nápojích jsou histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin, spermidin, spermin a β -fenylethylamin. Mohou být detekovány, jak v surovém, tak i ve zpracovaném jídle. Velmi často souvisí jejich výskyt s procesy kažení a fermentace (Stadnik a kol., 2009; Silla Santos, 1996).

4.2.1 Biogenní aminy ve vínu

Ve víně bylo identifikováno více než 20 různých aminů a jejich celková koncentrace byla v rozmezí od několika málo mg/l až přibližně 50 mg/l v závislosti na kvalitě vína. Podobné BA byly rovněž popsány u ciderů. Proměnlivost obsahu aminů ve víně lze vysvětlit na základě rozdílu ve vinařských procesech, času a podmínkách skladování, kvality suroviny a možnosti mikrobiální kontaminace během vinařských operací. BA ve víně mohou mít dva různé zdroje: suroviny a fermentační procesy. Některé aminy se nacházejí již v hroznech, jmenovitě histamin a tyramin. V menších množstvích jsou přítomny i kadaverin a fenylethylamin. Putrescin a kadaverin jsou obvykle spojeny se špatnými hygienickými podmínkami u hroznů. Množství aminů je přísně spjato s mikroorganismy, ale také s aminokyselinovým složením vína po alkoholovém kvašení (Spanno a kol., 2010; Lonvaud-Funel, 2001).

4.2.2 Biogenní aminy v pivu

Údaje o hladinách BA ve sladu, chmelu, nebo derivátech chmelu a také u kvasnic jsou velmi omezené. Ve vodě by neměly být přítomny žádné BA. Putrescin, agmatin, spermidin a spermin jsou přítomny ve sladu kvasnic a ve sladu na vyšších úrovních než u chmele. Vzhledem k nízké hladině chmele a kvasnic v pivu, je největším zdrojem BA slad (Kalač a kol., 2009).

4.2.3 Biogenní aminy v mléčných výrobcích

Mléčné výrobky jsou důležitou složkou stravy lidí po celém světě. Jejich současná spotřeba je poměrně vysoká a očekává se, že během příštích dvou desetiletí se bude trvale zvyšovat. Proto se předpokládá, že poskytování zdravých a bezpečných mléčných výrobků spotřebitelům bude s očekávanou zvýšenou spotřebou náročnější. Mléko poskytuje dostatečné médium pro růst prakticky všech mikroorganismů, které produkují toxické metabolity. Hlavními aminy ve zralých sýrech byly tyramin, kadaverin a putrescin. Nejvyšší koncentrace tyraminu byla zjištěna u syrového mléka, zatímco modrý sýr měl nejvyšší hladinu kadaverinu. Nezralé sýry lze považovat za dobře snášené produkty u jedinců citlivých na histamin a tyramin (Benkerroum, 2016).

4.2.4 Biogenní aminy v mase a masných výrobcích

Maso a masné výrobky často obsahují BA. Nejvíce převládající biogenní aminy jsou tyramin, kadaverin, putrescin a také histamin. Vysoký obsah sperminu je obvyklý u masa teplokrevných zvířat obvykle v rozmezí 20 až 60 mg/kg. Některé aminy jako tyramin, putrescin a kadaverin se mohou vytvořit během skladování masa. Koncentrace tyraminu u hovězího masa byla největší na povrchu masa a může se snižovat promytím. Fermentované masné výrobky představují jednu z potravin, ve kterých jsou značné množství biogenních aminů jako důsledek použití nekvalitních surovin, kontaminace a nevhodných podmínek během zpracování a skladování (Stadnik a kol., 2010; Ruiz-Capillas a kol., 2005).

4.3 Možnosti redukce biogenních aminů v potravinách

Aditiva a konzervační látky mohou omezit tvorbu biogenních aminů ve výrobcích, jako je makrela, inhibicí růstu bakterií. Sorban sodný může omezit tvorbu histaminu. Kyselina citronová, kyselina jantarová, D-sorbitol a kyselina jablečná inhibují dekarboxylázovou aktivitu a výslednou tvorbu histaminu u makrely skladované 10 dní při 25 °C. Kyselina citronová použitá během skladování zelí snižuje obsah biogenních aminů. Sorban draselný prodlužuje životnost mořských plodů a v kombinaci s kyselinou askorbovou vykazuje významné snížení produkce BA v klobásách. Mezi další látky snižující množství histaminu a putrescinu v mase patří dusitan sodný a dusičnan. Přirozeně se vyskytující specifické inhibiční látky v koření mohou také snižovat BA v potravinách. Mezi takové látky patří kurkumin (kurkuma), kapsaicin (červený pepř) a piperin (černý pepř). Nevýhodou těchto látek je značná ztráta účinnosti, která nastává během vaření. Dále se patří česnek, červená paprika, hřebíček, zelená cibule a skořice (Naila a kol., 2010).

Produkce histaminu v sýrech souvisí s faktory, jako je dostupnost substrátu, pH, koncentrace solí a teplota. Správná skladovací teplota je pravděpodobně nejdůležitějším způsobem prevence. Úroveň pH je důležitým faktorem ovlivňující aktivitu aminodekarboxylázy (Silla Santos, 1996).

Vysoký hydraulický tlak (VHT) je metoda konzervace, která poškozují buňky mikroorganismů a způsobuje tak inaktivaci buňky. VHT prodlužuje trvanlivost při zachování původní chuti a vlastností potraviny. Potraviny ošetřené VHT metodou jsou komerčně dostupné v USA (ústřice), Japonsku (ovocný džem) a Španělsku (vařená šunka). VHT byl použit

na spoustu dalších potravin jako sýry, klobásy, ryby a kysané zelí. Pokud se VHT používá na surovinu nebo na konečné výrobky, může snížit počet bakterií produkující BA. Při aplikaci VHT na maso pro výrobu klobás, se zpomalila tvorba putrescinu a kadaverinu. Inhibice závisí na úrovni použitého tlaku (Naila a kol., 2010).

Mnohé kmeny BMK se používají jako výchozí kultury v několika fermentovaných potravinách a nápojích. Obecně platí, že výběr startovacích kultur je zásadní pro zajištění kvality konečných produktů. Z tohoto důvodu by neschopnost tvořit BA měla být důležitým kritériem při výběru počátečních kultur pro výrobu. Očkování startovacími kulturami, které nejsou schopné produkovat BA, se tudíž dají považovat jako snaha redukovat BA v potravinách (Spanno a kol., 2010).

V potravinářství se používá balení výrobků do prostředí plynné směsi. To může zpomalit produkci BA v důsledku inhibice mikroorganismů nebo enzymů produkujících BA. Ukázalo se, že histamin je více účinný v nepřítomnosti kyslíku, zatímco histamináza, která oxiduje histamin, je účinnější v přítomnosti kyslíku. Toto zjištění způsobilo, že se díky schopnosti obou bakterií tvořit BA, bude špatně hledat řešení, které by zajistilo snížení tvorby BA (Naila a kol., 2010).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo sledovat antimikrobiální účinky bakteriocinů na bakterie produkující biogenní aminy. Nejdříve byly vybrány kolicinogenní kmeny s nejširším spektrem působení na dekarboxyláza pozitivní kmeny, z nich byl připraven surový kolicin a určen jeho potenciál pro redukci bakterií produkujících biogenní aminy v potravinách.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Materiál

6.1.1 Seznam bakteriálních kmenů

Celkem bylo použito 55 bakteriálních kmenů zahrnující *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas* sp., *Pantoea* sp., *Leclercia adecarboxylata*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pantoea agglomerans*, *Yersinia enterocolitica*, *Ewingella americana*, *Serratia liquefaciens* a *Moellerella wisconsensis*. Z toho 25 kmenů byly izoláty z kuřat, které byly získány z kuřecího masa zakoupeného v maloobchodní síti v oblasti Zlínského kraje v letech 2006-2014 a 8 kmenů bylo získáno z bažantího masa z území Moravy v roce 2010 (Tab. 3). Zbýlých 22 kmenů byly izoláty z bažantů (Tab. 4) z území Moravy získané v letech 2010-2014.

Dále byly použity indikátorové kmene *E. coli* (Row, P400, B1, φ) citlivé ke všem typům kolicinů a mikrocinů, které byly získány ze sbírky Biologického ústavu, Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

6.1.1.1 Kmeny produkující a potenciálně produkující bakteriociny

V této práci bylo použito 33 bakteriálních kmenů izolovaných z kuřat a bažantů. Tyto izoláty jsou producenty nebo potenciálními producenty bakteriocinů. Kmeny byly získány ze sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické UTB ve Zlíně.

Tab. 3. Seznam kmenů izolovaných z kuřat (K) a bažantů.

Číslo kmene	Identifikace	Bakteriociny
K2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	?
K3	<i>Serratia marcescens</i>	?
K4	<i>Serratia marcescens</i>	?
K13	<i>Aeromonas</i> sp.	?
K26	<i>Pantoea</i> sp. G21	?
K30	<i>Pseudomonas</i> sp.	?
K31	<i>Pantoea</i> sp. G21	?
K33	Enteric Group 69	?
K34	<i>Aeromonas</i> sp.	?
K35	G-fak.anaerobní tyčka fermentující OXI-	?

K40	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	?
K59	<i>Escherichia coli</i>	mV
K63	G-fak.anaerobní tyčka fermentující OXI-	?
K64	<i>Escherichia coli</i>	Ia, Y
K88	<i>Yersinia enterocolitica</i>	?
K89	<i>Klebsiella</i> sp.	?
K92	<i>Escherichia coli</i>	U, Y, E8
K93	<i>Escherichia coli</i>	E8
K94	<i>Escherichia coli</i>	E7, mC7
K95	<i>Escherichia coli</i>	E1, E7, M
K97	<i>Serratia</i> sp.	?
K98	<i>Klebsiella</i> sp.	?
K99	<i>Escherichia coli</i>	E7, E8
K102	<i>Escherichia coli</i>	Ia, mC7, mV
K104	<i>Escherichia coli</i>	Ia
222	<i>Escherichia coli</i>	B, M, Ia/Ib,mB17,mV
225	<i>Escherichia coli</i>	E1, B,M,Ia/Ib,mB17
229	<i>Escherichia coli</i>	B,M,Ia/Ib,mB17
230	<i>Escherichia coli</i>	B,M,mB17
273	<i>Escherichia coli</i>	B, M, Y , Ib, mV
S7	<i>Escherichia coli</i>	E1, cea2, Ia/Ib
S31	<i>Escherichia coli</i>	mB17, E1, Ib, M, Y
S32	<i>Escherichia coli</i>	mB17, E1, B, M, Y

? – potenciální producent antimikrobiálních látek

6.1.1.2 Dekarboxyláza pozitivní kmeny

V této práci bylo použito 22 bakteriálních kmenů izolovaných z bažantů, které produkují biogenní aminy. Kmeny byly získány ze sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické UTB ve Zlíně.

Tab. 4. Seznam dekarboxyláza pozitivních kmenů izolovaných z bažantů a jejich produkce BA.

Číslo kmene	Identifikace	Biogenní aminy (mg/l)			
		HIS	TYR	PUT	KAD
B1	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	31,43±0,47	43,02±1,05
B6	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	47,49±1,18	66,83±0,52
B7	<i>Escherichia coli</i>	ND	5,49±0,24	ND	ND
B9	<i>Escherichia coli</i>	1,36±0,01	ND	37,75±1,48	63,35±0,93
B15	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ND	12,73±0,33	ND	ND
B27	<i>Escherichia coli</i>	ND	719,81±16,50	ND	ND
B28	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	35,69±1,17	60,58±2,92

B35	<i>Escherichia coli</i>	ND	677,20±26,24	ND	ND
B36	<i>Escherichia coli</i>	ND	533,64±13,67	ND	ND
B37	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	91,60±1,43	77,30±3,58
B52	<i>Escherichia coli</i>	ND	27,56±0,97	ND	ND
B53	<i>Escherichia coli</i>	ND	608,98±7,12	ND	ND
B55	<i>Escherichia coli</i>	2,56±0,05	ND	219,65±8,63	109,73±2,64
B56	<i>Escherichia coli</i>	2,58±0,06	ND	183,15±2,50	107,00±4,56
B72	<i>Escherichia coli</i>	0,99±0,03	47,44±1,20	3,73±0,12	2,74±0,15
B73	<i>Escherichia coli</i>	ND	662,34±24,82	ND	ND
B78	<i>Pantoea agglomerans</i>	2,14±0,02	73,29±1,89	9,03±0,10	31,10±1,42
B85	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,01±0,04	1,30±0,05	30,12±1,17	51,99±0,82
B94	<i>Ewingella americana</i>	ND	ND	24,29±0,68	42,16±1,90
B100	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ND	713,57±32,35	ND	ND
B108	<i>Serratia liquefaciens</i>	ND	55,15±1,47	ND	ND
B111	<i>Moellerella wisconsensis</i>	ND	662,47±27,69	ND	ND

HIS - histamin; TYR - tyramin; PUT - putrescin; KAD - kadaverin

6.1.2 Laboratorní přístroje

Automatické mikropipety (Nichiryo – Japonsko, Eppendorf – Německo)

AURA PCR pracovní box (BioAir Instruments – Itálie)

Bio Vortex V1 (Biotech – Česká republika)

Centrifuga – Hermle Z100M (Labnet Inc. – Korea)

Digitální váha – (Kern & Sohn GmbH - Německo)

Box laminární, Telstar Bio II – A (KR D – Velká Británie)

Termostat BT 120 (LABO-MS spol. s.r.o. - Česká republika)

Laboratorní sklo a pomůcky

6.1.3 Kultivační média

Masopeptonový agar (MPA)

28 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody

Složení (g/l):

Agar	15
Masový výtažek	10
Pepton	10
NaCl	5

Masopeptonový bujón (MPB)

13 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody

Složení (g/l):

Masový výtažek	3
Pepton	5
NaCl	3

Soft agar

Složení (g/l):

Agar	10,5
Masový výtažek	3
Pepton	5
NaCl	5
Destilovaná voda	1000ml

BHI bujón

Složení (g/l):

Bujón z mozkosrdcové infuze	17,5
Proteozový pepton	10
NaCl	5
Dextróza	2
Hydrogenfosforečnan disodný	2,5

6.1.4 Chemikálie

Chloroform (Sigma, St. Louis - USA)

Ethanol 98% (Lach-Ner s.r.o. – Česká republika)

Mitomycin C (EMD Chemicals – USA)

6.1.5 Použité roztoky

Fyziologický roztok

NaCl	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

6.2 Metody

6.2.1 Stanovení biologické aktivity bakteriocinů - vpichový pokus

Biologická aktivita bakteriocinů byla stanovena kvalitativně vpichovým pokusem. Bakterie produkčního kmene byly očkované pomocí vpichu na misky s MPA a kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C/48 h. Poté byly bakterie na miskách usmrceny parami chloroformu, které působily 30 minut. Následně byly půdy přelity suspenzí obsahující 3 ml 1,05 % agarů (soft agar) a 100 µl indikátorového kmene, který byl den předem zaočkován do MPB a ponechán inkubovat po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po kultivaci byl pozorován vznik inhibičních zón vytvořených okolo jednotlivých vpichů.

6.2.2 Izolace surového bakteriocinu

První den byl naočkován produkční kmen *E. coli* (225, S7, S31, S32) z misky do zkumavky s BHI bujónem a byl kultivován v 37°C přes noc. Narostená kultura ve zkumavce byla zředěna v poměru 1:50 bujónem do Erlenmeyerovy baňky (tj. 3ml suspenze + 150 ml bujónu). Dále byl inkubován při 37°C v termostatu na třepačce 4 hodiny, poté byl přidán mitomycin C, aby byla výsledná koncentrace 1 µg/ml (tj. 150 µl o c= 1 mg/ml). Dále se kultivovalo 3-4 hodiny. Produkční kmen z Erlenmeyerovy baňky byl rozdělen do 4 centrifugačních zkumavek (45ml) a prováděla se separace buněk pomocí centrifugy v tomto režimu:

- centrifugace při 5000g (5 min/4 °C)
- centrifugace při 2000g (15 min/4 °C)
- centrifugace při 2000g (15 min/4 °C)

Po každé centrifugaci byl odlit supernatant a pelet byl pomocí destilované vody resuspendován. Po poslední centrifugaci byl pelet ze 4 zkumavek převeden do jedné skleněné zku-

mavky. Buňky ve skleněné zkumavce s 5 ml sterilní destilované vody se dezintegrují pomocí sondy ultrazvuku. Zkumavku je třeba chladit v kádince s ledovou tříští. Sonda byla ponořena cca 0,5 cm pod hladinu a po 30 sekundových intervalech po dobu 3 minut byl ultrazvuk pouštěn. Poté byla provedena centrifugace při 2000g (15 min/ 4 °C) pro odstranění zbytků buněčných stěn. Supernatant byl uchováván ve skleněné sterilní zkumavce s přídavkem cca 1 ml CHCl_3 při 4 °C.

6.2.3 Kapková metoda

Den předem byl naočkován citlivý indikátorový kmen *E. coli* (Row, P400, B1, φ) do tekutého média BHI. Na spodní stranu misky byly fixem zaznačeny tečky, kde se bude jaké ředění nanášet. Připravené MPA plotny byly přelity 3 ml soft agaru s 0,1 ml kultury indikátorového kmene. Dále bylo připraveno desítkové ředění $10^{-1} - 10^{-5}$ bakteriocinu. Na připravený agar byly na značky nanесeny kapky příslušného ředění bakteriocinu a takto připravené plotny byly dány do termostatu (37 °C) přes noc. Druhý den byl vyhodnocen vznik inhibičních zón a tím byla i zjištěna koncentrace jednotlivých směsí bakteriocinů (A.U.).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci byl hledán antimikrobiální účinek 33 kmenů, produkujících či potenciálně produkujících různé koliciny a mikrocinů (Tab. 3) na 22 dekarboxyláza pozitivní bakterie izolované z potravin (Tab. 4). Byly vybrány kmeny, které inhibičně působily na nejvíce kmenů produkujících biogenní aminy, a z nich byly izolovány surové směsi bakteriocinů, jejichž koncentrace byla opět testována na citlivých kmenech a byl vyhodnocen jejich potenciál pro redukci biogenních aminů v potravinách.

7.1 Výběr kolicinogenních kmenů

Celkem byl sledován antimikrobiální potenciál u 33 bakteriálních kmenů izolovaných z chlazených kuřat a bažantího masa. Z nich bylo 17 produkčních kmenů *Escherichia coli* s již určeným spektrem bakteriocinů a dalších 16 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Leclercia*, *Pantoea*, *Serratia*, *Yersinia* a rodově neurčené), *Aeromonadaceae* (*Aeromonas*) a *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*) s potenciálem produkce antimikrobiálních látek.

Ke stanovení biologické aktivity bakteriocinů byla použita metoda vpichového pokusu. Vpichem do agarové plotny byly aplikovány kmeny izolované z kuřat a bažantů (Tab. 3) a plotna byla přelita soft agarem s přidanou indikátorovou kulturou, což byly dekarboxyláza pozitivní kmeny izolované z bažantů produkující biogenní aminy (Tab. 4). Jedná se o 22 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* (*E. coli*), *Moraxellaceae* (*Acinetobacter lwoffii*), *Erwiniaceae* (*Pantoea agglomerans*), *Yersiniaceae* (*Yersinia enterocolitica*, *Serratia liquefaciens*, *Ewingella americana*) a *Morganellaceae* (*Moellerella wisconsensis*).

Výsledky vpichového pokusu, uvedené v Příloze 1, ukazují vznik inhibičních zón, tzn. schopnost kmenů produkující bakteriociny inhibičně působit na dekarboxyláza pozitivní kmeny. Kmeny odolné vůči působení bakteriocinů jsou: *Escherichia coli* (B1, B7, B35, B36, B37, B52, B53), *Yersinia enterocolitica* (B85, B100), *Ewingella americana* B94, *Serratia liquefaciens* B108 a *Moellerella wisconsensis* B111. U těchto kmenů nevznikaly žádné inhibiční zóny. Kmeny, které neprokázaly produkci antimikrobiálních látek ani bakteriocinů a tudíž neinhibovaly růst indikátorových kmenů, byly *Aeromonas* sp. (K13, K34), *Escherichia coli* (K92, K94, K95, K99, K102, K104), Enterická skupina 69 K33, G-fak.anaerobní tyčka fermentující OXI- K35, *Klebsiella* sp. (K89, K98), *Leclercia*

adecarboxylata K40, *Pantoea* sp. G21 K26, *Pseudomonas* sp. K30, *Serratia marcescens* (K3, K4), *Serratia* sp. K97. Jelikož těchto 6 kmenů *E. coli* (K92, K94, K95, K99, K102, K104) neinhibovalo ani jeden z dekarboxyláza pozitivních kmenů, pak tyto kmeny produkují bakteriociny neúčinné proti těmto bakteriím. Tyto kmeny *E. coli* produkovaly koliciny M, U, Y, E1, E7, E8, Ia a mikrocin C7 a V.

Kmeny, které působily antimikrobiálně vůči dekarboxyláza pozitivním kmenům jsou *Pantoea* sp. K31, *Escherichia coli* (K59, K64, K93, 222, 225, 229, 273, S7, S31, S32), G-fak. anaerobní tyčka fermentující OXI- K63 a *Yersinia enterocolitica* K88. Z 33 kmenů bylo 13 účinných vůči kmenům produkující BA. Při studii z roku 2001 bylo nalezeno ze 41 kmenů *E. coli* 23 kolicinogenních kmenů (56,1 %), z nichž 17 inhibovalo růst indikátorového kmene *Shigella sonnei* (Šmarda a Obdržálek, 2001).

Kmen *Yersinia enterocolitica* K88 působil na kmen *E. coli* B72 a *Pantoea agglomerans* B78. Není potvrzeno, že kmen produkuje nějaké bakteriociny, ale vzhledem k výsledkům by se to dalo předpokládat, že může být producentem některých bakteriocinů. Bylo by velmi zajímavé identifikovat tyto bakteriociny a v této práci tímto směrem pokračovat. V jedné ze studií bylo izolováno 35 kmenů *Yersinia enterocolitica* z buvolího mléka, které byly testovány na produkci bakteriocinů. Sedm izolátů (14 %) bylo označeno za producenty bakteriocinů (Toora a kol., 1989).

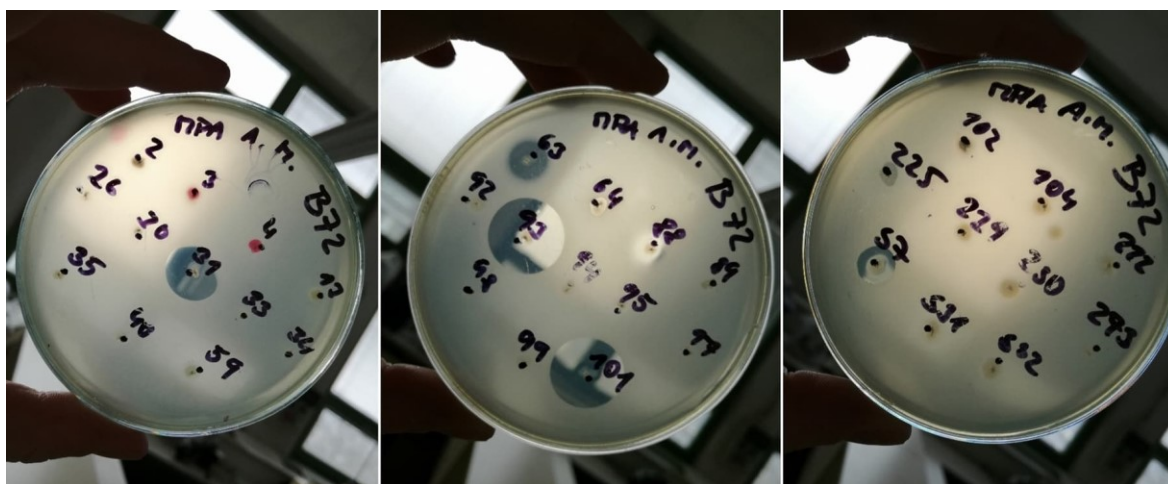
Produkční kmen *Escherichia coli* 225 působil na široké spektrum kmenů a to na kmeny *E. coli* (B6, B9, B27, B28, B55, B56, B72), *Acinetobacter lwoffii* B15 a *Pantoea agglomerans* B78. Schopnost působit na tak široké spektrum může být způsobeno velkým počtem produkovaných bakteriocinů. Jedná se o multiprodukční kmen, jelikož produkuje koliciny E1, B, M, Ia/Ib a mikrocin B17. Výzkum v roce 2011 potvrdil, že multiprodukce některých bakteriocinů a jejich různé kombinace, mají zásadní vliv na inhibiční působení (Budič a kol., 2011).

Podobné bakteriociny jako kmen *E. coli* 225 produkují kmeny *E. coli* (222, 229, 230, 273), které však nemají tak silnou inhibiční schopnost. To může být způsobeno absencí kolicinu E1, který se vyskytuje jen u kmenu *E. coli* 225. Pokud srovnáme kmeny *E. coli* 229 a *E. coli* 230, tak se liší o koliciny Ia/Ib a jelikož kmen *E. coli* 230 neinhibuje žádný z indikátorových kmenů a kmen *E. coli* 229 inhibuje kmeny *E. coli* (B55, B56), tak lze říci, že právě koliciny Ia/Ib mohou na tyto kmeny inhibičně působit. Kolicin E1, který mohl

způsobit silnou inhibiční schopnost u kmenu *E. coli* 225, se vyskytuje také v dalších třech kmenech, které taky vykazují výrazné inhibiční vlastnosti. Jsou to kmeny *E. coli* (S7, S31, S32). Tyto kmeny byly použity na přípravu surového kolicinu a zjištění koncentrace bakteriocinů, které produkují. Samotný kolicin E1 se zdá být potenciálně důležitým faktorem virulence některých uropatogenních kmenů *E. coli* (Šmajš a kol., 2010).

7.2 Inhibice dekarboxyláza pozitivních kmenů

Dalším velmi zajímavým výsledkem (Obr. 2) byla vysoká citlivost indikátorového kmenu B72, který byl citlivý ke kmenům *Pantoea* sp. K31, *E. coli* (K59, K63, K64, K93, 225, S7, S31) a *Yersinia enterocolitica* K88. Tento kmen by se dal zařadit mezi citlivé indikátorové kmeny jako *E. coli* (Row, P400, B1 a ϕ). Tento kmen byl citlivý nejen vůči producentům *E. coli*, ale také, což je velmi zajímavé, vůči kmenům K31 pod jehož číslem se skrývá bakteriální kmen *Pantoea* sp a K88 (*Yersinia enterocolitica*). Tyto výsledky jsou překvapivé vzhledem k tomu, že koliciny zabíjejí zejména bakteriální buňky kmenů patřících do stejného druhu či rodu. Dalším velice překvapivým výsledkem je, že kmeny *E. coli* (225, 273, S31, S32) inhibičně působí na kmen *Pantoea agglomerans* B78. Dále pak kmen *E. coli* 225 překvapivě působil na izolát *Acinetobacter lwoffii* B15, což podporuje výsledky studie o synergickém efektu u multiprodukčních kmenů (Budič a kol., 2011). Pro všechny ostatní výsledky platí, že produkční *E. coli* působila na izoláty *E. coli* z bažantů.



Obr. 2. Inhibiční zóny u indikátorového kmene B72.

Kmen *E. coli* K59 produkuje pouze jeden mikrocin V a ten působí pouze na kmen *E. coli* B72, který produkuje BA, jako jsou histamin, putrescin, kadaverin a tyramin v malém množství (do 48 mg/l). Mikrocin V je tedy schopný inhibovat slabé producenty těchto BA.

Mikrocin V působí na membrány bakteriálních buněk a inhibuje tvorbu iontových kanálů (Abraham a kol., 2011). Stejně jako kmen *E. coli* K59, tak i kmen *E. coli* K93 produkuje pouze jeden kolicin E8 a také působí jen na kmen *E. coli* B72. Kolicin E8 způsobuje zřetelné poškození chromozomální a plazmidové DNA v citlivých, avšak nikoli v imunních bakteriích (Šmarda a kol., 1990).

E. coli B73 je silným producentem biogenního aminu tyraminu. Tyramin je produkován v množství $662,34 \pm 24,82$ mg/l. Tato hodnota je vzhledem k ostatním hodnotám poměrně vysoká. Kmen *E. coli* B73 byl inhibován pouze jedním z kmenů produkující bakteriociny a to *E. coli* S7, který produkuje koliciny E1, cea2, Ia/Ib. Podobné množství tyraminu produkují i kmeny *Yersinia enterocolitica* B100 a *Moellerella wisconsensis* B111, ale ty nebyly inhibovány ani jedním kmenem.

Studie z roku 2014 objasnila některé aspekty týkající se poměru mezi bakteriocinogenními kmeny a aminobiogenními kmeny s ohledem na možnost akumulace BA a také ukázala, že různé bakteriociny mohou mít různé účinky na produkci BA u stejného kmene (Tabanelli a kol., 2014).

7.3 Izolace surových bakteriocinů

Další částí této práce byla izolace surového bakteriocinu z kmenů, které inhibovaly nejširší spektrum indikátorových kmenů. Jsou to kmeny *Escherichia coli* 225, S7, S31 a S32.

U získaných surových bakteriocinů se provádělo desítkové ředění a pomocí kapkové metody se zjišťovala jejich koncentrace v jednotkách (A.U. – arbitrary unit). Toto testování se provádělo ihned po izolaci směsí (Tab. 7) a dále po měsíci skladování v lednici při teplotě 4 °C (Tab. 8). Jako indikátorové kmeny (Obr. 3) byly použity sbírkové kmeny *E. coli* (Row, P400, B1, ϕ).

Tab. 5. Koncentrace surového bakteriocinu ihned po izolaci (A.U.).

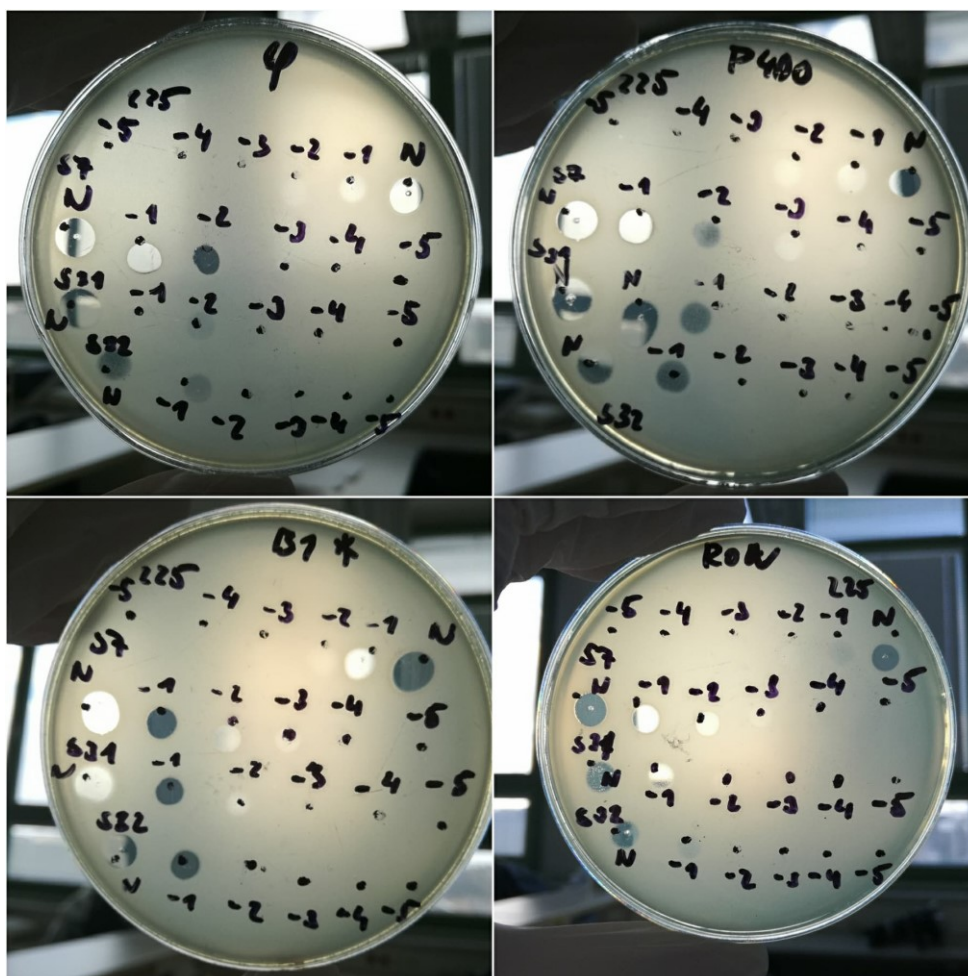
A.U.	ϕ	B1	P400	Row
225	0 (2)	1 (2)	0 (2)	1 (3)
S7	3 (4)	2 (4)	1 (4)	2 (4)
S31	2 (3)	2 (3)	2 (3)	2 (3)
S32	1 (2)	2 (3)	0 (2)	1 (3)

A.U. – např. 1(2) – bakteriocin vytváří čirou zónu do ředění 10^{-1} a matnou zónu do ředění 10^{-2}

Tab. 6. Koncentrace surového bakteriocinu měsíc po izolaci (A.U.).

A.U.	φ	B1	P400	Row
225	0 (2)	1 (2)	0 (2)	0 (2)
S7	2 (3)	1 (3)	1 (4)	1 (3)
S31	1 (2)	1 (2)	1 (2)	0 (2)
S32	0 (2)	1 (2)	0 (2)	0 (1)

A.U. – např. 1(2) – bakteriocin vytváří čirou zónu do ředění 10^{-1} a matnou zónu do ředění 10^{-2}



Obr. 3. Testování koncentrace surového bakteriocinu kapkovou metodou po měsíci skladování v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Byla zjištěna koncentrace bakteriocinových směsí u čtyř různých kmenů ihned po jejich izolaci (Tab. 7) a po měsíci skladování při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tab. 8). Je patrné, že koncentrace směsí kolicinů se během skladování snižuje. U většiny produkčních kmenů se koncentrace bakte-

riocinu snížila o jeden řád a u kmenu *E. coli* S32 na indikátorovém kmenu *E. coli* Row až o dva řády. Je tedy zřejmé, že z časového hlediska se účinnost bakteriocinu snižuje.

V nedávné studii bylo zjištěno, že bakteriocin vykazoval maximální hodnotu účinnosti proti *E. coli* při skladování v teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 7 dnů a nejnižší při teplotě skladování $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ohenhen a kol., 2015). Pro skladování by tedy bylo vhodnější používat mrazení místo chlazení.

Nejvyšší koncentrace byla zjištěna u kmene *E. coli* S7, který produkuje koliciny E1, cea2, Ia/Ib. Naopak nejnižší koncentrace byla zjištěna u kmene *E. coli* 225.

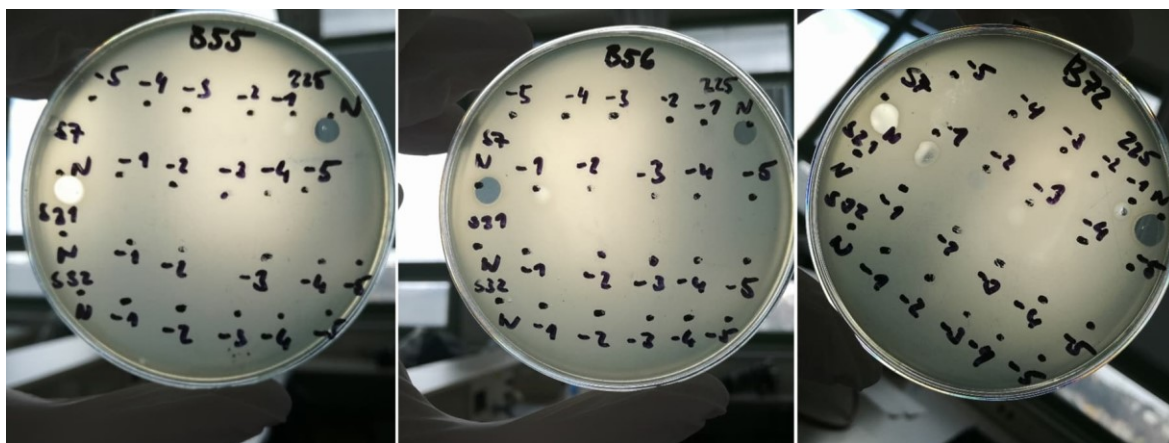
7.4 Aplikace bakteriocinů na citlivé dekarboxyláza pozitivní kmeny

V poslední části této práce byly izolované bakteriociny použity na citlivé dekarboxyláza pozitivní kmeny, produkující BA. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 9.

Tab. 7. Testování koncentrace bakteriocinů na dekarboxyláza pozitivních izolátech z bažantů (A.U.).

A.U.	B6	B9	B15	B27	B28	B55	B56	B72	B73	B78
225	-	-	-	-	-(0)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (-)	-(0)
S7	-	-	-	-	-	0 (1)	0 (1)	1 (3)	0 (0)	0 (1)
S31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (2)
S32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (2)

A.U. – např. 1(2) – bakteriocin vytváří čirou zónu do ředění 10^{-1} a matnou zónu do ředění 10^{-2}



Obr. 4. Testování koncentrace bakteriocinů na citlivých izolátech z bažantů.

U kmenů *E. coli* (B6, B9, B27) a *Acinetobacter lwoffii* B15 se neprojevil žádný inhibiční účinek bakteriocinu, přestože se při vpichovém pokusu slabá inhibiční zóna objevila.

To může být způsobeno vlivem doby skladování, jelikož se toto testování provádělo až po měsíci skladování a koncentrace bakteriocinu se vlivem doby skladování zmenšila. Při tomto testování se ale objevily případy, kdy se inhibiční účinek při vpichovém pokusu neprojevil, ale objevil se v tomto testování u některých indikátorových kmenů (Obr. 4), a to u kmenů *E. coli* (B55, B56), *Pantoea agglomerans* B78 při použití surového bakteriocinu produkčního kmene *E. coli* S7. Dále při použití bakteriocinu produkčního kmene *E. coli* 225 na indikátorový kmen *E. coli* B73. To může být způsobeno metodou testování. Při vpichu byla očkována živá bakterie, která byla usmrcena chloroformem a tvorba bakteriocinů nebyla uměle vyvolána, jako při izolaci bakteriocinu, kdy bylo vytvořeno větší množství bakteriocinů vlivem přidaného mitomycinu C, který u bakterií vyvolal SOS odpověď.

ZÁVĚR

Biogenní aminy, zejména histamin a tyramin, mohou v potravinách představovat závažné zdravotní riziko pro citlivé konzumenty. Dekarboxyláza pozitivní kmeny, které biogenní aminy produkují, se často vyskytují v mase. V současnosti se upírá pozornost na možnosti redukce těchto kmenů v rizikových potravinách.

Tato práce měla za cíl otestovat potenciál použití gramnegativních bakteriocinů k redukci biogenních aminů v mase. Koliciny a mikrocinny jsou skupiny patřící pod skupinu bakteriocinů a jsou schopny antimikrobiálně působit na taxonomicky blízké příbuzné bakterie.

V této práci byl nejprve sledován antimikrobiální efekt bakteriocinů na dekarboxyláza pozitivní bakterie. Z tohoto testování byly vybrány čtyři kmeny s nejširším spektrem účinku, a to kmeny *E. coli* (225, S7, S31, S32). Z těchto čtyř kmenů působil kmen *E. coli* 225 na 9 izolátů, kmen *E. coli* S7 na 3 izoláty, kmen *E. coli* S31 na 4 izoláty a kmen *E. coli* S32 na 5 izolátů.

V další části byly z těchto čtyř kmenů *E. coli* připraveny surové bakteriociny a byl zjišťován vliv doby skladování na jejich redukční účinek pomocí citlivých kmenů *E. coli* (Row, P400, B1 a ϕ), který se po měsíci snížil o jeden až dva řády. Nejsilnější antimikrobiální účinek měl kmen S7, který působil i po měsíci až do ředění 10^{-4} .

Dále byla sledována redukční schopnost surových bakteriocinů na citlivých dekarboxyláza pozitivních izolátech z bažantů. U některých z kmenů se žádný účinek neprojevil. Nejvíce aktivní byl opět bakteriocin izolovaný z kmene *E. coli* S7.

Jako velmi zajímavý a významný výsledek bylo zjištěno, že kmen *Yersinia enterocolitica* K88, izolát z kuřecího masa, s největší pravděpodobností produkuje jeden či více bakteriocinů. Bylo by velmi zajímavé identifikovat tyto bakteriociny a v této práci tímto směrem pokračovat.

Závěrem lze konstatovat, že gramnegativní bakteriociny nejsou ideálním prostředkem pro redukci biogenních aminů v mase a to hned ze dvou důvodů. Za prvé, nejúčinnější kmen inhiboval pouze 9 izolátů z 22 a toto spektrum není dostačující pro efektivní inhibici produkce biogenních aminů. Za druhé účinnost izolovaných bakteriocinů skladováním při 4 °C simulující podmínky při skladování masa velmi rychle v čase klesá.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ABRAHAM, S., J. CHIN, H. J. M. BROUWERS, B. TURNER, R. ZHANG a T. A. CHAPMAN. Green fluorescent protein-based biosensor to detect and quantify Stress Responses induced by DNA-degrading coli-cins. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, roč. 77, č. 18, s. 6691-6693. ISBN 1098-5336.
- [2] ALVAREZ, M. A., MORENO-ARRIBAS M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Food Science and Technology*. 146-155. 2014. ISSN: 00236438
- [3] BENEDETTI, H. a V. GÉLI. Chapter 29 colicin transport, channel formation and inhibition. *Transport Processes in Eukaryotic and Prokaryotic Organisms* [online]. Elsevier, 1996, 1996, s. 665-691 [cit. 2018-05-06]. *Handbook of Biological Physics*. DOI: 10.1016/S1383-8121(96)80070-4. ISBN 9780444824424.
- [4] BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dirty Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, 15(4), 801-826 [cit. 2018-03-31]. DOI: 10.1111/1541-4337.12212. ISSN 15414337.
- [5] BRAUN, V., PILSL, H., GROß, P. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Archives of Microbiology*, 1994. 161 (3), s. 199–206.
- [6] BUDIČ, M., RIJAVEC, M., PETKOVŠEK, Ž., ŽGUR-BERTOK, D. a WEBBER M.A. *Escherichia coli* Bacteriocins: Antimicrobial Efficacy and Prevalence among Isolates from Patients with Bacteraemia. *PLoS ONE* [online]. 2011, 6(12), e28769- [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1371/journal.pone.0028769. ISSN 1932-6203.
- [7] BUREŠ, J., HORÁK, V., FIXA, B., KOMÁRKOVÁ, O., ZAYDLAR, K., LONSKI, V., et al. (1986). Colicinogeny in colorectal cancer. *Neoplasma* 33, 233–237.
- [8] CALCUTTAWALA, F., Ch. HARIHARAN, G. P. PAZHANI, S. GHOSH a T. RAMAMURTHY. Activity Spectrum of Colicins Produced by *Shigella sonnei* and Genetic Mechanism of Colicin Resistance in Conspecific *S. sonnei* Strains and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2014, 59(1), 152-158 [cit. 2017-08-18]. DOI: 10.1128/AAC.04122-14. ISSN 0066-4804.

- [9] CASCALES, E., S. K. BUCHANAN, D. DUCHE, et al. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2007, 71(1), 158-229 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06. ISSN 1092-2172.
- [10] CURSINO, L., J. ŠMARDA, E. CHARTONE-SOUZA a A. M.A. NASCIMENTO. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2002, 33(3), - [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1590/S1517-83822002000300001. ISSN 1517-8382.
- [11] GILLOR, O., GILADI, I. a RILEY, M. Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiology* [online]. 2009, 9(1), 165- [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1186/1471-2180-9-165. ISSN 1471-2180.
- [12] GORDON, D. M. a C. L. O'BRIEN. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* [online]. 2006, 152(11), 3239-3244 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1099/mic.0.28690-0. ISSN 1350-0872.
- [13] CHUMCHALOVÁ, J. a J. ŠMARDA. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiologica* [online]. 2003, 48(1), 111-115 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1007/BF02931286. ISSN 0015-5632
- [14] KALAČ, P., KŘÍŽEK, M. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of The Institute of Brewing*, 2009, vol. 109, iss. 2, s. 123-128.
- [15] LONVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, vol. 199, iss. 1, s. 9-13.
- [16] MAJEED, H., O. GILLOR, B. KERR a M. A RILEY. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *The ISME Journal* [online]. 2010, 5(1), 71-81 [cit. 2017-08-18]. DOI: 10.1038/ismej.2010.90. ISSN 1751-7362.
- [17] NAILA, A., S. FLINT, G. FLETCHER, P. BREMER a G. MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, 75(7), R139-R150 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147.
- [18] OHENHEN, R., J. ISIBOR, G. EMONFONMWAN a S. ENABULELE. Effects of PH and Storage Temperatures on Antibacterial Activity of Bacteriocin Produced by Lactic

Acid Bacteria Isolated from OGI. *British Microbiology Research Journal* [online]. 2015, 6(3), 1-9 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.9734/BMRJ/2015/13471. ISSN 22310886.

[19] ÖNAL A., Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. 103: 1475-1486. 2006. ISSN: 03088146

[20] RUIZ-CAPILLAS, C. a F. JIMÉNEZ-COLMENERO. Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2005, 44(7-8), 489-599 [cit. 2018-03-31]. DOI: 10.1080/10408690490489341. ISSN 1040-8398.

[21] SIMPSON, B., K. Food biochemistry and food processing. 2nd ed./. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012.

[22] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, vol. 29, iss. 2-3, s. 213-231.

[23] SPANGLER, R., ZHAG, S.P., KRUEGER, J., ZUBAY, G. Colicin synthesis and cell death. *Journal of Bacteriology*. 1985;163(1):167-173.

[24] SPANNO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., LUCAS, P. et al. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2010, vol. 64, s. 95-100.

[25] STADNIK, J., DOLATOWSKI, Z. J., Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum*, 2009, vol. 9, iss. 3, s. 251-263.

[26] STAHL, C. H., T. R. CALLAWAY, L. M. LINCOLN, S. M. LONERGAN a K. J. GENOVESE. Inhibitory Activities of Colicins against *Escherichia coli* Strains Responsible for Postweaning Diarrhea and Edema Disease in Swine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2004, 48(8), 3119-3121 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1128/AAC.48.8.3119-3121.2004. ISSN 0066-4804.

[27] ŠMAJS, D., MICENKOVÁ, L., ŠMARDA, J., VRBA, M., ŠEVČÍKOVÁ, A., VALIŠOVÁ, Z., WOZNICOVÁ, V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology* [online]. 2010, 10(1), 288- [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1186/1471-2180-10-288. ISSN 1471-2180.

[28] ŠMARDA, J., D. Š., H. LHOTOVÁ a D. DĚDIČOVÁ. Occurrence of Strains Producing Specific Antibacterial Inhibitory Agents in Five Genera of Enterobacteriaceae. *Current Microbiology* [online]. 2007, 54(2), 113-118 [cit. 2018-01-08]. DOI: 10.1007/s00284-006-0196-1. ISSN 0343-8651.

- [29] ŠMARDA, J.; ŠMAJS, D. Colicins—Exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 1998. 43 (6), s. 563-582. DOI: 10.1007/bf02816372.
- [30] ŠMARDA, J. and OBDRŽÁLEK, V. (2001), Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.*, 41: 367–374. doi:10.1002/1521-4028(200112)41:6<367::AID-JOBM367>3.0.CO;2-X
- [31] ŠMARDA, J. a Z. VRBICKÁ. Colicins E7 and E8 degrade DNA in sensitive bacteria. *Folia Microbiologica* [online]. 1990, 35(4), 348-352 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/BF02821286. ISSN 0015-5632.
- [32] TABANELLI, G., Ch. MONTANARI, E. BARGOSSO, R. LANCIOTTI, V. GATTO, G. FELIS, S. TORRIANI a F. GARDINI. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2014, 190, 14-23 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.023. ISSN 01681605.
- [33] TOORA, S., A. S. BALA, R. P. TIWARI a G. SINGH. Production of bacteriocin by isolates of *Yersinia enterocolitica* from fresh buffalo milk. *Folia Microbiologica* [online]. 1989, 34(2), 151-156 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/BF02823695. ISSN 0015-5632.
- [34] YANG, S-Ch., LIN, C-H., SUNG, C. T. a FANG, J-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, 5, - [cit. 2018-03-05]. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241. ISSN 1664-302X.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK Bakterie mléčného kvašení

VRE Vankomycin-rezistentní *Enterokoky*

VHT Vysoký hydraulický tlak

BA Biogenní aminy

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Tol a Ton- B translokační systémy (Upraveno a převzato z: Benedetti a Geli, 1996).</i>	16
<i>Obr. 2. Inhibiční zóny u indikátorového kmene B72.</i>	36
<i>Obr. 3. Testování koncentrace surového bakteriocinu kapkovou metodou po měsíci skladování v lednici při 4 °C.</i>	38
<i>Obr. 4. Testování koncentrace bakteriocinů na citlivých izolátech z bažantů.</i>	39

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Klasifikační schéma pro gramnegativní mikrociny (upraveno a převzato z: Yang a kol., 2014).....</i>	<i>14</i>
<i>Tab. 2. Klasifikace kolicinů různých translokačních systémů: Tol- a Ton- v E. coli (upraveno a převzato z: Šmarda a Šmajs, 1998).....</i>	<i>17</i>
<i>Tab. 3. Seznam kmenů izolovaných z kuřat (K) a bažantů.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 4. Seznam dekarboxyláza pozitivních kmenů izolovaných z bažantů a jejich produkce BA.</i>	<i>29</i>
<i>Tab. 7. Koncentrace surového bakteriocinu ihned po izolaci (A.U.).....</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 8. Koncentrace surového bakteriocinu měsíc po izolaci (A.U.).</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 9. Testování koncentrace bakteriocinů na dekarboxyláza pozitivních izolátech z bažantů (A.U.).</i>	<i>39</i>




SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1: VÝSLEDKY STANOVENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY BAKTERIOCINŮ
POMOCÍ VPICHOVÉHO POKUSU

Indikátorové kmeny

	B1	B6	B7	B9	B15	B27	B28	B35	B36	B37	B52	B53	B55	B56	B72	B73	B78	B85	B94	B100	B108	B111		
K93															■									
K94																								
K95																								
K97																								
K98																								
K99																								
K102																								
K104																								
222															■									
225		■		■	■	■	■						■	■	■		■							
229													■	■										
230																								
273																								
S7						■									■	■								
S31														■	■	■		■						
S32						■	■							■	■			■						

Vysvětlivky:

-  Produkční kmen neinhibuje indikátorový kmen.
-  Produkční kmen slabě inhibuje indikátorový kmen.
-  Produkční kmen silně inhibuje indikátorový kmen.