

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**PREDÁTOŘI BAKTERIÍ: VÝSKYT A IZOLACE
MYXOBAKTERIÍ Z PŮDY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

MICHAELA MATĚJŮ

VEDOUCÍ PRÁCE: ING. JIŘÍ BÁRTA, Ph.D.

ČESKÉ BUDĚJOVICE

2019

Bakalářská diplomová práce

Matějů M., 2019: Predátoři bakterií: výskyt a izolace myxobakterií z půdy [Bacterial Predators: Occurrence and isolated myxobacteria from soil. Bc. Thesis, in Czech] – 36p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

Cílem této práce bylo izolovat myxobakterie z půdy, provést test predace metodami určené přímo pro myxobakterie. Dřívějšími výzkumy se zjistilo, že myxobakterie jsou dravci, požírají mikroorganismy z jejich okolí. Získat podrobnější informace o jejich specifickém životním cyklu. Zjistit více informací o metabolitech, které by mohly později přispět do medicíny.

Klíčová slova: Myxobakterie, predátoři, metatabolity.

Annotation

The aim of this work was to isolate myxobacteria from soil, to perform a predation test by methods specifically designed for myxobacteria. Previous research has found that myxobacteria are predators, eating microorganisms from their surroundings. Get more detailed information about their specific life cycle. Find out more about metabolites that could later contribute to medicine

Key words: Myxobacteria, predators, metabolites.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejnění své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 11.12. 2019

.....

Michaela Matějů

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za jeho trpělivost, čas, ochotu a pomoc při práci na mé bakalářské práci. Mgr. Hance Petráskové za její cenné rady a trpělivost při výuce experimentálních metod. Závěrem patří velké poděkování mé rodinně, za jejich důvěru, podporu a lásku kterou do mě vkládají. V neposlední řadě děkuji svým skvělým kamarádům za pomoc a podporu během studia.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled	2
2.1	Obecná charakteristika myxobakterií	2
2.2	Výskyt myxobakterií.....	3
2.2.1	Terestrické prostředí	3
2.2.2	Sladkovodní a slané prostředí.....	4
2.3	Specifický životní cyklus	5
2.3.1	Myxobakterie jako predátoři	6
2.3.2	Pohyb myxobakterií.....	7
2.4	Sekundární metabolity	8
2.5	Specifická izolace myxobakterií.....	10
2.5.1	Izolace z půdy.....	11
2.5.2	Izolace myxobakteriálních rojů	12
2.5.3	Izolace ze zahřáté a sušené půdy	12
2.5.4	Izolace rozkladačů celulózy	13
2.5.5	Izolace z vod.....	13
2.5.6	Uchovávání a konzervace	14
3	Materiál a Metody.....	15
3.1	Vyhodnocení zastoupení myxobakterií.....	15
3.2	Odběrová lokalita.....	15
3.3	Izolace Myxobakterií	15
3.3.1	Složení a příprava selektivních agarů	15
3.3.2	Použité metody izolace myxobakterií.....	17
3.4	Izolace psychrotolerantních bakterií	18
3.5	Identifikace izolátů	18
3.5.1	Izolace DNA a PCR.....	18
3.5.2	Vyhodnocení sekvenací	20

3.5.3	Uchovávání izolátů	20
3.6	Predační test	20
4	Výsledky	21
4.1	Zastoupení jednotlivých čeledí Myxococcales.....	21
4.2	Řád Myxococcales v jednotlivých ekosystémech	22
4.3	Metody izolace	23
4.4	Výsledky sekvenace.....	24
4.5	Predační test	26
5	Diskuze a závěr.....	27
6	Přílohy.....	29
7	Seznam literatury	30

1 Úvod

Myxobakterie jsou hlavně půdní mikroorganismy. Řadí se do třídy Deltaproteobakterie. Myxobakterie s porovnáním s jinými bakteriemi mají velký genom cca $9 - 10 \times 10^6$ párů nukleotidů. Myxobakterie jsou známé svým unikátním životním cyklem, během kterého při nedostatku živin vytvářejí specializované buňky (myxospóry). Dokáží koordinovaně „lovit“ jiné bakterie. Stojí tak pomyslně na nejvyšším trofickém stupni prokaryot. Myxobakterie dokáží degradovat celulózu. To dokáží pouze dva rody a těmi jsou *Sorangium* a *Byssovorax*.

Jejich další zajímavou funkcí je, že dokáží produkovat sekundární metabolity. Některé druhy jsou známé tím, že dokáží produkovat antibiotika a protinádorové molekuly. Tyto bakterie by mohly hrát významnou roli v medicíně při léčbě nádorových onemocnění.

V bakalářské práci jsem se zabývala myxobakteriemi v půdním ekosystému, jejich globálním rozšířením a v neposlední řadě také jejich selektivní izolací. Izolace myxobakterií je specifická a časově náročná. Myxobakterie vyžadují speciální agary aby mohly kolonizovat. Bylo navrženo několik variant jak izolovat myxobakterie, jedna z nich je sušit odebrané vzorky při laboratorní teplotě. Další z možných izolací je vytvořit suspenzi půdy a nechat jí povařit, aby se zneškodnily nežádoucí mikroorganismy.

Cíle:

- Z dostupné literatury získat podrobné znalosti o ekologii myxobakterií, možnosti její izolace a detekce v přirozeném prostředí
- Z dostupných dat zhodnotit výskyt v různých ekosystémech
- Izolovat čistou kulturu myxobakterií
- Provést test predace izolátů myxobakterií

2 Literární přehled

2.1 Obecná charakteristika myxobakterií

První objevená myxobakterie, *Polyangium vitellinum*, byla v roce 1809 botanikem HF Linkem (Link 1809). Myxobakterie jsou z kmene Proteobacteria, třídy Deltaproteobacteria. Jsou gram-negativní jednobuněčné aerobní buňky, které mají tyčinkovitý i kokovitý tvar. V buňkách myxobakterií byly objeveny mezosomy, intracelulární granule a inkluzní tělíška. Myxobakteriální plodnice obvykle měří 50-500 µm a jsou vidět pouhým okem. Jejich vegetativní buňky se dělí na dva typy: štíhlé, které jsou obvykle ohebné tyčky nebo válcové tuhé tyčky se zaobleným koncem. Dokáží produkovat sekundární metabolity. Membrána je složená z proteinů, fosfolipidů a lipopolysacharidů (Wolfgang 2000). Většina druhů má aerobní metabolismus, ale byly objeveny a popsány i druhy, které jsou fakultativně anaerobní (Sanford et al. 2002).

Myxobakterie jsou obecně mezofilní, dokáží však růst v teplotním rozmezí teplot od 4 do 44°C (Reichenbach 1999). Ze suchých mexických půd byly izolovány kmeny *Cystobacter*, *Myxococcus* a *Polyangium*, (Brockman 1976). V tropických oblastech byly zaznamenány termofilní myxobakterie a to *Cystobacterineae* a *Sorangineae suborders* (Gerth, Müller 2005). Z íránské pouště byl izolován nový kmen *Nannocystis*, který rostl při teplotě 37°C (Brockman 1976). Izolace v arktických půdách byla prováděna při -6 -8°C. Izolace z arktických půd je náročná a může trvat i několik měsíců (Mohr 2018).

Pohyb myxobakterií po povrchu je velice specifický. Jejich cytoplazma obsahuje svazky mikrotubulů a fibril. Tyto svazky mohou za klouzavý pohyb myxobakterií. Během pohybu po substrátu vylučují sliz složený z proteinů, polysacharidů a lipidů. Sliz mimo jiné také pomáhá myxobakteriím rozkládat proteiny bakterií, které loví (Wolfgang 2000). Myxobakterie se většinou pohybují společně koordinovaně v houfech (tzv. rojích, Mohr 2018), více o jejich specifickém pohybu v kapitole 2.3.2 pohyb myxobakterií.

Pokud nemají dostatek živin nebo není v okolí žádná potrava, začnou se některé buňky diferenciovat do tzv. myxospor. Tento proces je však pro tyto buňky velmi energeticky a živinově náročný, proto se jiné buňky „obětují“ v rámci společenstva, nastartují tzv. buněčnou smrt, zlyžují a tím poskytnou dostatek energie pro vytvoření spor, které se pak šíří do okolí a plodnic a kolonizují nové oblasti (Wolfgang 2000).

2.2 Výskyt myxobakterií

Myxobakterie jsou hlavně půdní bakterie a vyskytují se v prostředí o vysoké či nízké teplotě. Jsou schopny tolerovat vysoké pH. Zjistilo se, že myxobakterie se spíše vyskytují v teplých oblastech než ve studených. Byly izolovány z půdy v klimatických podmínkách jako jsou tropické deštné pralesy, středoevropské lesy, středomořské regiony a tropické polopouštní podnebí aj. (Wolfgang 2000).

2.2.1 Terestrické prostředí

Myxobakterie jsou většinou přizpůsobeny terestrickým stanovištím. Velmi se jim zde daří v rojení, pohybu po povrchu, ve vylučování sekundárních metabolitů jakou jsou např. antibiotika. Vědci izolovali a zkoumali půdy Velké Británie (např. komposty) jejich distribuci a lytické působení. Izolovali tyto druhy *Myxococcus*, *Chondrococcus* a *Archangium* (Ringel 1977). V roce 2005 byly izolovány specifickými metodami, pomocí primerů a sond, tyto druhy *Myxococcus*, *Corallocooccus*, *Cystobacter* a *Nannocystis* (Wu et al. 2005). Ve dvou vzdálených lokalitách byly zkoumány vzorky písku a kompostu, pomocí standartních kultivačních metod. Zde byl zaznamenán veliký počet rodů *Myxococcus* a *Corallocooccus* (Mohr 2018).

Optimální pH půd pro růst myxobakterií je okolo 6,5 - 8,5. Kyselé mokřady mají veliký vliv na globální cykly uhlíku a vody (Shimkets et al. 2006). *Corallocooccus coralloides* je převládající druh v půdách okolo 4,5 pH. Rod *Myxococcus* je pak dominantní v půdách o pH 3,0–3,5 (Rückert 1979). Celková diverzita myxobakterií je v kyselých půdách nižší než v mírně kyselém nebo neutrální prostředí, tam jsou myxobakterie zastoupeny hojně (Dedysh et al. 2006). Z půd alkalických bažin a půd k nim přilehlých se izolovali tyto druhy, *Archangium*, *Corallocooccus*, *Melittangium* (HOOK 1977).

Všechny známe myxobakterie žijí aerobně, kromě jedné výjimky která je fakultativně-anaerobní, jedná se o kmen *Anaeromyxobacter* (Sanford et al. 2002), který obsahuje pouze jeden druh *A. dehalogenans*. Tento druh byl izolován z několika aroxyckých lokalit, rýžové pole (Treude et al. 2003), povrchové prostředí kontaminované uranem, korozní materiál, potrubí pitné vody (Lin et al. 2011), půdy kontaminované arsenem (Kudo et al. 2013).

Deštné pralesy jsou velice bohaté na výskyt myxobakterií. V Austrálii objevili vědci McNeil a Skerman tři nejběžnější druhy kmene *Myxococcus* (McNeil, Skerman 1972). V brazilském deštném pralesě byly izolovány druhy *Myxococcus virescens*, *Myxococcus fulvus*, *Archangium gephyra* a *celulosum* (Drozdowicz 1972). Dále bylo detekováno v brazilských půdách několik kmenů myxobakterií, dva druhy z rodu *Myxococcus*, rod *Archangium* a *Stigmatella* a další (Wolfgang 1978).

Z půdy z jihozápadních listnatých a smíšených lesů se izolovalo devět druhů. Nejčastější byly *Myxococcus fulvus*, *Myxococcus virescens*, druhy jako je *Myxococcus stipitatus* a *Polyangium sorediatum* se vyskytovaly pouze vzácně. V oblasti Bonnu se opět ze smíšených a listnatých lesů izolovalo přibližně 28 000 kmenů. Nejběžnější druhy byly opět *Myxococcus fulvus*, *Myxococcus virescens* a *Myxococcus xanthus*. V prašných vrstvách se nejčastěji objevoval druh *Myxococcus* (Wolfgang 2000).

2.2.2 Sladkovodní a slané prostředí

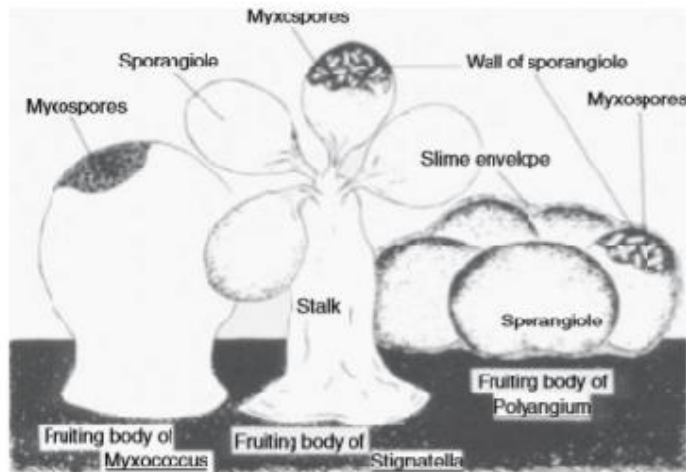
Myxobakterie se vodním prostředím pohybují především po pevných površích. Vyskytují se především v bahně jezer. Ze sladkovodních sedimentů byl vyizolován pouze jeden druh *Anaeromyxobacter dhlogenans*, který zde byl zastoupen až ve 14% (Kou et al. 2016). Donedávna se předpokládalo, že se bakterie objevují pouze v suchozemských biotopech z důvodů, že myxobakterie mají velmi nízkou toleranci na soli. Proto se pokoušelo o izolaci z mořských mokřadů. V nich se vyskytují dva rody *Haliangium ochraceum* a *Haliangium tepidum*. Tyto kmeny se liší v tom, že ke svému životu potřebují soli (Fudou R. et al. 2002).

Dále byly detekovány z mořského prostředí další rody *Plesiocystis*, *Enhygromyxa* a *Pseudenhygromyxa* (Iizuka et al. 2013). Myxobakterie byly detekovány ze sedimentů okolo 4300 metrů pod mořem. Některé myxobakterie byly pak následně objeveny i v usazeninách Severního moře, Středozemního moře, Atlantiku, Tichého oceánu a Indického oceánu (Kaushal et al. 2018).

2.3 Specifický životní cyklus

Jedním z hlavních rysů u myxobakterií je schopnost tvořit sporangiole. Myxobakterie začínají tvořit plodnice pokud začnou trpět nedostatkem živin. K životu potřebují vhodné podmínky, které jsou řízeny správnou koncentrací živin, kationty, správným pH a teplotou (Wolfgang 2000). Proces tvorby plodnic začíná vysokým počtem rojových buněk ve vegetativním stádiu, které ztrácí fyzickou osobitost při morfogenezi. Růst tyčinek pomalu končí. V určitých polohách se roje shlukují do agregátů. Na povrchu drží dohromady pomocí aglutinace. Začínají se vytvářet specifické prvky jako je stonek, základní deska a stěna sporangiolů. Pomalu se začíná utvářet specifický tvar plodnice. Během fáze zrání se vegetativní buňky přeměňují na myxospory. Tento proces trvá okolo 12-14 hodin (Wolfgang 2000). Mohou se vyskytovat samostatně a nebo ve shlukách. Sorangioly jsou buď zapuštěny do substrátu nebo se pohybují po slizu, který vyprodukují. Barva plodnice je druhově specifická může mít různé barvy žlutou, červenou, oranžovou, bílou nebo hnědou. Pigmenty poskytují ochranu proti fotooxidaci (Burchard, Dworkin 1966). Tvary plodnic mohou být jednoduché sporangioly jako má například *M. xantus* a nebo mohou tvořit složitější rozvětvené útvary *Chondromyces spp* (Shimkets et al. 2006). U některých rodů myxobakterií mají plodnice kulovité tvary a měkkou hlenovou konzistenci (Mohr 2018).

Buňky se shlukují ve vegetativním stádiu do jednoho místa, kde vytvoří útvary podobné sporám, tzv. myxospory, takto mohou myxobakterie přežít i několik let, nebo tak mohou cestovat do vhodných podmínek, pomocí větru, a hledat vhodné působiště. Poté co najdou vhodné místo k přežití, vysporulují a rozletí se do okolí, kde se zahnízdí a začínají se množit (Wolfgang 2000). Myxospory neobsahují žádnou vodu a jsou odolné proti suchu, teplu a ultrafialovému záření. Buňky myxospor obsahují granule polyfosfátů a polysacharidů obklopené podobnými částicemi ribozomu a lipidovým buňkám (Fink, Zissler 1989). Obsah DNA v myxosporách je vyšší než ve vegetativních buňkách (Couke, Voets 1967).



Obr.1. Struktura myxobakteriálních plodnic a jejich těl (Dworkin et al. 2006).

2.3.1 Myxobakterie jako predátoři

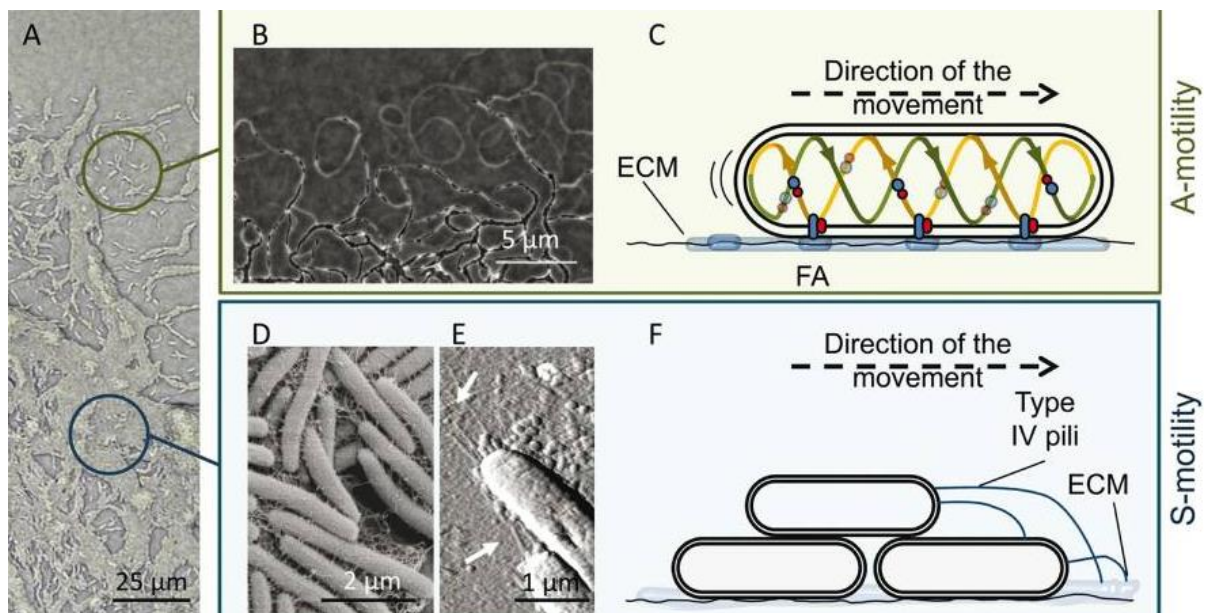
Myxobakterie se rozdělují do dvou skupin na predátory, což je většina druhů a na skupinu, která dokáže rozkládat celulózu. Z čeledi Myxococcales jsou pouze dva rody, kteří dokáží rozkládat celulózu a to jsou *Sorangium* a *Byssovorax* (Reichenbach 1999). Tyto rody dokáží využít anorganické sloučeniny dusíku při růstu na celulóze, tvorbu celulózy potlačí vyšším obsahem sacharidů. V přirozených podmínkách se myxobakterie živí organismy jako jsou kvasinky a eubakterie. Při degradaci makromolekul vylučují hydrolytické enzymy pomocí difuze, vyloučí enzymy z buňky a degradují makromolekuly a poté pomocí difuze dostanou zpět hydrolyzované molekuly. Pokud se myxobakterie nakrmí rozloženými proteiny, dá se toto chování považovat za chování „vlčí smečky“ (Dworkin 1973).

Pokud se myxobakterie vyskytují ve větším počtu změní své chování a stávají se z nich predátoři, kteří začnou požírat bakterie ze svého okolí. Sliz, který vytvářejí během jejich pohybu po substrátu se podílí na proteolytických aktivitách, tím že denaturuje nativní proteiny lyzované buňky (Wolfgang 2000). Obklopí svou kořist jejich enzymy a rychle potravu začnou rozkládat na výživný bujón. Toto chování myxobakterie posouvá na vrchol potravní mikrobiologické pyramidy (Patočka 2017).

2.3.2 Pohyb myxobakterií

Myxobakteriím chybí orgány jako je bičík (Lünsdorf, Reichenbach 1989). Rychlost klouzání po povrch závisí na substrátu a teplotě. Obvyklá rychlost klouzání je okolo 3 až 13 mm za minutu (Reichenbach 1966). Např. *Myxococcus xanthus* klouže na pevném povrchu ve směru osy rychlostí 1-2 mm/min a mění směr pohybu každých 6 minut (Blackhart, Zusman 1985). Myxobakterie využívají dva systémy pohybu, individuální (motilita A) a skupinový (motilita S). Tento pohyb je doprovázen produkcí slizu, který jim napomáhá k pohybu. Motilita A umožňuje pohyb buněk jako jednotlivci bez přímého kontaktu okolních buněk. V přírodě mohou tento systém využít při hledání potravy. Mechanismus motility A není doposud znám. Hypotézou je, že pohyb po substrátu může zahrnovat vytlačování hnací látky, která bobtná a hydratuje a to buňky tlačí dopředu (Wolgemuth et al. 2002).

Jak bylo zmíněno na začátku kapitoly mají individuální a skupinový pohyb, skupinový pohyb umožňuje pohyb buněk pouze tehdy jsou-li buňky od sebe v jedné buněčné délce. S motilita je geneticky a funkčně podobný pohybu gramnegativních bakterií (Kaiser 2000a). Pohyb je poháněn zatažením pili IV (fimbrii) která používá polysacharid. Z toho důvodu mají buňky vnitřní polaritu a tím se dokáží pohybovat po povrchu (Dorado et al. 2016).

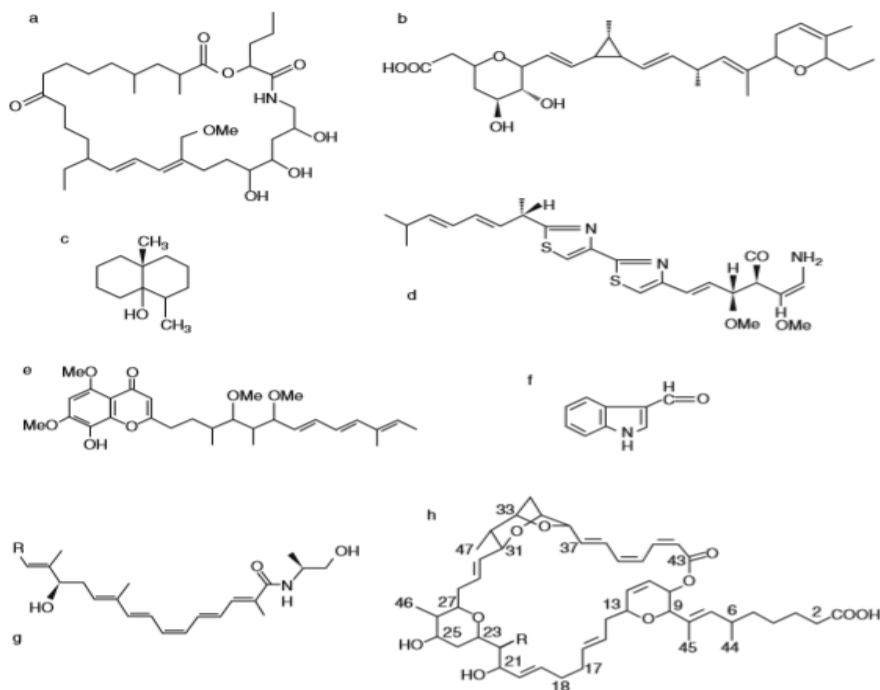


Obr.2. Na obrázku je znázorněn pohyb myxobakterií A a S systému motility. A) Roje druhu *Myxococcus xanthus*. Zelený kroužek vyznačuje jednotlivé buňky s A-motilitou, modrý kroužek ukazuje na buňky s S-motilitou. B) Snímek z fázového kontrastního mikroskopu zobrazuje stopy zprostředkované motilitou A. C) Navržený model fokální adheze (FA) klouzavé motility. Motilitní proteinový komplex se pohybuje v helikálním úseku (poskytovaném cytoskeletálními proteiny) uvnitř buněk. Po tomto transportu komplex zabere vnější komponenty a poté celý komplex přilne k substrátu pomocí slizu ECM (extracelulární matrix) čímž vytvoří FA, který umožňuje klouzavý pohyb. Proteinové komplexy se translokují podél buněčné dráhy a tlačí buňku dopředu. D, E) Snímky systému S-motility, fibrily a pili typu IV. D) Fotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu ukazuje pletiva fibril, které udržují buněčnou soudržnost. E) Fotografie z atomového mikroskopu pili typu IV lokalizovaná na předním okraji buňky. F) Model pro S-motilitu. Pili typu IV kotví k EPS (extracelulární polymerní látka) přítomnému na sousedních buňkách a pohánějí buňku cykly k prodloužení, připevnění a zatažení (Dorado et al. 2016).

2.4 Sekundární metabolity

Myxobakterie produkují sekundární metabolity, které inhibují růst jiných organismů. Již nějakou dobu je známo, že myxobakterie produkují antibiotika. Prvním myxobakteriálním antibiotikem je ambruticin, je to silná protiplísňová sloučenina kterou produkuje *Sorangium celulosum* (Ringel et al. 1977). V posledních letech bylo v myxobakteriích objeveno přibližně 100 základních struktur a cca 600 strukturních variant, které byly chemicky charakterizovány (Reichenbach 1999, Reichenbach 2001). Velká část kmenů myxobakterií (*Sorangium* a *Cystobacterineae*) produkuje sloučeniny s biologickou aktivitou. Látky které vyrobí jsou odlišné, včetně aromatických, polyenových a heterocyklických sloučenin, alkaloidů, polyetherů a peptidů. Některé metabolity, které myxobakterie produkují jsou znázorněny na obrázku (Obr.3) Tyto sloučeniny byly izolovány pouze z kmenů myxobakterií.

Jedinými výjimkami antibiotik jsou pyrrolnitrin a althiomycin, které byly nalezeny v jiné variantě. Různé kmeny stejného druhu mohou produkovat odlišná antibiotika, ale stejné antibiotika se mohou objevit u jiných druhů. Např. pyrrolnitrin byl objeven u několika různých druhů myxobakterií (Dworkin et al. 2006).



Obr. 3. Vzorce sekundárních metabolitů.

Na obrázku jsou vyobrazeny sekundární metabolity, které prodující myxobakterie. a) Myxovirescin A, b) ambruticin, c) geosmin, d) myxothiazol, e) stigmatellin, f) 3-formylindol, g) myxalamid, h) sorangicin (Dworkin et al. 2006).

Dále byly objeveny sloučeniny, které jsou inhibitory eubakteriální syntézy RNA a proteinů nebo jsou dobrými inhibitory přenosu elektronů při respiraci a fotosyntéze. Tyto sloučeniny jsou myxothiazol a stigmatellin, jsou to specifické biochemické sondy, které jsou komerčně dostupné. Dalšími objevenými sloučeninami jsou sloučeniny ovlivňující transport železa myxobakterií (myxochelin a nanochelin). Velké množství sloučenin vzájemně prolíná s eukaryotickým cytoskeletem. Rhizopodin a chondramid reaguje s aktinem a s tubulinem reaguje disorazol a epothilon (Gerth et al. 1996). Epothilon byl nedávně době testován na lidech jako protinádorové léčivo v několika farmaceutických laboratořích. Izomery tohoto inhibitoru stabilizují polymerázové mikrotubuly a to vede k zastavení mitotického přechodu G2M (přípravná kdy se buňka připravuje dělit) a také se zastavuje cytotoxicita v buňkách (Bollag et al. 1995).

Antibiotikum TA je známé jako myxovirescin. Je to makrocyclický sekundární metabolit, který má velkou baktericidní aktivitu (Gerth et al. 1982). Antibiotikum TA bylo objeveno v kmene *Mx. xanthus* (Rosenberg et al. 1973). Data z nukleární magnetické rezonance udávají, že toto antibiotikum může být identické s myxovirescinem (Gerth et al. 1982, Trowitzsch et al. 1982, Trowitzsch, Kienast et al. 1989). Myxoviresciny jsou produkovány hlavně kmeny *Mx. xanthus* a *Mx. Virescences*. (Onishi et al. 1984)

Další dobrou aplikací může být v proteinech a enzymů myxobakterií, ale to nebylo doposud probádáno. Do budoucna by mohly být zajímavé restriční endonukleázy a proteázy. *Mx. xanthus* během svého růstu produkuje lektin, vylučuje krevní koagula jako je myxalin (glykopeptid, Masson, Guespin 1988).

Sekrece proteinů do okolního prostředí u myxobakterií je neobvyklá, protože většina gramnegativních bakterií tuto schopnost nemá. *Mx. xanthus* vylučuje v mediu více než 50 různých proteinů, ale skutečné číslo produkujících proteinů může být ve skutečnosti menší z důvodu, že některé skupiny mají sníženou proteolytickou aktivitu myxobakterií. (Nicaud et al. 1984)

V půdním společenstvu mohou myxobakterie dosahovat velké hustoty, mohou se stát antagonistickými vůči jiným potřebným organismům jako je např. *Azotobacter*, který fixuje vzdušný dusík. Toto tvrzení lze prokázat pouze v laboratorních pokusech. Myxobakterie jsou schopny ničit cyanobakterie ve vodném prostředí a proto se mohou využít jako indikátory znečištění (Gräf 1975, Trzilová et al. 1980, Trzilová et al. 1981).

2.5 Specifická izolace myxobakterií

Doposud bylo izolováno a popsáno přibližně jedno procento přirozeně se vyskytujících myxobakterií. Většina myxobakterií zůstává stále nekultivovatelných a nepopsaných z důvodu, že nebyly dosud objeveny vhodné kultivační podmínky. Myxobakterie vyžadují specifický postup izolace a materiál by se měl okamžitě zpracovat hned po odběru, pokud to nelze, materiál by měl být vysušen co nejrychleji, aby se zabránilo růstu plísní a množení nežádoucích bakterií, které později způsobují problémy při izolaci. Vysušené vzorky se dají uchovávat dlouhou dobu při pokojové teplotě. Myxobakterie se mohou sušit buď v přírodním substrátu a nebo na sterilním filtračním papíru. Dá se říct, že myxobakterie, které se sušily v substrátu jsou mnohem stabilnější než ty, které se sušily na filtračním papíru. Vědci byli schopni po 10 letech během 12-ti letého období, ze vzorků, které byly takto ošetřeny izolovat pravidelně myxobakterie (Dworkin et al. 2006).

K izolování čtyř nebo pěti druhů myxobakterií postačí cca 1 g vzorku půdy, ale často se stane, že jejich izolace není úspěšná. Důvodem je, že myxobakterie produkují slizový matrix a díky němu se tolik nerozptylují, když se vzorek půdy protřepává ve vodě, takže po nanesení suspenze jsou myxobakterie velmi málo zastoupeny (Singh 1947). Myxobakterie kolonizují celkově pomalu a ve většině případů se stává, že jsou přerostlé jinými půdními mikroorganismy. Z půdy se myxobakterie izolují tak, že se odebírají ze svrchní části půdního profilu. Izolace je účinnější, když se smíchá více půdního materiálu, než když se použije velké množství jednoho odebraného horizontu (Dworkin et al. 2006).

Zjistilo se, že pouze druhy *Myxococcus*, *Nannocystis* a některé druhy *Coralloccusa* nejsou schopny využít uhlohydráty. Dalšími kultivacemi se ukázalo, že *Myxococcus xanthus* nemá hexokinázu a není schopen přežít a metabolizovat na cukrech. Toto se však nemůže zobecnit na všechny kmeny myxobakterií, např. *Stigmatella* a *Cystobacter* dokáží dobře nakládat s cukry (Irschik, Reichenbach 1985a).

2.5.1 Izolace z půdy

Myxobakterie se izolují z např. kůra mrtvých stromů, hnijící dřevo. Vzorek je vložen do Petriho misky, která je obložená několika vrstvami filtračního papíru. Materiál je namočen do destilované vody po dobu několika hodin, a přidal se cykloheximid z důvodu eliminace plísní. Poté se voda odleje a průběžně se během inkubace, podle potřeby, přidává destilovaná voda. Jestliže se vzorek dostatečně nezavlažuje stává se suchým a může být brzy pokryt plísní, pokud je tomu naopak, přidává se velké množství vody, myxobakterie nemají prostor se vyvíjet. Celkové prostředí v termostatu by mělo být vlhké, aby vzorky rychle nevysychaly. Izolace jako taková trvá cca 20 dní (Krzemieniewski, Krzemieniewski 1927b).

Odebraný materiál obsahuje i jiné mikroby, hlístice, houby, roztoče aj. Vzorky odebrané z nižších teplot (arktické prostředí, vysoká nadmořská výška) rostou při 6 °C. Při izolaci se postupuje stejně jak je popsáno výše. Na začátku izolace by se měly vzorky kontrolovat každý den tj. třetí den inkubace z důvodu, že plodnice vyrostou a pak se zhroutnou a jsou hůře pozorovatelné. Plodnice pak mohou být rychle zarostlá jinými mikroorganismy. Většina plodnic se na agaru objeví v prvních 10 dnech. Později se na miskách objevují kulové nebo hřebenovité masy vegetativních buněk a jsou obvykle barevné (žluté, oranžové aj.) Takto zbarvené masy mají obvykle kmeny *Sorangineae* nebo *Nannocystis* (Dworkin et al. 2006).

2.5.2 Izolace myxobakteriálních rojů

Pro tuto izolaci je použita metoda s živými mikroorganismy (např. *E.coli*). Myxobakterie jsou dravé, proto se na vodní agar (WCX agar, složení viz. metodika) naočkují tři rovnoběžné pruhy např. *E.coli* a na každý konec se umístí předem vysušená půda (při laboratorní teplotě). Je třeba dbát na to, aby nedošlo k rozptýlení po destičce. Aby se lépe manipulovalo se vzorkem doporučuje se vzorek lehce navlhčit sterilní vodou. Pro omezení růstu nežádoucích plísní se přidává do agaru antibiotikum cykloheximid (Brockman, Boyd 1963). Antibiotikum nezamezuje růstu améb, napomáhá k selekci druhů myxobakterií, zároveň zamezuje růstu jiných klouzavých bakterií (cytofágy aj.). *E.coli* je dobrou „potravou“ pro růst myxobakterií. Díky výše zmíněné metodě byl vyizolován druh *Nannocystis* (Dworkin et al. 2006).

Pro izolaci myxobakterií se s úspěchem používá i pekařské droždí. Inkubace probíhá při 30°C a kontrola růstu je pod binolupou. Myxobakterie se objevují přibližně po 14 dnech. Myxobakterie rostou jako první na „potravě“ a později se rozrůstají po celém agaru. Rychle se rozvíjí např. *Cystobacter* později se může objevovat *Sorangineae*. K detekci jemných filmových rojů myxobakterií je zapotřebí použít binolupu a naklápěcím zrcadlem nebo zdrojem světla aby bylo možné světlo pouštět v malém úhlu na povrch desky. Čím dříve se rozpozná roj bakterií tím lépe se pak provádí další izolace (Lampky, Brockman, 1977).

2.5.3 Izolace ze zahřáté a sušené půdy

Tato izolace myxobakterií byla prováděna přímým nanesením ošetřených vzorků půdy na agar. Půda se nejprve vysušila přes noc na vzduchu (laboratorní teplota). K vysušené půdě je přidána sterilní destilovaná voda a vzniklá suspenze je zahřívána na 56 °C po dobu 10 minut a očkovaná na CY-C10 agar (složení viz. přílohy, CY-C10 je médium s 1% kaseinem místo 0,3% a s 50 mg cykloheximidu / ml). Do agaru byly přidány antibiotika cykloheximid byly také zahrnuty antibiotika jako jsou vankomycin, ristocetin aj. Kombinace zahřívání- sušení materiálu a přidání antibiotik, potlačila růst nežádoucích bakterií a vyšší koncentrace kaseinu inhibovala nadměrné rojení myxobakterií, ale stále byly kolonie rozpoznatelné (Karwowski et al. 1996).

Další využívané medium je CY agar, na tomto mediu je obvykle růst kolonií sinější, ale za to se roje šíří pomaleji, obvykle brzy umírají kvůli nadměrné produkci amoniaku. Vhodný pepton pro toto medium je např. kasein ale může být použit i sójový pepton. Výběr správného peptonu je důležitý, např. kasein ne vždy podporuje růst myxospor (Karwowski et al. 1996).

2.5.4 Izolace rozkladačů celulózy

Pro izolaci myxobakterií, které degradují celulózu se používá agar s celulórou, která slouží jako zdroj uhlíku. Pro *Sorangium* je dobrým zdrojem dusíku NH_4^+ , ale lepší výsledky se dosáhnou když do agaru (ST21, složení viz. přílohy) přidáme NO_3^- . Na agar se nanáší celulóza ve formě sterilního filtračního papíru. Jelikož inkubace probíhá delší dobu doporučuje se přidat do agaru opět antibiotikum cykloheximid z důvodu zamezení růstu hub. Filtrační papír se naočkuje do středu petriho misky, kousky vzorku se naočkují na filtrační papír a vloží se do termostatu při 30°C. Rozklad celulózy lze očekávat přibližně 9 den inkubace. Po 10-20 dnech by se měly objevovat kmeny *Sorangium*. Druh *Sorangium* je zatím jediný známý druh, který degraduje celulózu. Zbarvuje se jako světle žluté či oranžové kolonie. Plodnice se často vyskytují na okrajích filtračního papíru, ale i na inokulu na agaru (Brockman, Boyd 1963).

Kromě zástupců z rodu *Sorangium* se mohou později také vyvinout i necelulytické myxobakterie. Ty se vyskytují ve formě dlouhých oranžových kolonií, většinou se jedná o kmen *Chondromyces* (Brockman, Boyd 1963).

2.5.5 Izolace z vod

Sedimenty jsou odebírány z jezer, rybníků, řek aj. Před izolací se musí odebraný sediment přefiltrovat. Na filtraci se použije sterilní membránový filtr s malými póry. Vytvoří se chudé medium VY/2 (složení viz. přílohy) se sníženým obsahem potravinářského droždí. Filtrát se poté naočkuje na agar a inkubuje se až při teplotě 34°C. Inkubace trvá okolo 5 dnů, kdy byl pozorován první růst plodnic a rojů myxobakterií (Gräf 1975).

Inkubace myxobakterií trvá delší dobu cca 3 týdny. Během inkubace může dojít k vysušení agaru, proto se doporučuje na petriho misky nalít silnější vrstva agaru než při klasické izolaci bakterií. Dobré je mít v termostatu vlčí prostředí, zabraňuje to rychlému vysušení. Případně omotat petriho misku parafilmem. Dá se říct, že na agaru VY/2 rostou skoro všechny myxobakterie, včetně degradátorů celulózy. Tento agar obsahuje kvasniční

extrakt, který slouží jako „potrava“. Na agaru VY/2 je značně stimulována klouzavost, proto jsou roje velmi velké. Myxobakterie začínají tvořit plodnice až po několika přeočkováních. Kolonie na VY/2 agaru jsou odolné, proto se přeočkování provádí jednou za 2 týdny. Důvod je takový, že tento agar je relativně chudý, živiny jsou postupně solubilizovány a pH se skoro nemění (Dworkin et al. 2006).

2.5.6 Uchovávání a konzervace

Vegetativní kolonie myxobakterií se skladují na agarových plotnách obvykle při 30°C, takto zůstanou životaschopné okolo 2 týdnů. Pokud se dále nemohou myxobakterie udržovat, musí se jejich plodnice zakonzervovat. Agar, na kterém jsou kolonie myxobakterií, se vyřízne a položí na sterilní filtrační papír, ten se pak vloží do prázdné petriho misky a jsou sušeny v evakuovaném exsiskátoru. Takto vysušené myxobakterie se mohou uchovávat léta. Tato metoda je hlavně efektivní pro kmen *Nannocystis*, z důvodu že jejich kolonie jsou v přímo v agaru (Dworkin et al. 2006).

Dále mohou být kolonie myxobakterií přeneseny z vhodného růstového media do obdélníků sterilního filtračního papíru na vodní agar a nechají se inkubovat při 28°C cca 8 dní. Po inkubaci se filtrační papír přenese do nádoby (sterilní zkumavka se závitem) a opět se suší v exsiskátoru několik dnů. Připravené konzervy se skladují při 6°C. Tato metoda je relativně levná. Její nevýhodou je však to, že funguje pouze, když se kolonie myxobakterií často nepřezolávají. Metoda by se měla použít jakmile jsou kolonie čisté, bezkontaminace jinými organismy (Dworkin et al. 2006).

3 Materiál a Metody

Cílem bylo izolovat čisté myxobakterie z vybraných půd. Pro izolaci myxobakterií bylo otestováno několik postupů dle dostupné literatury. Dále byly izolovány také ostatní heterotrofní bakterie ze stejných vzorků půdy, které by následně sloužily při predačních experimentech, kdy se sleduje zvětšování kolonie myxobakterií na předem narostlé bakteriální „potravě“.

3.1 Vyhodnocení zastoupení myxobakterií

Cílem bylo vyhodnotit relativní zastoupení myxobakterií v mikrobiálním společenstvu v různých ekosystémech. Data ze sekvenace cca 1000 vzorků byla poskytnuta a předpřipravena školitelem (základní bioinformatické vyhodnocení). Vlastní zpracování dat (tzv. OTU tabulky) bylo provedeno v programu Microsoft Excel.

3.2 Odběrová lokalita

Vzorky půdy pro izolaci myxobakterií byly z několika lokalit – zmražená půda z permafrostu z Grónska.

3.3 Izolace Myxobakterií

3.3.1 Složení a příprava selektivních agarů

Pro izolaci myxobakterií byly připraveny dvě pevná média, WCX (Tab. I), VY/4 - SWS (Tab.II). Hodnoty pH kultivačních medií WCX byla upravena na 7,2 a pH VY/4 – SWS na 7,5 (pomocí 1M HCl nebo 1M NaOH). Po sterilizaci v autoklávu (121°C, 20 min) a ochlazení bylo přidáno do WCX agaru antibiotikum cykloheximid pro eliminaci růstu plísní, a do VY/4 – SWS navíc vitamin B₁₂ a opět cykloheximid . Poté bylo medium bylo rozlito na Petriho misky (cca 20 ml agaru).

Tab.I: Složení WCX agaru.

Složka	Množství (g/l)
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	1,00
Agar	15,00
Cykloheximid	0,025

Tab.II: Složení VY/4-SWS.

Agar VY/4-SWS

Složka	Množství (g/l)
NaCl	20,00
Potravinářské droždí	2,50
Bacto agar	15,00
Vitamin B ₁₂	0,50
Roztok mořské vody	1000

Roztok mořské vody:

Složka	Množství (g/l)
Ferric citrate	0,01
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	8,00
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	1,00
KCl	0,50
NaHCO ₃	0,16
H ₃ BO ₃	0,02
KBr	0,08
SrCl ₂ . 6 H ₂ O	0,03
di-Na-β-glycerolfosfát	0,01
Roztok stop. prvků SL-4	1,00

Roztok stopových prvků SL-4:

Složka	Množství (g/l)
EDTA	0,50
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,20
Roztok stop. prvků SL-6	100

Roztok stopových prvků SL-6:

Složka	Množství (g/l)
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,10
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,03
H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,20
CuCl ₂ . 2 H ₂ O	0,01
NiCl ₂ . 6 H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,03

3.3.2 Použité metody izolace myxobakterií

Pro izolaci myxobakterií byly použity dvě metody (Karwowski et al. 1996, Singh 1947).

1. metoda na vyizolování myxobakterií.

3 gramy půdy z každého horizontu bylo smícháno s 30ml destilované H₂O a suspenze zahřívána při 56°C po dobu 20 minut. Tyto extrémní podmínky měly podle popsání metodiky zajistit eliminaci ostatních méně odolných bakterií při následné kultivaci. Vzniklá převařená suspenze (150μl) byla naočkována na WCX agarem (Tab.I) Kolonie neznámých bakterií začali růst cca po 8 dnech inkubace. Teplota v inkubátoru byla nastavená na 14°C z důvodu, že vzorky byly odebrány z nižších teplot (Grónska).

2. metoda s VY/4 – SWS agarem na vyizolování myxobakterií schopných predace

3g půdy bylo vysušeno při laboratorní teplotě. Poté se na pevný VY/4 - SWS agar (Tab.II) naočkovala *E.coli*, růst trval přibližně den. Na vyrostlou *E.coli* se vložila vysušená půda. Misky se inkubovaly při 14°C a nechaly se růst 7 dní. Po 7 dnech se nově vyrostlé koloni, potencionálních myxobakterií, naočkovaly na VY/4 - SWS agar (Tab.II) . Inkubace trvala přibližně 8 dní.

3.4 Izolace psychrotolerantních bakterií (potrava pro myxobakterie) z arktické půdy

Cílem bylo izolovat bakterie z přirozeného prostředí arktických půd z Grónska, které by následně sloužily jako testovací „potrava“ pro myxobakterie. Na nutrient agar (NA, 28 g/l) byla naočkována suspenze připravené z různých půd (poměr půda:voda byl 1:10). Suspenze byla připravena tak, že se smíchalo 30 ml destilované vody a bylo přidáno 3g půdy. Na NA se dalo 150 µl homogenní půdní suspenze. Takto připravené vzorky byly vloženy do inkubátoru při teplotě 14°C a nechaly se růst 4 dny.

3.5 Identifikace izolátů

3.5.1 Izolace DNA a PCR

Vybrané kolonie byly následně přečištěny metodou křížového roztěru a v dalším kroku byla extrahována DNA pomocí izolačního kitu DNeasy UltraClean Microbial Kit (QIAGEN).

Pomocí přístroje QUANTUS byla fluorimetricky změřena koncentrace DNA a poté byl připraven PCR MasterMix (Tab.III). Do reakce bylo dáno 10 – 20 ng DNA templátu.

Tab.III: Složení MasterMixu.

Složka	Množství (μl)
PCR H ₂ O	9,70
FastPCR mix (včetně Taq polymerázy)	12,50
primer 1512uR (100 μM)	0,25
primer 9bfm (100 μM)	0,25
BSA (Bovine serum albumin)	0,30

Pro reakci byly použity primery 9bfm (GAGTTTGATYHTGGCTCAG) a 1512uR (ACGGHTACCTTGTTACGACTT), koncentrace v reakci byla 1 μM (Mühling a kol. 2008). Poté byl přidán FastStartPCR Master (Roche) který obsahuje nukleotidy, Taq polymerázu a hořčičnaté ionty. Dále bylo přidáno do MasterMixu BSA (Bovine serum albumin), který slouží jako tzv. „PCR enhancer“ – zlepšuje podmínky PCR (např. váže se na fenol. látky a tím zvyšuje účinnost Taq polymerázy). Do zkumavek na PCR byl dán MasterMix a DNA templát. Do negativní kontroly byla dána pouze voda a do pozitivní kontroly DNA *E.coli*. Vzorky byly amplifikovány za daných PCR podmínek (Tab.IV)

Tab.IV: PCR cyklus.

Fáze	Teplota(°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Začátek denaturace	95	180	1x
Denaturace	95	60	
Nasedání primerů	52	60	30x
Elongace	72	90	
Dosyntéza produktů	72	600	1x

Po doběnutí reakce byly vzorky dány na 1% agarózový gel a pomocí elektroforézy byla ověřena správná velikost PCR produktu. Elektroforéza běžela 30 min. při 100 V.

Před sekvenací bylo potřeba PCR produkt přečistit a naředit tak, jak vyžadovala sekvenční firma SEQme. DNA byla přečištěna pomocí QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), čištění bylo provedeno podle protokolu od výrobce. Každý vzorek byl sekvenován zvlášť s dopředným (9bfm) i zpětným (1512uR) primerem, tak, aby byl pokryt celý gen 16S.

3.5.2 Vyhodnocení sekvenací

Data byla vyhodnocena pomocí programu Geneious (verze 2019.0.3). Protože pro sekvenaci byly použity dopředné i zpětné primery, obě výsledné sekvence pak byly pomocí programu Geneious v místě překrytí spojeny. Byla tak získána téměř celá oblast kódující 16SrRNA gen, což umožnilo velice přesnou identifikaci. Pomocí sekvence dopředného 9bfm a zpětného primeru 1512uR byla nalezena amplifikovaná oblast 16S rRNA genu. Pro identifikaci jsme použili online NCBI 16SrRNA, jako vyhledávací algoritmus MEGABLAST (maximum hits -10, E-value - 10^{-5}).

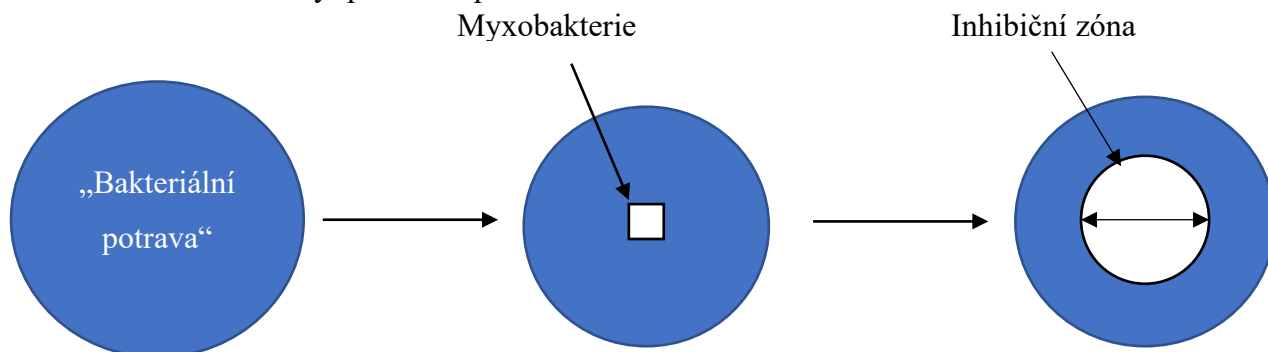
3.5.3 Uchovávání izolátů

Pro uchování čistých kultur byly připraveny glycerolové konzervy. K 700 μ l bakteriální kultury (homogenizována v kapalném médiu) bylo přidáno 300 μ l 50% glycerolu. Takto připravené popsané konzervy byly uskladněny do mrazáku při -80°C .

3.6 Predační test

S čistou kulturou myxobakterií (*Haliangium ochraceum*), které nám byla zaslána z Univerzity v Greifswaldu (laboratoř Prof. Tima Uricha) byl proveden tzv. predací test. Na agary WCX (Tab.I) byly naočkovány dvě vyizolované bakterie, *Pseudomonas helmanticensis* (Gram-negativní bakterie) a *Arthrobacter* (Gram-pozitivní bakterie). Z obou izolátů byla nejprve připravena bakteriální suspenze (cca 500 μ l). Vzniklý roztok byl poté rozočkován pomocí mikrobiologické hokejky po celém povrchu agarů a doprostřed Petriho misky byl vložen vyříznutý agar s kulturou myxobakterií. Provedly se čtyři opakování, kdy byly naočkovány misky vloženy do inkubátoru o teplotě 14°C . Misky se nechaly růst dva týdny a po dvou týdnech se odečetla inhibiční zóna.

Predační test byl prováděn podle této ilustrace:

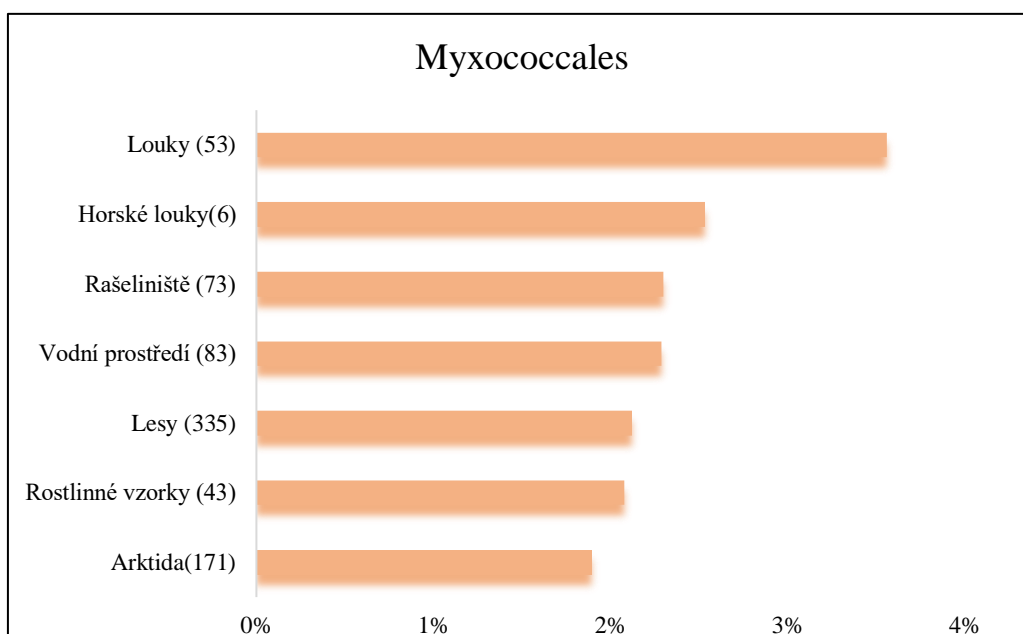


4 Výsledky

Ve výsledcích jsou prezentovány vzorky z permafrostu, z Grónska. Kolonie se na pevných médiích objevovaly během sedmi dní. Přeočkované kolonie rostly optimálně ke zvolené teplotě inkubace. Celá inkubace trvala od začátku přibližně tři týdny. Růst kolonií mohl být ovlivněn zvolenou teplotou (14°C).

Izolace myxobakterií byla prováděna metodou 1. a 2.zobrazena na Obr. 6. a 7.

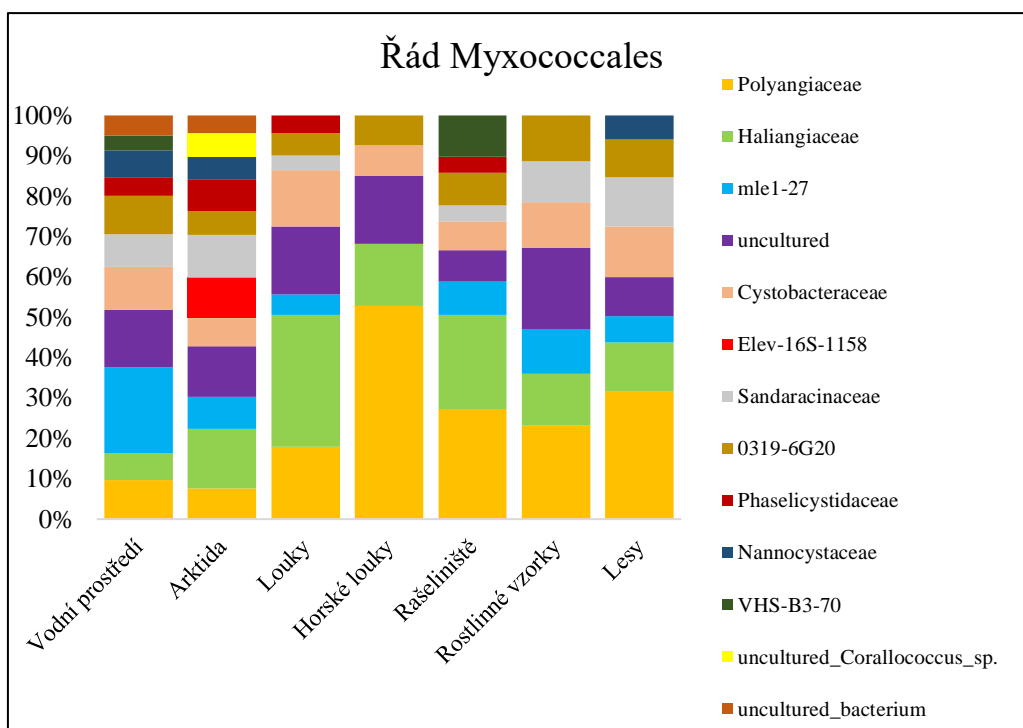
4.1 Zastoupení jednotlivých čeledí Myxococcales



Obr.4: Průměrné relativní zastoupení řádu *Myxococcales* ve vybraných ekosystémech. V závorkách je uveden počet vzorků (Bárta et al., nepublikováno).

Ze sekvenační analýzy jsme zjistili relativní zastoupení myxobakterií v námi vybraných ekosystémech (louky, rašeliny, lesy). Z obrázku je patrné, že relativní zastoupení myxobakterií je nejvíce v loukách. Jejich abundance je v lučních ekosystémech je přibližně 3,5% za to nejnižší je v Arktidě okolo 1,9%. V lesích je jejich abundance nižší (2,1%).

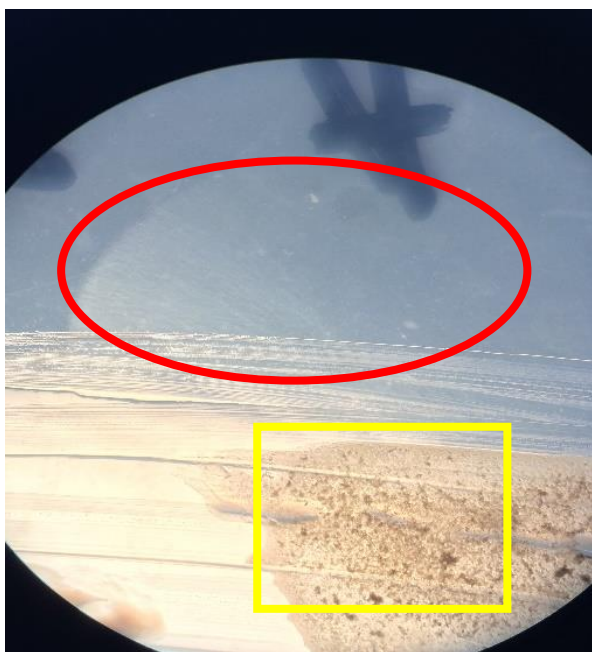
4.2 Řád Myxococcales v jednotlivých ekosystémech



Obr.5. Řád Myxococcales zobrazuje jednotlivé čeledě, které jsou zastoupené v jednotlivých ekosystémech (Bárta et al., nepublikováno).

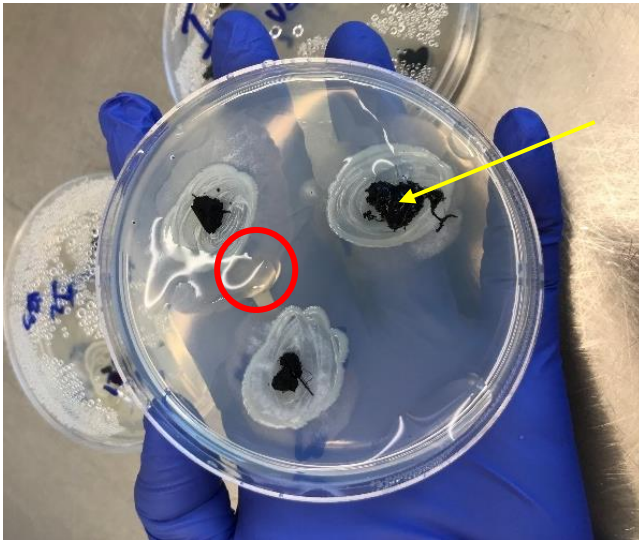
Podle obrázku (Obr.5) můžeme říct, že je Arktida na druhy velmi bohatá a poměrně uniformní, obsahuje 12 čeledí než např. horské louky, ty obsahují pouze 5 čeledí. V horských loukách je nejvíce zastoupená čeleď *Polyangiaceae*, která je zde zastoupená až v 50%. V loukách je nevíce zastoupená čeleď *Haliangiaceae*, ta je zastoupená přibližně v 32%. *Haliangiaceae* se také vyskytuje v Arktidě, zde se jí vyskytuje nejméně cca 8%.

4.3 Metody izolace



Obr.6: Použití WCX agaru (Tab.I) 1.metoda. Ve zvýrazněném červeném oválu jsou vyznačeny neznámé kolonie bakterií. Žlutý čtverec vyznačuje půdní suspenzi na WCX agaru (Tab. I).

Po přeočkování a sekvenaci neznámých kolonií bylo zjištěno, že se jedná o podmíněně patogenní houbu *Pseudogymnoascus destructans*, která způsobuje onemocnění u netopýrů (Tab.V). Touto metodou se nám nepodařilo izolovat myxobakterie z půdy, i když jsme postupovali podle popsané metody (1.metoda). Myxobakterie vyskytující se v půdě Arktidy nejsou zřejmě adaptované na teplotu varu a mohli jsme je při převařování půdy zahubit. Či byly špatně přizpůsobené kultivační podmínky a růst při 14°C myxobakteriím nevyhovoval či přidané antibiotikum (cykloheximid) není účinné na houbu *Pseudogymnoascus destructans*.



Obr. 7: Použití 2. metody vysušení půdy při laboratorní teplotě a aplikace suspenze buněk *E.coli*. V červeném kolečku jsou neznámé kolonie, které byly posléze identifikovány jako entomopatogenní houba *Lecanicillium muscarium*. Tato houba je nebezpečná pro hmyz, který se po styku s houbou infikuje plísňovými spory. Žlutá šipka na Obr.7. ukazuje na vysušenou půdu na vyrostlé *E. coli*.

I když tento pokus nebyl tak nešetrný jako v první metodě tak ani tato metoda nevedla k izolaci myxobakterií. Podle obr.5 (graf relativní zastoupení řádu *Myxococcales* v jednotlivých ekosystémech) víme, že se myxobakterie ve vzorcích půdy vyskytují, ale je možné, že se v půdě nevyskytují v takovém množství a aktivitě, aby byly schopny se množit. Nebo se opět mohlo jednat o to, že jim nastavená teplota v termostatu nevyhovovala.

4.4 Výsledky sekvenace

Bohužel se nám nepodařilo izolovat čisté kultury myxobakterií, mohl být špatně zvolen postup izolace nebo se myxobakterie nevyskytovaly v takovém počtu, aby byly schopny se množit. Postup v 1.metodě mohl být drastický a teplota 100 °C mohla myxobakterie zahubit. 2. metoda nebyla tolik drastická, ale mohlo se stát, že vysušování arktické půdy myxobakteriím, které jsou adaptované na chladné podmínky neprospívá a v suchém prostředí zemřou. Pro další pokusy nám byly poskytnuty kmeny myxobakterií z německé laboratoře prof. Tima Uricha (University of Greifswald). Identifikovali jsme dvě houby *Pseudogymnoascus destructans* a *Lecanicillium muscarium* (viz. Tab.V)

Na nutrient agaru se nám podařilo vyizolovat 6 druhů bakterií (Tab.VI.) Tyto bakterie byly izolovány ze stejných ekosystémů, protože myxobakterie jsou tzv. predátoři. Předpokládali jsme, že na tyto bakterie budou při predačním pokusu nejlépe reagovat.

Tab.V. Bakterie identifikované v 1. a 2. metodě na izolaci myxobakterií (MEGABLAST, maximum hits -10, E-value - 10^{-5}).

	Druhy	Agar	Metoda	Bit score
1.	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (houba)	WCX	1.	887.512
2.	<i>Lecanicillium muscarium</i> (houba)	VY/4 - SWS	2.	842.726
3.	<i>Staphylococcus xylosus</i>	VY/4 - SWS	2.	2,554.86

Metody na vyizolování myxobaterií vyšly negativně. V 1.metodě jsme vyizolovali patogenní houbu *Pseudogymnoascus destructans*. V druhé metodě jsme izolovali opět patogenní houbu *Lecanicillium muscarium* a grampozitivní kok, u grampozitivní bakterie se s největší pravděpodobností jedná o kontaminaci, protože *Staphylococcus xylosus* se běžně vyskytuje na kůži lidí. S největší pravděpodobností se stalo, že přidané antibiotikum není účinné na tyto houby.

Tab.VI: Identifikace psychotolerantních bakterií (potrava pro myxobakterie) na NA agaru (MEGABLAST, maximum hits -10, E-value - 10^{-5}).

	Druhy	Podobnost (%)	Bit score
1.	<i>Pseudomonas sp.</i>	99,9	2,532.31
2.	<i>Pseudomonas syringae</i>	100,0	2,534.12
3.	<i>Arthrobacter sp.</i>	100,0	1,936.41
4.	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	99,9	2,584.58
5.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,8	2,524.20
6.	<i>Pseudomonas jessenii</i>	99,7	2,564.27

V půdním společenstvu se nejvíce vyskytovala gram negativní bakterie *Pseudomonas*. Tyto gram-negativní bakterie se mohly v půdě vyskytovat hojně. Podařilo se nám vypěstovat pouze jednu gram-pozitivní bakterii a to *Arthrobactera*.

4.5 Predační test



Obr. 8.: Inhibiční zóna u predačního testu. Na obrázku (Obr.8) je znázorněná šipkou inhibiční zóna. Na petriho misce je WCX agar (Tab.I.) a naočkovaná suspenze (500 μ l) vyizolované bakterie *Arthrobacter sp.* uprostřed misky je vyříznutý agar s čistou kulturou myxobakterie (*Haliangium ochraceum*).

U vzorku, který jsme inkubovali při 14°C byla zaznamenána inhibiční zóna pouze u misky s gram pozitivní bakterie. Inhibiční zóna měla po 14 dnech cca 0,5 -1 cm. Růst kolonie mohl být ovlivněn nižší teplotou. Předběžné výsledky ukazují, že *Haliangium ochraceum* zřejmě preferuje G⁺ bakterie. Pro ověření tohoto výsledku bude potřeba provést test znovu a s větším počtem G⁻ a G⁺ bakterií.

5 Diskuze a závěr

V bakalářské práci jsem se zabývala výskytem myxobakterií v různých ekosystémech včetně Arktidy. Ze zmrzlé arktické půdy jsem se snažila o izolaci čistých kultur myxobakterií a provést predační test z vypěstovaných myxobakteriálních kolonií. Z dostupných zdrojů, poskytnuté katedrou, bylo zjištěno, že se myxobakterie v arktické půdě vyskytují. Izolace myxobakterií byla časově náročná a trvala přibližně 14 dní. Z použitých metod se nám myxobakterie z půdy nepodařilo izolovat. Důvodů je několik

Myxobakterie jsme se pokoušeli izolovat následujícími metodami. Postup v první metodě mohl být nešetrný, zahřívání suspenze půdy mohlo usmrtit vyskytující se myxobakterie jelikož poskytnuté vzorky byly z arktického prostředí. Nebo zvolený agar (WCX) byl pro myxobakterie chudý. V půdě se mohly vyskytovat v podobě myxospór a proto by potřebovaly výživnější agar. (Karwowski et al. 1996) zvolil v této izolaci medium CY-C10, které je obohaceno o pekařské droždí, izolace s CY-C10 agarem byla efektivní pro izolaci druhů *Myxococcus*. Tudíž medium WCX v této izolaci bylo nevhodně zvoleno.

V druhé metodě pro izolaci myxobakterií byl zvolen postup se sušením půdy. Tento postup nebyl drastický tak jako v první metodě, ale ani tak nám myxobakterie nevyrostly. Je možné, že se myxobakterie v půdě nevyskytovaly v takovém množství, aby se dokázali dále rozvíjet. Touto metodou byl ve studiích izolován např. *Nannocystis*, na rozdíl od naší metody byl použit WCX agar (Dworkin et al. 2006), opět se mohlo s jednat, že námi zvolený agar VY/4 – SWS byl špatně zvolen.

Myxobakterie jsou přírodní predátoři, dokáží se živit bakteriemi v jejich společném prostředí. Predační test jsme prováděli s myxobakteriemi, které nám byly poskytnuty z německé sbírky. Test jsme prováděli s G⁺ a G⁻ bakterií. U G⁻ nebyla zaznamenána žádná inhibiční zóna. Mohlo se stát, že vytvořená suspenze z G⁻ nebyla natolik silná aby myxobakterie uživila. U G⁺ byla zaznamenána malá inhibiční zóna.

Výsledky v predačním testu ukazují, že námi zvolená myxobakterie (*Haliangium ochraceum*) se zřejmě dokáže živit G⁺ bakterií (*Arthrobacter sp.*). Tento výsledek je zajímavý, jelikož bylo zjištěno, že se myxobakterie většinou živí G⁻ bakteriemi (Morgan et al. 2010). V jiných predačních testech byly pokusy s kmeny *Coralloccoccus* a *Myxococcus*, a jako potrava sloužila G⁻ bakterie *E. coli*. Zjistilo se, že použit *E. coli* jako bakteriální „návnadu“ při izolaci myxobakterií je neúčinnější (Zhang et al. 2013, Charousová et al. 2017).

Myxobakterie se často vyskytují v půdním společenstvu a dokáží být psychrofilní. V našich studiích jsme přišli na to, že se v arktické půdě nejčastěji vyskytují dvě čeledě *Polyangiaceae* a *Haliangiaceae*. Za to v antarktických biotopech byly objeveny především kmeny *Myxococcus* (Rückert 1985). Výskyt a relativní zastoupení myxobaterií je tedy velmi závislý na lokálních podmínkách jako je teplota, dostupnost živin ale také přítomnost potenciální kořisti, kterou se myxobakterie živí.

Abychom tyto výsledky mohli s jistotou potvrdit, bude nutné tyto pokusy provádět opakovaně. Budeme se dále pokoušet o izolaci čistých kultur myxobakterií a snažit se najít vhodné kultivační postupy pro myxobakterie

6 Přílohy

Tab. Tab. VII: Složení VY/2 agaru

Složení agaru ST21.

Roztok A:

Složka	Množství (%)
K ₂ HPO ₄	0,1
Potravinářské droždí	0,002
Agar	1,00

Roztok B:

Složka	Množství (%)
KNO ₃	0,1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,00
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,00
FeCl ₃	0,02
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01

Tab. VIII: Složení VY/2 agaru

Složka	Množství (%)
Potravinářské droždí	0,50
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10
Kyanokobalamin	0,50
Agar	1,50

Tab. IX: složení agaru CY-Y10

Složka	Množství (%)
Kasitonin	0,30
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10
Pekařské droždí	0,10
Agar	1,50

7 Seznam literatury

WOLFGANG D. (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils, FEMS Microbiology Reviews, Volume 24, Issue 4, Pages 403–427.

MOHR K. I. (2018). Diversity of Myxobacteria—We Only See the Tip of the Iceberg, MDPI, 6 (3): 84.

IIZUKA T., JOJIMA Y., HAYAKAWA A., FUJII T., YAMANAKA S., FUDOU R. (2013). *Pseudenygromyxa salsuginis* gen. nov., sp. nov., a myxobacterium isolated from an estuarine marsh. IJSEM, 63: 1360–1369.

SANFORD R. A., COLE J. R., TIEDJE J. M. (2002). Characterization and Description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an Aryl-Halorespiring Facultative Anaerobic Myxobacterium, AEM, 68: 893–900.

TREUDE N., ROSENCRANTZ D., LIESACK W., SCHNELL S. (2003). Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of Myxococcales, FEMS, 44: 261–269.

LIN J., RATERING S., SCHNELL S. (2011). Microbial iron cycle in corrosion material of drinking water pipelines, Ann. Agrar. Sci., 9: 18–25.

KUDO K., YAMAGUCHI N., MAKINO T., OHTSUKA T., KIMURA K., DONG D. T., (2013). Amachi S. Release of arsenic from soil by a novel dissimilatory arsenatereducing bacterium, *Anaeromyxobacter* sp. strain PSR-1, AEM, 79: 4635–4642.

REICHENBACH H. (1999). The ecology of the myxobacteria. Environ. Microbiol., 1: 15–21.

BROCKMAN E. R. (1976). Myxobacters from Arid Mexican Soil, AEM, 32: 642–644.

PROF. J. PATOČKA (2017). Biologicky aktivní metabolity myxobakterií: rhizopodin a deriváty, toxicology article.

- WU Z. H., JIANG D. M., LI P., LI Y. Z. (2005). Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. *Environ. Microbiol.*, 7: 1602–1610.
- MÜHLING M., WOOLVEN J. A., MURRELL J. C., JOINT I. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities, *The ISME Journal*.
- SHIMKETS L. J., DWORKIN M., REICHENBACH H. (2006). The Myxobacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E., editors. *The Prokaryotes*, pp. 31–115.
- DEDYSH S. N., PANKRATOV T. A., BELOVA S. E., KULICHEVSKAYA I. S., LIESACK W. (2005). Phylogenetic Analysis and In Situ Identification of Bacteria Community Composition in an Acidic Sphagnum Peat Bog, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2110–2117.
- WENBO K., ZHANG J., XINXIN LU, YANTIAN MA, XIAOZHEN MOU, LAN WU (2016). Identification of bacterial communities in sediments of Poyang Lake, the largest freshwater lake in China, *Springerplus* 5: 401.
- KAUSHAL S. S., LIKENS G. E., PACE M. L., UTZ R. M., HAQ S., GORMAN J., GRESEA M. (2018). Freshwater salinization syndrome on a continental scale, *PNAS*, 115: 574–583.
- RINGEL S. M., GREENOUGH R. C., ROEMER S., CONNOR D., GUTT A.L., BLAIR B., KANTER G., Strandtmann M. (1977). Ambruticin (W7783), a new antifungal antibiotic, *J. Antibiot*, 30: 371–375.
- RÜCKERT G. (1979). Myxobakterien-Artenspektren von Boden in Abhängigkeit von bodenbildenden Faktoren unter besonderer Berücksichtigung der Bodenreaktion. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd*, 142: 330–343.
- GERTH K., MÜLLER R. (2005). Moderately thermophilic Myxobacteria: Novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ. Microbiol.*, 7: 874–880.

- BROCKMAN E. R., BOYD W. L. (1963). Myxobacteria from soils of the Alaskan and Canadian arctic. *J. Bacteriol.*, 86: 605–606.
- FUDOU R., JOJIMA Y., IIZUKA T., YAMANAKA S. (2002). *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. and *Haliangium tepidum* sp. Nov., A novel slightly halophilic myxobacteria isolated from the coastal salt environment, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 48 : 109–116.
- MCNEIL K. E., SKERMAN V. B. D. (1972). Examination of myxobacteria by scanning electron microscopy. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22:243–250.
- DROZDOWICZ A. (1972). Myxobacterales. *An. Microbiol. (Bras.)* 19: 77–83.
- FINK J. M., ZISSLER J.F., (1989). Characterization of lipopolysaccharide from *Myxococcus xanthus* by use of monoclonal antibodies. *J. Bacteriol.*, 171: 2028–2032.
- COUKE P., VOETS J.P. (1967). The mineral requirement of *Polyangium cellulosum*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 7: 175–182.
- BURCHARD R. P., DWORKIN M. (1966). Light induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*, *J. Bacteriol.*, 91: 535–545
- DWORKIN M. (1973a). Cell-cell interactions in the myxobacteria. *Symp. Gen. Microbiol.*, 23: 125–142.
- LÜNSDORF H., REICHENBACH H. (1989). Ultrastructural details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J. Gen. Microbiol.*, 135: 1633–1641.
- ROSENBERG E., VAKS B., ZUCKERBERG A. (1973). Bactericidal action of an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 4: 507–513.

REICHENBACH H. (1966). Myxococcus spp. (Myxobacteriales): Schwarmentwicklung und Bildung von Protocysten [text with the film EC 778/1965]. Ed. G. Wolf. Göttingen, Encyclopaedia Cinematographica Institut für den wissenschaftlichen Film, Göttingen, Germany, Segment 1: 570–57.

BLACKHART B. D., ZUSMAN D. (1985). “Frizzy” genes of Myxococcus xanthus are involved in control of the frequency of reversal of gliding motility, PNAS, 82: 8767–8771.

WOLGEMUTH C., HOICZYK E., KAISER D., OSTER G. (2002). How myxobacteria glide, Curr. Biol. 12: 369–377.

KAISER D. (2000a). Bacterial motility: How do pili pull? Curr. Biol. 10: R777–R780.

MUÑOZ-DORADO J., FRANCISCO J., MARCOS-TORRES, GARCÍA-BRAVO E., MORALEDA-MUÑOZ A, PÉREZ J. (2016). Myxobacteria: Moving, Killing, Feeding, and Surviving Together, Front Microbiol., 7: 781.

REICHENBACH H. (2001). Myxobacteria, producers of novel bioactive substances, J . Indust, Microbiol., Biotechnol, 27: 149–156.

REICHENBACH H. (1999). The ecology of the myxobacteria. Environ. Microbiol., 1: 15–21.

GERTH K., BEDORF N., HÖFFE G., IRSCHIK H., REICHENBACH H. (1996). Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from Sorangium cellulosum (Myxobacteria), Production, physico-chemical and biological properties, J . Antibiot., 49: 560–563.

BOLLAG D. M ., MCQUENEY P.A., ZHU J., HENSENS O., KOUPAL L., LIESCH J., GOETZ M., LAZARIDES E., WOODS C. M. (1995). Epothilones, a new class of microtubulestabilizing agents with a taxol- like mechanism of action, Cancer Res., 55: 2325–2333.

GERTH K., IRSCHIK H., REICHENBACH H., TROWITZSCH W. (1982). The myxovirescins, a family of antibiotics from Myxococcus virescens (Myxobacteriales), J . Antibiot., 35: 1454–1459.

TROWITZSCH W., WRAY V., GERTH K., HÖFFE G. (1982). Structure of myxovirescin A, a new macrocyclic antibiotic from gliding bacteria, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1340–1342.

TROWITZSCH K. W., SCHOBER K., WRAY V., GERTH K., REICHENBACH H., HÖFFE G. (1989). Zur Konstitution der Myxovirescine B-T und Biogenese des Myxovirescins A. Liebigs Ann. Chem., 345–355.

ONISHI N., IZAKI K., TAKAHASHI H. (1984). A macrocyclic antibiotic M-230B produced by *Myxococcus xanthus*: Isolation and characterization, J. Antibiot., 37: 13–19.

MASSON P. J., GUESPIN-MICHEL J. (1988). An extracellular blood-anticoagulant glycopeptide produced exclusively during vegetative growth by *Myxococcus xanthus* and other myxobacteria is not co-regulated with other extracellular macromolecules, J. Gen. Microbiol, 134: 801–806.

NICAUD J. M., BRETON A., YOUNES G., GUESPIN-MICHEL J. (1984). Mutants of *Myxococcus xanthus* impaired in protein secretion: An approach to study a secretory mechanism, Appl. Microbiol. Biotechnol, 20: 344–350.

GRÄF W. (1975). Myxobakterien der Gattung *Myxococcus* als indirekte Fäkalstoffindikatoren in Oberflächengewässern, Zbl. Bakteriol., 1. Abt. Orig., Reihe B., 160: 28–39.

TRZILOVÁ B., MIKLOSOVICOVÁ L., GOLAIŠOVÁ E., BOBKOVÁ M. (1980). Indikatoren der Verunreinigung des Donauwassers im tschechoslowakischen Abschnitte. Acta Ecologica (Bratislava) 8: 91–102.

TRZILOVÁ B., MIKLOÖOVICOVÁ M., MORHÁCOVÁ G., GOLAIŠOVÁ E. (1981). Die Wasserqualität der Zuflüsse des tschechoslowakischen Donauabschnittes von limnologischer und hygienischer Sicht. Biologia (Bratislava) 36: 765–774.

SINGH B. N. (1947). Myxobacteria in soils and composts: Their distribution, number and lytic action on bacteria. J. Gen. Microbiol., 1: 1–10.

- IRSCHIK H., REICHENBACH H. (1985a). An unusual pattern of carbohydrate utilization in *Coralloccoccus* (*Myxococcus*) *coralloides* (*Myxobacterales*), *Arch. Microbiol.*, 142: 40–44.
- KRZEMIENIEWSKA H., KRZEMIENIEWSKI S. (1927b). Rozsiedlenie miksobakteryj (Über die Verbreitung der Myxobakterien im Boden) [in Polish, with German summary], *Acta Soc. Botan. Polon.*, 5: 102–139.
- BROCKMAN E. R., BOYD W. L. (1963). Myxobacteria from soils of the Alaskan and Canadian arctic, *J. Bacteriol.*, 86: 605–606.
- LAMPKY J. R., BROCKMAN E.R. (1977). Fluorescence of *Myxococcus stipitatus*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27: 161.
- KARWOWSKI J. P., SUNGA G. N., KADAM S., MCALPINE J. B. (1996). A method for the selective isolation of *Myxococcus* directly from soil. *J. Indust. Microbiol.*, 16: 230–236.
- DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K. H., STACKEBRANDT E. (2006) Third Edition, Volume 7: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses, Deeply Rooting Bacteria
- LINK H. F. (1809). Observations in Ordines plantarum naturales. Dissertatio prima, complectens Anandrarum ordines Epiphytas, Mucedines Gastomycos et Fungos, Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin Magazin für die neuesten Entdeckungen in der gesamten Naturkunde 3, 3-42+2 plates
- RÜCKERT G. (1985) Myxobacteria from Antarctic soils, *Biol. Fert. Soil* 1, 215–216.
- ZHANG X., YAO Q., CAI Z., XIE X., ZHU H. (2013). Isolation and identification of myxobacteria from saline-alkaline soils in Xinjiang, China. *PLoS ONE* 8:e70466
- CHAROUSOVÁ I., STEINMETZ H., MEDO J., JAVOREKOVÁ S., WINK J. (2017). Soil myxobacteria as a potential source of polyketide-peptide substances. *Folia Microbiol.* 62 305–315.

MORGAN A. D., CRAIG MACLEAN R., HILLESLAND K. L., VELICER G. J. (2010) Comparative analysis of Myxococcus predation on soil bacteria, *Appl Environ Microb*, 76: 6920–7.

HOOK L. A. (1977). Distribution of Myxobacters in Aquatic Habitats of an Alkaline Bog, *AEM.*, 34: 333–335.