

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Tereza Patrmanová

Geny sekundárního metabolismu v půdních bakteriálních společenstvech
Gene pool of the secondary metabolism in soil bacterial communities

Diplomová práce

Školitel: Ing. Jan Kopecký, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Markéta Marečková, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 1. 2019

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem lidem, bez kterých by tato diplomová práce nevznikla. V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Janu Kopeckému, Ph.D. za vedení práce, připomínky a cenné rady během vypracování této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat své konzultantce RNDr. Markétě Marečkové, Ph.D. za odborné konzultace a čas, který mi věnovala. Za pomoc při práci v laboratoři bych rovněž chtěla poděkovat všem členům týmu Epidemiologie a ekologie mikroorganismů Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Potřeba nových antibiotik a dalších sloučenin s biologickou aktivitou je důvodem zvýšeného zájmu o sekundární metabolity půdních bakterií. V půdním prostředí má dominantní postavení kmen *Actinobacteria*, jehož potenciál spočívá ve schopnosti produkce širokého spektra antibiotik a také přítomnosti řady mechanismů, kterými se působení antibiotik brání.

Cílem této diplomové práce bylo pomocí navržených primerů a primerů převzatých z publikací stanovit počty kopií vybraných genů sekundárního metabolismu v půdách dvou lokalit. Nepodařilo se navrhnout dostatečně účinné nové primery k detekci vybraných genů v půdním prostředí, a proto byly použity pouze již publikované primery, jejichž specifita byla ověřena. Ve vzorcích odebraných z půdních profilů dvou stanovišť byla prostřednictvím digitálního PCR stanovena množství bakterií, aktinobakterií, genů pro polyketid-syntázu typu II a Erm metyltransferázu zprostředkovávající rezistenci k antibiotikům skupiny MLS_B (makrolidy, linkosamidy a streptograminy B). Porovnání stanovených počtů genových kopií přineslo informaci o struktuře bakteriálního společenstva a o zastoupení bakterií nesoucích vybrané geny sekundárního metabolismu v závislosti na změně podmínek vlivem stromového patra a narůstající hloubky půdního profilu.

Množství bakterií a aktinobakterií byla na obou stanovištích nejvyšší v opadovém horizontu, ve spodních horizontech se projevil vliv rozdílných stanovišť. Odlišné půdní vlastnosti měly rovněž vliv na četnost genů pro polyketid-syntázy typu II, převážně ve svrchních vrstvách půdy. V opadovém horizontu bukového stanoviště bylo pozorováno signifikantně nižší množství kopií těchto genů a také jejich nízké zastoupení mezi aktinobakteriemi. Také v četnosti genů pro Erm metyltransferázy se na obou stanovištích vyskytovaly rozdíly mezi jednotlivými půdními horizonty. Na bukovém stanovišti byl na rozdíl od stanoviště smrkového patrný pokles s narůstající hloubkou půdního profilu. Data získaná v této práci ukázala, že typ vegetačního pokryvu, a tím i opadu, na dvou jinak srovnatelných stanovištích určoval četnost bakteriálního společenstva a jeho výbavu geny sekundárního metabolismu.

Klíčová slova: Aktinobakterie, sekundární metabolismus, rezistence

Abstract

The need for new antibiotics and other biologically active compounds is the reason for an increased interest in secondary metabolites of soil bacteria. The phylum *Actinobacteria* has the dominant position in the soil environment thanks to the potential of producing a broad spectrum of antibiotics and the presence of a number of defense mechanisms preventing the effects of antibiotics.

The aim of this thesis was to determine the number of copies of selected secondary metabolic genes in the soils of two sites using designed primers and primers from literature. The design of effective new primers for the detection of selected genes in the soil environment was not achieved in this work, and therefore only primers from literature that had been verified for their specificity were used. In samples taken from soil profiles of two sites, abundances of bacteria, actinobacteria, type II polyketide synthase genes and Erm methyltransferase genes mediating resistance to MLS_B antibiotics (macrolides, lincosamides and streptogramins B) were determined by digital PCR. The comparison of the determined copy numbers gave an information about the structure of the bacterial community and the relative abundance of bacteria carrying selected secondary metabolic genes depending on the soil condition changes due to the forest canopy and the increasing depth of the soil profile.

The amounts of bacteria and actinobacteria reached the highest levels in the litter horizons of both sites, the influence of different site was evident in the lower horizons. Distinct soil properties also affected abundance of type II polyketide synthase genes, mainly in the upper layers of the soil. In the litter horizon of the beech forest, their significantly lower absolute and relative abundances among actinobacteria were observed. Differences in abundances of Erm methyltransferase genes were also observed between soil horizons when comparing both sites. In contrast to the spruce forest, a decrease of their abundance with the depth of soil profile was observed in the beech forest. The data obtained in this work evidenced that type of vegetation cover, and consequently plant litter input, at two otherwise comparable sites determined bacterial community abundance and its secondary metabolic gene pool.

Key words: Actinobacteria, secondary metabolism, resistance

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce.....	11
3	Přehled literatury	12
3.1	Půdní společenstva.....	12
3.1.1	Struktura půdního společenstva.....	12
3.1.2	Aktinobakterie	14
3.2	Sekundární metabolismus	15
3.2.1	Sekundární metabolity půdních bakterií.....	16
3.2.1.1	Aminoglykosidy.....	17
3.2.1.2	Polyketidy	21
3.2.2	Rezistenční mechanismy	25
3.2.2.1	Inaktivace antibiotika.....	27
3.2.2.2	Modifikace zásahového místa.....	31
3.3	Metody detekce a kvantifikace	33
3.3.1	Návrh primerů.....	33
3.3.2	Digitální PCR.....	36
4	Materiál a metody.....	38
4.1	Materiál	38
4.1.1	Chemikálie.....	38
4.1.2	Média a pufry.....	40
4.1.3	Komerční soupravy.....	41
4.1.4	Oligonukleotidy	41
4.1.5	Bakteriální kmeny.....	43
4.1.6	Vektory	44
4.1.7	Popis lokalit	44
4.2	Metody	45
4.2.1	Extrakce environmentální DNA z půdy	45
4.2.2	Extrakce DNA z čistých kultur.....	46
4.2.3	Elektroforéza.....	47
4.2.4	Polymerázová řetězová reakce	48
4.2.5	Navrhování primerů.....	49
4.2.6	Optimalizace podmínek PCR amplifikace.....	50

4.2.7	Klonování.....	52
4.2.8	Koloniová PCR.....	53
4.2.9	Sekvenace a zpracování výsledků.....	54
4.2.10	Real-time PCR.....	54
4.2.11	Digitální PCR.....	55
5	Výsledky.....	58
5.1	Návrh primerů.....	58
5.2	Testování primerů.....	62
5.2.1	Optimalizace podmínek pro primery.....	62
5.2.2	Klonování a koloniová PCR.....	69
5.2.3	Sekvenace a zpracování výsledků.....	69
5.3	Real-time PCR.....	72
5.4	Digitální PCR.....	73
5.4.1	Kvantifikace genů sekundárního metabolismu.....	73
5.4.2	Kvantifikace bakterií a aktinobakterií.....	77
5.4.3	Porovnání bakterií, aktinobakterií a genů sekundárního metabolismu.....	79
6	Diskuze.....	83
7	Souhrn.....	90
8	Seznam použité literatury.....	92

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český překlad
2-DOIS	2-deoxy- <i>scyllo</i> -inosose synthase	2-deoxy- <i>scyllo</i> -inosóza syntáza
AAC	aminoglycoside acetyltransferase	aminoglykosid acetyltransferáza
ACP	acyl carrier protein	protein přenášející acyl
AG	aminoglycoside	aminoglykosid
AME	aminoglycoside modifying enzyme	aminoglykosid modifikující enzym
ANT	aminoglycoside nucleotidyltransferase	aminoglykosid nukleotidyltransferáza
APH	aminoglycoside phosphotransferase	aminoglykosid fosfotransferáza
ARO/CYC	aromatase/cyclase	aromatáza/cykláza
AT	acyltransferase	acyltransferáza
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide	hexadecyltrimetylamoniumbromid
ddPCR	droplet digital polymerase chain reaction	kapková digitální polymerázová řetězová reakce
DH	dehydratase	dehydratáza
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetylsulfoxid
DOI	2-deoxy- <i>scyllo</i> -inosose	2-deoxy- <i>scyllo</i> -inosóza
dPCR	digital polymerase chain reaction	digitální polymerázová řetězová reakce
ER	enoylreductase	enoylreduktáza
GNAT	GCN5-related N-acetyltransferase	GCN5 příbuzná N-acetyltransferáza
GYM	Glucose-Yeast-Malt medium	glukózo-kvasnicovo-sladové médium
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid	kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1- piperazinetansulfonová
IPTG	isopropyl β -D-1- thiogalactopyranoside	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
KR	ketoreductase	ketoreduktáza
KS	ketosynthase	ketosyntáza
LB	Luria-Bertani medium	Luria-Bertani médium
MLS _B	macrolides, lincosamides, streptogramins B	makrolidy, linkosamidy, streptograminy B
NRPS	nonribosomal peptide synthetase	neribozomální peptidová syntetáza
PBP2a	penicillin binding protein 2a	penicilin vazebný protein 2a
PKS	polyketide synthase	polyketid-syntáza

PKSI	type I polyketide synthase	polyketid-syntáza typu I
PKSII	type II polyketide synthase	polyketid-syntáza typu II
PKSIII	type III polyketide synthase	polyketid-syntáza typu III
TAE	Tris-acetate-EDTA	Tris-acetát-EDTA
TE	thioesterase	thioesteráza
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
YEME	Yeast Extract-Malt Extract medium	médium s kvasnicovým a sladovým extraktem

1 Úvod

Půda je heterogenním ekosystémem skládajícím se z organických a minerálních látek, kapalin a plynů. Je také prostředím, které umožňuje život půdních organismů. Všechny přítomné složky vzájemně reagují a ovlivňují tak vlastnosti půdy. Díky různorodým procesům lze v rámci půdního profilu rozlišit jednotlivé horizonty, které se liší fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Reakcí na měnící se podmínky je také změna struktury půdního společenstva, jehož nedílnou součástí jsou bakterie. Množství, aktivita a struktura bakteriálních společenstev je ovlivněna mnoha environmentálními faktory zahrnující obsah organické hmoty, pH, teplotu a vlhkost půdy.

Význam půdních bakteriálních společenstev je nezastupitelný. Bakterie se podílí na koloběhu prvků v půdě, důležitou roli hrají při udržení půdní struktury a díky mutualistickým vztahům jsou rovněž schopné pozitivně ovlivňovat zdraví a růst rostlin. V neposlední řadě jsou půdní bakterie významnými producenty sekundárních metabolitů s různorodou chemickou strukturou a biologickou aktivitou. Mezi producenty sekundárních metabolitů dominují aktinobakterie, které jsou zdrojem zhruba poloviny všech známých biologicky aktivních látek produkovaných mikroorganismy (Bérdy, 2005). Mezi tyto látky se řadí i antibiotika, na jejichž produkci mají rovněž hlavní podíl aktinobakterie. Ty jsou nositeli genových shluků pro biosyntézu aminoglykosidů, makrolidů, tetracyklinů a dalších biologicky významných látek s antibakteriálním účinkem. Předpokladem pro biosyntézu aminoglykosidů je přítomnost genového klastru pro dané antibiotikum. Identifikace genových klastrů byla předmětem několika publikací, jež přispěly k odhalení genů konzervovaných v biosyntetických drahách aminoglykosidů (Kudo & Eguchi, 2009). Těchto genů lze využít jako markerů při vyhledávání producentů a biosyntetických genových shluků aminoglykosidů. Paralelně s geny biosyntézy aminoglykosidů také pravděpodobně probíhala evoluce genů rezistence k těmto antibiotikům kódujících tři skupiny enzymů - acetyltransferázy, fosfotransferázy a nukleotidyltransferázy (Piepersberg *et al.*, 1988; Laskaris *et al.*, 2010). Tyto determinanty jsou často lokalizovány na mobilních genetických elementech, díky čemuž se rezistence k aminoglykosidům může přenášet horizontálním přenosem a rozšiřovat tak půdní rezistom.

Polyketidy jsou velkou skupinou biologicky aktivních sekundárních metabolitů. Biosyntézu základní kostry jejich molekuly katalyzují enzymatické komplexy zvané polyketid-syntázy. Ty se podle struktury enzymatického komplexu dělí do tří skupin. Polyketid-syntázy první třídy (PKSI) se mimo jiné podílejí na syntéze makrolidů, jež se obvykle skládají z 12, 14

nebo 16členného makrocyclického laktonového kruhu a jsou produkovány například druhy *Streptomyces ambofaciens* (spiramycin), *Streptomyces fradiae* (tylosin), *Streptomyces avermitilis* (avermektin) nebo *Saccharopolyspora erythraea* (erythromycin). Aromatické polyketidy jsou většinou produkty polyketid-syntáz druhé (PKSII) nebo třetí třídy (PKSIII). Mezi produkty PKSII se řadí tetracykliny, širokospektrá antibiotika přirozeně syntetizovaná aktinobakteriemi rodu *Streptomyces* - například *S. aureofaciens* (chlortetracyklin) nebo *S. rimosus* (oxytetracyklin) (Dewick, 2009b).

Jedním z mechanismů rezistence vůči makrolidům i tetracyklinům je modifikace cílového místa, jejíž princip je ovšem odlišný. Zatímco odolnost vůči tetracyklinovým antibiotikům je založena na ochraně ribozomu před inhibičními účinky tetracyklinů na proteosyntézu (Trieber *et al.*, 1998), působení makrolidů je zabráněno metylací ribozomální RNA pomocí specifických metyltransferáz (Weisblum, 1995). Producenti antibiotik mají mechanismy rezistence vždy kódované chromozomálně. Determinanty rezistence mohou však být také asociovány s mobilními elementy, a jsou tudíž schopny se šířit v prostředí. Mohou být také lokalizovány společně. Kombinace genů rezistence vůči makrolidům a tetracyklinům byla nalezena na elementu typu Tn916 u izolátů některých klinicky významných bakterií (Spigaglia, 2016). Tento fenomén spolu s dalšími faktory způsobuje rozšiřování antibiotické rezistence, která je po celém světě stále větším problémem.

Kultivace mikroorganismů v laboratoři je základní technikou, díky které lze studovat vlastnosti bakterií. Nicméně pouze malou část bakterií lze studovat za pomoci tradičních kultivačních metod. Odhaduje se, že zhruba 1 % bakterií je možné klasickými metodami kultivovat v *in vitro* podmínkách (Pham & Kim, 2012). Tento fakt zkresluje představy o skutečné diverzitě bakterií v půdě, a proto je dnes pro zkoumání nekultivovatelné části bakterií důležité využívat techniky nezávislé na kultivaci. Slibným nástrojem se v posledních letech stala metagenomika a práce s genetickým materiálem. Detekce genů je umožněna díky polymerázové řetězové reakci za pomoci specifických primerů, identifikovat je lze pak na základě sekvenování. Význam má také kvantifikace genů, pro kterou je standardem technika real-time PCR. Alternativou k real-time PCR se v 90. letech stala metoda digitálního PCR. Principem této metody je rozdělení reakční směsi do kompartmentů, ve kterých probíhají amplifikace nezávisle na sobě (Vogelstein & Kinzler, 1999). Díky citlivosti této techniky je digitální PCR stále častěji aplikováno ve výzkumu.

2 Cíle práce

1. Navrhnout primery pro vybrané geny sekundárního metabolismu, optimalizovat podmínky amplifikace z chromozomální DNA sbírkových kmenů a poté z environmentální DNA.
2. V případě správné funkce navržených primerů je použít ke kvantifikaci genů sekundárního metabolismu ve vybrané lokalitě.
3. Ve vybrané lokalitě dále kvantifikovat bakterie, aktinobakterie a další geny sekundárního metabolismu za pomoci primerů převzatých z publikací.
4. Porovnat množství bakterií a aktinobakterií s danými geny sekundárního metabolismu a sledovat, zda je jejich abundance ovlivněna převažujícím typem opadu vyplývajícím ze složení stromového patra, a jak se mění v rámci půdního profilu.

3 Přehled literatury

3.1 Půdní společenstva

Půda je důležitou součástí terestrických ekosystémů. Skládá se z živých a neživých složek, které spolu interagují a vyvíjejí se v čase i prostoru. Živou složku tvoří společenstva, tedy seskupení jednoho či více druhů organismů osidlující stejnou geografickou oblast. Počty druhů půdních mikroorganismů zahrnujících bakterie, houby a řasy výrazně dominují nad makroorganismy a jejich diverzita je rozmanitá. Druhově nejbohatší skupinou jsou bakterie, jediný gram půdy může na některých lokalitách osidlovat více než 50 000 bakteriálních druhů (Roesch *et al.*, 2007).

Bakteriální společenstva jsou základní složkou půdního prostředí. Jejich heterogenita je ovlivněna vlastnostmi půdy. Bakterie se mohou nacházet v půdních pórech, mohou být také asociované s půdními částicemi nebo vyššími organismy, například kořeny rostlin. Jsou rovněž součástí půdních agregátů, jejichž tvorby a stabilizace se účastní díky produkci extracelulárních polysacharidů (Tisdall, 1994). Schopnost osidlovat různorodá půdní prostředí je také důvodem jejich četnosti, jeden gram půdy může obsahovat až 10^{10} bakterií (Torsvik *et al.*, 1990).

Změna složení půdních společenstev může mít negativní vliv na funkci ekosystému. Snížení množství mikroorganismů a diverzity půdních společenstev (převážně hub, bakterií a hlístic) má za následek pokles rostlinné diverzity a omezení půdních procesů, například rozkladu opadu nebo koloběhu živin (Wagg *et al.*, 2014). Udržování půdní biodiverzity je tedy základem správné činnosti terestrických ekosystémů.

3.1.1 Struktura půdního společenstva

Zkoumání struktury půdního společenstva je jedním ze základních kroků při studiu funkce půdních ekosystémů. Zatímco biogeografie rostlin a živočichů je obecně známa a je většinou limitována vlastnostmi klimatu a prostředí, distribuce mikroorganismů v půdě je zatím méně prozkoumána. Ve 30. let 20. století Lourens Baas Becking formuloval ve své knize větu „Everything is everywhere, but environment selects“, která byla považována za všeobecně uznávanou teorii objasňující distribuci mikroorganismů (De Wit & Bouvier, 2006). Novější studie ovšem hypotézu předpokládající růst bakterií kdekoli, kde jim to podmínky umožní, vyvrací a zdůrazňují, že mikrobiogeografie je mnohem komplexnější a stejně jako u rostlin a živočichů se rozšíření bakterií řídí určitým biogeografickým vzorcem (Fierer & Jackson, 2006;

Wawrik *et al.*, 2007). Nové poznatky tak mění původní představy o kosmopolitním rozšíření některých bakterií.

Vertikální a horizontální distribuce půdního společenstva se mění v čase i prostoru a je ovlivněna biotickými i abiotickými faktory. Vertikální distribuce mikroorganismů rozhoduje o jejich aktivitě, množství a také složení. Fierer a kol. (2003) zjistili, že zhruba 65 % mikrobiální biomasy svrchních dvou metrů půdy se nachází v hloubce do 25 cm pod povrchem. Kromě četnosti mikroorganismů se také měnilo jejich složení. Zatímco gramnegativní bakterie, houby a prvoci osidlovaly spíše povrchové vrstvy, grampozitivní bakterie včetně aktinobakterií převládaly ve spodních vrstvách půdy. Autoři dospěli k názoru, že hlavním faktorem určujícím vertikální distribuci mikroorganismů je dostupnost zdroje uhlíku.

Půdní pH je jedním z nejdůležitějších faktorů určujících složení mikrobiálního společenstva. Bylo prokázáno, že podle hodnoty pH lze do určité míry odhadnout strukturu bakteriálního společenstva nezávisle na jejich geografické lokalizaci (Lauber *et al.*, 2009; Fierer & Jackson, 2006). Vliv půdního pH na společenstva bakterií a hub je odlišný. Zatímco diverzita obou společenstev s narůstající hodnotou pH stoupá, množství bakterií pozitivně koreluje s hodnotou pH (Rousk *et al.*, 2010). Neutrální a mírně zásadité půdy tedy příznivě ovlivňují růst bakterií, kyselé půdy naopak zvyšují početnost hub (Rousk *et al.*, 2009). Vysvětlením mohou být různá fyziologická omezení bakterií a hub, příčinou ale také může být snížená kompetice z důvodu potlačení růstu bakterií při nízkém pH ve prospěch hub.

Teplota půdy ovlivňuje nejen mikrobiální aktivitu, ale také strukturu půdního společenstva. Při vyšších teplotách je nárůst bakterií ve srovnání s houbami výraznější, nízké teploty jsou příznivější pro růst hub (Pietikäinen *et al.*, 2005). Ve vyšších nadmořských výškách to má za následek sezónní změny mikrobiální biomasy a posun poměru půdního společenstva ve prospěch hub během zimního období (Ley & Schmidt, 2002; Lipson *et al.*, 2002). Schopnost adaptace při dlouhodobém vystavení odlišné teplotě může ovšem být důvodem k dalším změnám složení společenstva.

Mezi hlavní environmentální faktory, které se podílí na utváření společenstev, se řadí i půdní vlhkost spolu s množstvím organické hmoty v půdě (Brockett *et al.*, 2012; Ságová-Marečková *et al.*, 2015a). Houby jsou obecně tolerantnější k vysušení, a proto v suchých půdách převažují spolu s gramnegativními bakteriemi právě houby, půdám obsahující více vody dominují grampozitivní bakterie (Drenovsky *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). Nižší koncentrace kyslíku je také důvodem častého výskytu anaerobních bakterií v zaplavených půdách.

V neposlední řadě je distribuce půdních organismů ovlivněna antropogenními disturbancemi, přičemž půdy narušené lidskými aktivitami často vykazují vyšší podíl grampozitivních bakterií (Drenovsky *et al.*, 2014).

3.1.2 Aktinobakterie

Aktinobakterie jsou skupinou grampozitivních bakterií, jednou z největších domény *Bacteria*. Většina zástupců má vysoké procentuální zastoupení guanin-cytosinových bází ve své DNA (až 75 %), existují ovšem výjimky zahrnující sladkovodní aktinobakterie, u kterých se podíl GC párů pohybuje okolo 40 % (Ghai *et al.*, 2012). Osidlují terestrické i vodní ekosystémy, některé druhy byly izolovány z extrémních prostředí - patří sem druhy adaptované na vysokou nebo nízkou teplotu, široké rozpětí pH, vyšší koncentraci solí či nedostatek živin nebo vlhkosti (Zenova *et al.*, 2011). Nejčastěji jsou aktinobakterie izolovány z půdy, kde jejich populace někdy převyšují 1 milion buněk na gram půdy, z nichž je převažující skupinou rod *Streptomyces* (Goodfellow & Williams, 1983). Přestože jsou půdní aktinobakterie většinou mezofilní a jejich růst je maximální v neutrálních půdách při teplotě 25-30 °C, řada zástupců osidluje rozmanité habitáty zahrnující nejsušší nepolární poušť světa Atacama (Goodfellow *et al.*, 2017), půdu tropického pásma Jižní Ameriky (Semêdo *et al.*, 2001) nebo permafrost Antarktidy (Goordial *et al.*, 2015).

Kromě řady fyziologických přizpůsobení je pro aktinobakterie charakteristické široké spektrum morfologických znaků. Buňky mohou být kokovité nebo tyčinkovitě-kokovité, mohou být také vláknité a tvořit hyfy nebo větvená mycelia připomínající mycelia hub (Atlas, 1997). Mezi jejich důležitý znak se řadí také schopnost sporulace a produkce pigmentů. Často se jedná o volně žijící bakterie, mohou ale také interagovat s rostlinami či živočichy. Vztahy mezi aktinobakteriemi a vyššími organismy bývají mutualistické (např. mezi rostlinami a fixátory dusíku rodu *Frankia*), výjimkou nejsou ani zástupci kolonizující gastrointestinální trakt živočichů a člověka (*Bifidobacterium*) nebo parazité (*Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* či *Propionibacterium*) (Ventura *et al.*, 2007).

V půdním prostředí jsou aktinobakterie důležitou součástí bakteriálních společenstev. Jejich význam spočívá v účasti na degradaci organického materiálu. Díky produkci extracelulárních enzymů jsou schopny rozkládat organické sloučeniny, například celulózu, chitin nebo lignin (Crawford *et al.*, 1983; Das *et al.*, 2014; Jha *et al.*, 2016) a mají tedy v půdním prostředí klíčovou roli v koloběhu uhlíku. Obsah organické hmoty, spolu s pH, teplotou,

vlhkostí, salinitou a vegetací, jsou důležitými environmentálními faktory rozhodujícími o množství a diverzitě aktinobakterií v půdě (McCarthy & Williams, 1992).

Schopnost produkce mnoha enzymů a biologicky aktivních látek je důvodem zvýšeného zájmu o tuto skupinu bakterií v mnoha odvětvích průmyslu. Produkty aktinobakterií jsou často využívány v zemědělství, potravinářství, textilním či papírenském průmyslu a díky tvorbě antimikrobiálních a dalších prospěšných látek nacházejí uplatnění v medicíně a farmaceutickém průmyslu. Perspektiva některých zástupců spočívá také v schopnosti degradace různých typů polutantů, což z nich dělá vhodné kandidáty aplikovatelné při bioremediaci (Amoroso *et al.*, 2013).

3.2 Sekundární metabolismus

Jako sekundární metabolity jsou označovány látky, které se u svých producentů nepodílí na udržování základních životních funkcí, mohou však zvyšovat jejich odolnost a být tak klíčové pro jejich přežití. Z chemického hlediska je pro ně typická jejich variabilita, v některých případech se jedná o sloučeniny s unikátní strukturou. Syntézy sekundárních metabolitů se účastní enzymy primárního metabolismu, někdy mohou mít producenti specializované enzymy, které se uplatňují pouze u sekundárního metabolismu. Sekundární metabolity jsou produkovány bakteriemi, houbami, rostliny i živočichy. U mikroorganismů se obvykle tvoří v pozdní fázi růstu (Ruiz *et al.*, 2010). Ačkoliv funkce velké části sekundárních metabolitů nebyla dosud objevena, mnoho z nich díky svým antibakteriálním, antifungálním, antivirovým, antiparazitickým, antitumorovým, imunosupresivním a neuroprotektivním účinkům našlo využití v klinické praxi (Solecka *et al.*, 2012).

Sekundární metabolismus mikroorganismů je velmi bohatý. Dosud bylo objeveno více než 22 000 biologicky aktivních sekundárních metabolitů mikrobiálního původu, z nichž necelá polovina je produkována aktinobakteriemi (Bérdy, 2005). Zvláštní postavení má v tomto ohledu rod *Streptomyces*, u kterého byla prokázána tvorba více než 7 600 biologicky aktivních metabolitů, tedy zhruba 75 % produktů všech aktinobakterií. Z tohoto množství má přes 6500 látek antibiotický účinek, což z rodu *Streptomyces* dělá dominantní skupinu producentů antibiotik a dalších biologicky aktivních sloučenin. Odhaduje se, že může být producentem více než 150 000 antimikrobiálních látek (Watve *et al.*, 2001).

3.2.1 Sekundární metabolity půdních bakterií

Půdní prostředí je obýváno mnoha mikroorganismy s velkými genomy obsahující vysoké počty genových shluků, což je důvodem značného množství a rozmanitosti sekundárních metabolitů popsaných u kmenů izolovaných z půdy. Ekologická role velké části metabolitů není známa. Bylo však zjištěno, že některé z nich se uplatňují v obraně a mohou také fungovat jako nástroje mezibuněčné komunikace. V půdním prostředí nejsou antibiotika pouze prostředkem konkurenčního boje, mohou se také chovat jako signální molekuly. Bylo prokázáno, že u bakterií vystavených subinhibiční koncentraci antibiotika může docházet k stimulaci či naopak inhibici jejich genové exprese (Goh *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2006).

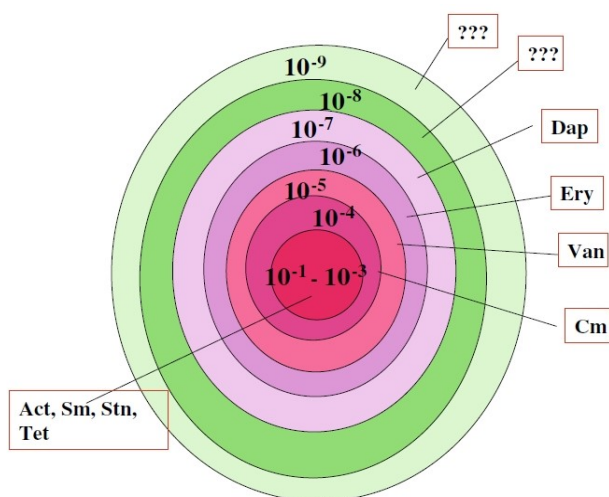
Změny v evoluci genů a genových klastrů sekundárních metabolitů jsou jedním z důvodů jejich vysoké diverzity. Procesy podílející se na genetické variabilitě zahrnují horizontální přenos genetické informace, bodové mutace, genové duplikace a delece, homologní rekombinace a transpozice (Baltz, 2008). Rozmanitost sekundárního metabolismu je často studována u neribozomálních peptidů a polyketidů, jejichž syntézy se účastní neribozomální peptidové syntetázy (NRPS) a polyketid-syntázy (PKS). Charlop-Powers a kol. (2015) odebrali půdní vzorky z pěti kontinentů a několika oceánských ostrovů a porovnali sekvence genů kódující konzervované domény NRPS a PKS. Došli k závěru, že v globálním měřítku jsou typ biomu a geografická vzdálenost mezi odebranými vzorky hlavními faktory určujícími diverzitu těchto enzymů. Typ půdy je rovněž indikátorem diverzity domén, ze kterých se enzymy podílející se na syntéze neribozomálních peptidů a polyketidů skládají. Zatímco aridní půdy vykazují obecně vyšší diverzitu, v sedimentech brakických vod a kyselých půdách borových lesů je jejich rozmanitost nejnižší (Charlop-Powers *et al.*, 2014). Ukázalo se také, že variabilita genů sekundárního metabolismu v různých typech půd souvisí s diverzitou bakteriálních společenstev. Půdy s největší bohatostí sekvencí pro NRPS a PKS obsahovaly vyšší zastoupení aktinobakterií, pro které je charakteristická produkce širokého spektra sekundárních metabolitů.

Tradiční postupy založené na kultivaci izolovaných bakterií jsou z důvodu nekultivovatelnosti většiny půdních bakterií málo účinné. Sekvenování genomů půdních aktinobakterií umožnilo objev dosud neznámých sekundárních metabolitů a zvýšilo tedy jejich význam mezi producenty biologicky aktivních látek. Analýza genomu půdní aktinobakterie *Streptomyces avermitilis* odhalila 38 různých genových klastrů sekundárních metabolitů, z nichž 8 se účastní syntézy neribozomálních peptidů a 13 syntézy polyketidů (Ikeda *et al.*,

2014). Genomická studie také vedla k odhalení kryptických genových klastrů některých sekundárních metabolitů, jejichž exprese je v laboratorních podmínkách omezena.

3.2.1.1 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy (AG) jsou významnou skupinou širokospektrých antibiotik nacházející uplatnění při léčbě infekcí způsobených převážně gramnegativními, ale také grampozitivními bakteriemi. Jedná se ve většině případů o produkty aktinobakterií rodu *Streptomyces* a *Micromonospora*, případně jejich semisyntetické deriváty. Prvním popsaným aminoglykosidovým antibiotikem byl v roce 1943 streptomycin izolovaný z půdní bakterie *Streptomyces griseus*. Tento aminoglykosid je v půdě velmi hojný, přibližně každá stá aktinobakterie izolovaná z půdy je producentem streptomycinu (viz obr. 1). K pacientům se dostal v roce 1947 a stal se tak průlomem v léčbě tuberkulózy (Yoshioka, 1998). Od té doby našly v klinické praxi uplatnění další AG s širším spektrem účinků než má streptomycin, jejich používání je však z důvodu ototoxicity a nefrotoxicity regulováno. Řadí se mezi ně například gentamicin, tobramycin a dále semisyntetické aminoglykosidy amikacin, netilmicin, isepamicin, dibekacin a arbekacin (Vakulenko & Mobashery, 2003).

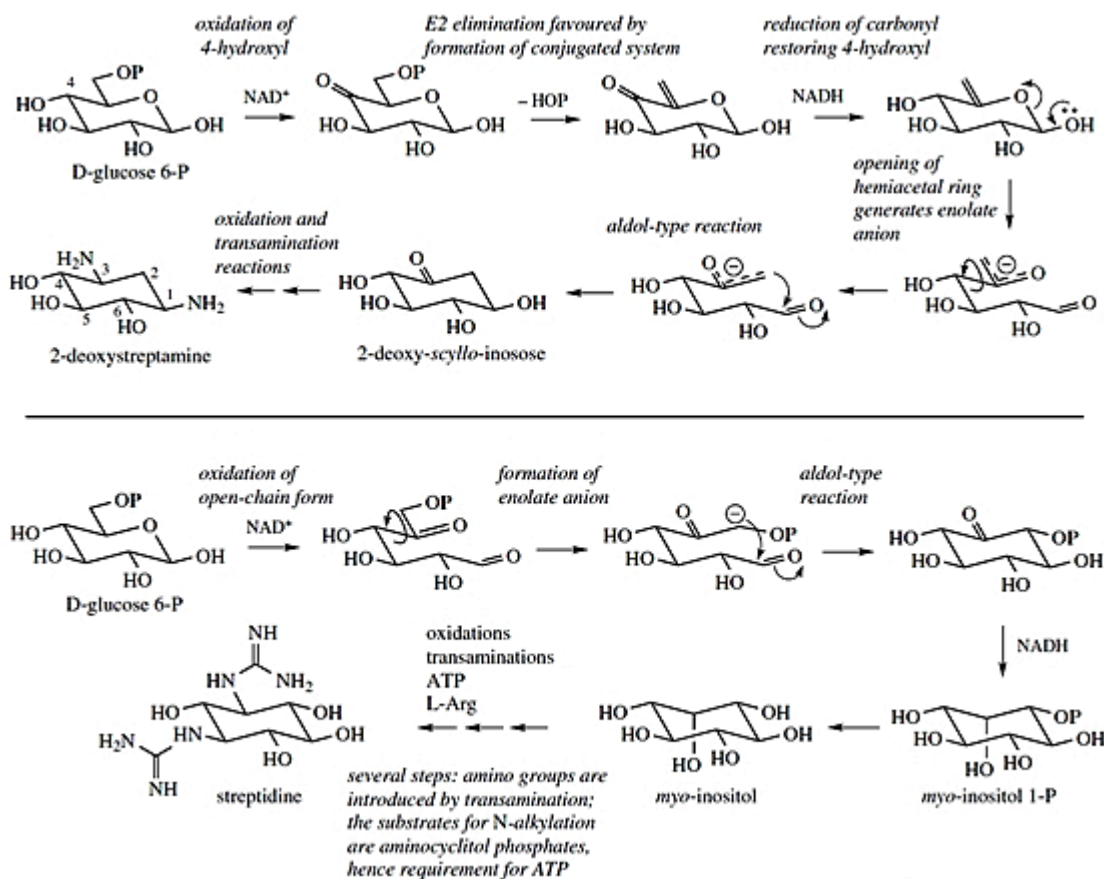


Obr. 1: Objev vybraných antibiotik u aktinobakterií. Vnitřní červený kruh představuje množství aktinobakterií přítomných v půdě ve frekvenci 10^{-1} až 10^{-3} . Se vzdáleností kruhů se množství o jeden řád snižuje. Jednotlivé zkratky označují antibiotika náhodně objevená u půdních aktinobakterií (Act – aktinomycin, Sm – streptomycin, Stn – streptothricin, Tet – tetracyklin, Cm – chloramfenikol, Van – vankomycin, Ery – erythromycin, Dap – daptomycin) (převzato a upraveno z Baltz, 2006).

Mechanismus účinku aminoglykosidů spočívá v inhibici proteosyntézy cílové bakterie vazbou na 30S ribozomální podjednotku. Pozitivní náboj aminoglykosidů jim umožňuje vazbu na záporně nabitou cukr-fosfátovou kostru 16S rRNA, která je součástí 30S ribozomální podjednotky (Zaman & Michiels, 2006). Aminoglykosidy narušují iniciaci translace inhibicí iniciačního komplexu, případně zabraňují elongaci inhibicí translokace peptidyl-tRNA z A-místa do P-místa ribozomu (Dewick, 2009a). Častým mechanismem účinku aminoglykosidů je také chybné přečtení (misreading) genetického kódu. Syntéza membránových proteinů s nesprávnou aminokyselinovou sekvencí mění membránovou permeabilitu, což umožňuje další průnik antibiotika do buňky. U neomycinu a paromomycinu byl také prokázán negativní účinek na skládání 30S ribozomální podjednotky (Mehta & Champney, 2002). Inhibice proteosyntézy je důvodem baktericidního účinku aminoglykosidů.

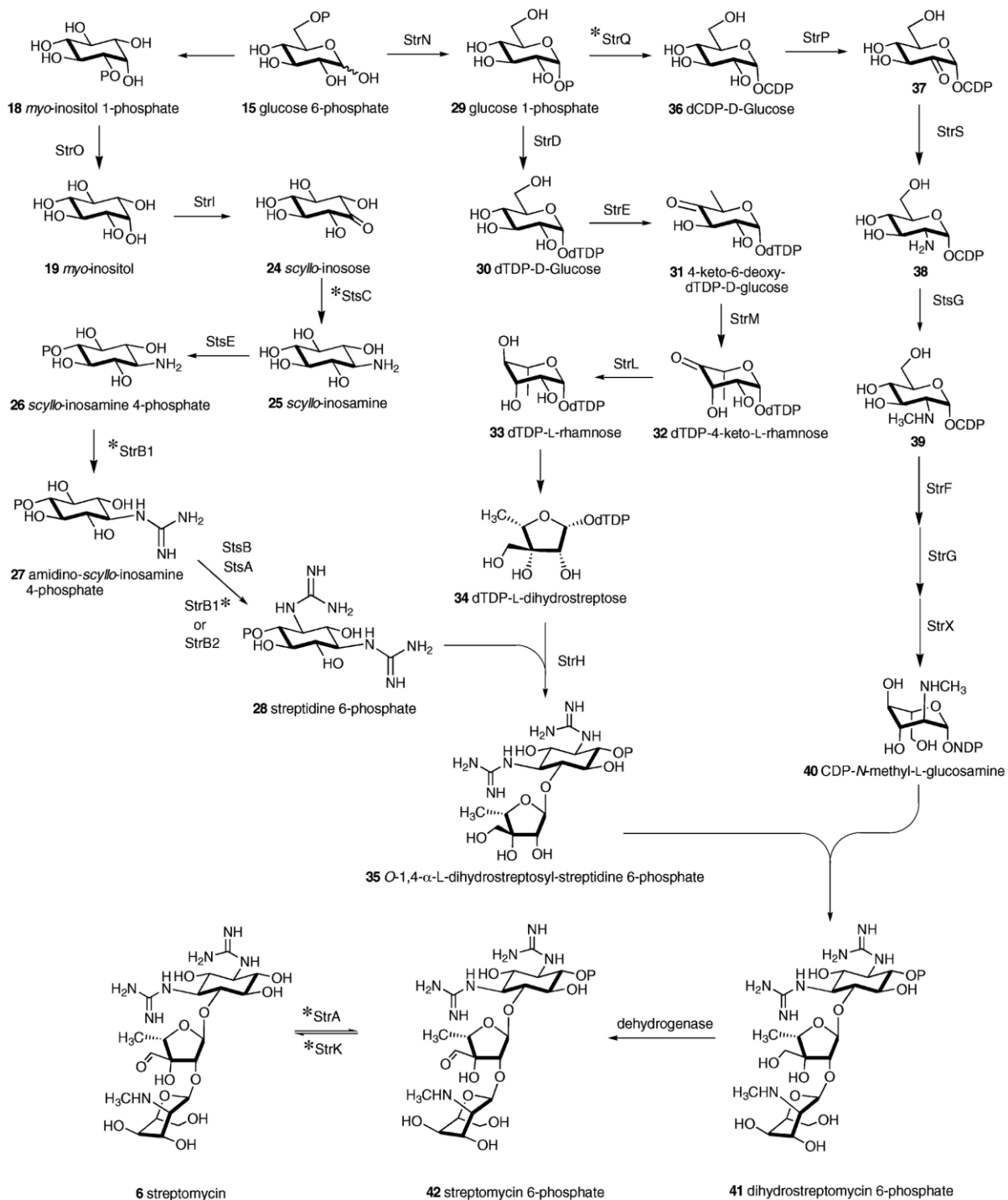
Jádrem chemické struktury aminoglykosidových antibiotik je aminocyklitolový kruh, ke kterému jsou glykosidickou vazbou připojeny různé aminocukry (dva a více). Aminocyklitolovým kruhem může být streptamin, ovšem u většiny klinicky významných aminoglykosidů jím je 2-deoxystreptamin, který se podle pozice glykosidické vazby dělí na 4,5-disubstituovaný (např. neomycin a paromomycin) a 4,6-disubstituovaný (např. gentamicin, tobramycin, amikacin a netilmicin) (Shakil *et al.*, 2008). Základem streptomycinu je streptidin, derivát streptaminu s dvěma navázanými guanidinovými skupinami.

Biosyntéza hlavních typů aminoglykosidů se dělí podle původu aminocyklitolového kruhu na dráhu vycházející z 2-deoxy-*scyllo*-inosózy (DOI) a *myo*-inositolu (viz obr. 2). Klíčovým enzymem prvního typu dráhy je 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntáza účastnící se přeměny glukóza-6-fosfátu na 2-deoxy-*scyllo*-inosózu. Tvorba DOI je proces zahrnující několik kroků, od oxidace glukóza-6-fosfátu na pozici C4 a následné eliminace fosfátové skupiny za tvorby enolátového intermediátu, přes redukci na pozici C4, otevření hemiacetalového kruhu až po aldolovou kondenzaci, která je konečnou reakcí DOI syntázy (Kudo *et al.*, 1999). Konverze DOI na 2-deoxy-*scyllo*-inosamin je poté zprostředkována L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázou (Tamegai *et al.*, 2002a). Dehydrogenace 2-deoxy-*scyllo*-inosaminu a další kolo transaminace, které je opět katalyzováno L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázou, jsou posledními kroky syntézy 2-deoxystreptaminu (Kudo *et al.*, 2005; Yokoyama *et al.*, 2005). Velké množství aminoglykosidů tvořených 2-deoxystreptaminem je dáno napojením aminocukrů s rozmanitými chemickými strukturami.



Obr. 2: Biosyntéza dvou typů aminocyklitolových kruhů aminoglykosidů (převzato a upraveno z Dewick, 2009a)

Prekurzorem aminocyklitolu streptomycinu, spectinomycinu, fortimycinu, kasugamycinu, hygromycinu A a dalších aminoglykosidů je *myo*-inositol (Flatt & Mahmud, 2007). Přeměna glukóza-6-fosfátu je také prvním krokem tohoto typu biosyntetické dráhy, je ovšem *myo*-inositol-1-fosfát syntázou konvertována na *myo*-inositol-1-fosfát a následnou defosforylací na *myo*-inositol. Nejdůležitější zástupce této skupiny je streptomycin, jehož syntéza dále pokračuje oxidací *myo*-inositolu a poté transaminační reakcí, která je katalyzována L-glutamine:2-deoxy-scyllo-inosóza aminotransferázou kódovanou genem *stsC* (Ahlert *et al.*, 1997). Fosforylace *scyllo*-inosaminu a napojení amidinové skupiny dává vznik amidino-*scyllo*-inosamin-4-fosfátu. V konečné fázi dochází k další oxidaci, transaminaci a přenosu amidinové skupiny, následkem čehož dochází k tvorbě streptidin-6-fosfátu (Flatt & Mahmud, 2007). Výchozí sloučeninou aminocukrů L-streptózy a N-metyl-L-glukosaminu, které se glykosidicky vážou na streptidin-6-fosfát, je rovněž glukóza-6-fosfát (Dewick, 2009a). Celá dráha biosyntézy streptomycinu je znázorněna na obrázku 3.



Obř. 3: Biosyntéza streptomycinu. Uvedenými zkratkami byly pojmenovány enzymy u *Streptomyces griseus* a *Streptomyces griseus*. Enzymy označené * byly popsány na biochemické úrovni (převzato z Flatt & Mahmud, 2007).

Charakterizace biosyntetických genových klastrů aminoglykosidů poskytla cenné informace o funkci mnoha proteinů, umožnila ale také odhalit geny, které jsou v rámci těchto klastrů konzervovány. Součástí biosyntetického klastru streptomycinu je gen *stsC* kódující L-glutamine:2-deoxy-scyllo-inosóza aminotransferázu. Bylo prokázáno, že tento gen má také své

homology u producentů aminoglykosidů obsahující 2-deoxystreptamin a je specifický pro biosyntézu všech typů aminoglykosidů (Tamegai, *et al.*, 2002a). Homologní gen byl také nalezen v genovém klastru butirosinu, aminoglykosidového antibiotika, jehož producentem je *Bacillus circulans* (Tamegai *et al.*, 2002b). Fylogenetická analýza homologních genů z půdní DNA odhalila odlišnosti v diverzitě těchto genů a zároveň podobnost některých z nich v rámci všech lokalit, což naznačuje horizontální přenos v půdě (Nagaya *et al.*, 2005). Větší diverzita tohoto typu aminotransferázy byla identifikována i u DNA izolované z hlubokomořského sedimentu Tichého oceánu (Aoki *et al.*, 2008). Některé z genů vykazovaly sekvenční podobnost s aminotransferázami z půdní DNA, ukázalo se však, že mnoho z nich je specifických právě pro hlubokomořský ekosystém, který tak může být zdrojem unikátních typů aminoglykosidů a jejich producentů.

V biosyntéze 2-deoxystreptaminu je důležitým krokem konverze glukóza-6-fosfátu na 2-deoxy-*scyllo*-inosózu, která je katalyzována 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntázou. Tento enzym je u producenta butirosinu kódován genem *btrC*, jehož homology byly nalezeny v genových klastrech producentů aminoglykosidů obsahujících 2-deoxystreptamin (Kudo *et al.*, 1999). Ačkoliv je *Bacillus circulans* zatím jediným popsáním zástupcem, který nepatří do skupiny aktinobakterií a zároveň je producentem aminoglykosidového antibiotika, Tamegai a kol. (2006) zjistili, že s největší pravděpodobností nebyli zatím někteří producenti aminoglykosidů identifikováni. Dokládá to zjištění, že homologní geny pro 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntázu z půdních vzorků se fylogeneticky rozdělují do dvou skupin, z nichž minoritní skupina pochází z aktinobakterií. Není vyloučené, že aminoglykosidy tvořené 2-deoxystreptaminem z dosud neznámých producentů mohou mít unikátní strukturu.

3.2.1.2 Polyketidy

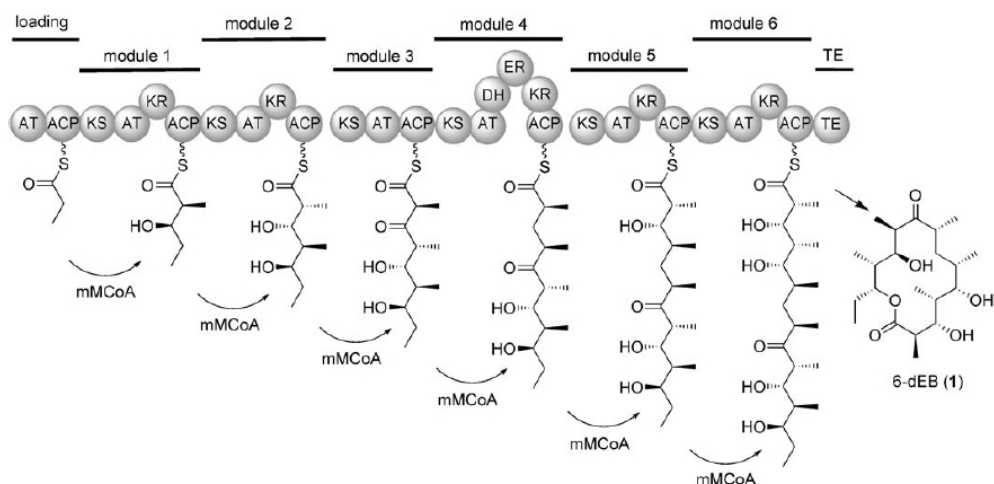
Polyketidy jsou velkou skupinou sekundárních metabolitů s rozmanitou chemickou strukturou. Jejich význam nespočívá pouze ve strukturní variabilitě, jedná se rovněž o látky s různorodou biologickou aktivitou. Vykazují antibakteriální, antifungální, antiparazitické, protinádorové i imunosupresivní účinky, a jsou proto často využívány v humánní a veterinární medicíně. Produkce polyketidů je typická pro bakterie a houby, byla ale také popsána u vyšších rostlin, protistů a dokonce i u některých živočichů (Castoe *et al.*, 2007). Jejich ekologická role není přesně známa, předpokládá se však, že mají funkci v komunikaci, virulenci a obraně před jinými organismy.

Biosyntéza polyketidů je komplexní proces podobný syntéze mastných kyselin. Jejich společným znakem je prodlužování řetězce prostřednictvím postupných dekarboxylativních kondenzací. Odlišností je spektrum používaných substrátů. Startovací jednotkou při produkci polyketidů může být stejně jako u syntézy mastných kyselin acetyl-CoA, může být ovšem používán butyryl-CoA, propionyl-CoA či jiné sloučeniny. Při elongaci polyketidového řetězce bývá prodlužovací jednotkou kromě malonyl-CoA také například metylmalonyl-CoA nebo etylmalonyl-CoA. Diverzita polyketidů není dána pouze pestrou škálou stavebních bloků a délek finálního produktu, důvodem jsou i úpravy intermediátu. Zatímco při syntéze mastných kyselin dochází vždy po každém cyklu kondenzace k modifikaci β -ketoskupiny ve třech reakcích (ketoredukce, dehydratace a enoyl-redukce), v případě biosyntézy polyketidů mohou být tyto úpravy částečně nebo úplně vynechány (Hertweck, 2009).

Enzymatické systémy katalyzující reakce vedoucí k tvorbě mastných kyselin v živých organismech se nazývají syntázy mastných kyselin. U biosyntézy polyketidů jsou těmito systémy polyketid-syntázy. Do dnešní doby byly popsány 3 třídy polyketid-syntáz označované římskými číslicemi I až III. Polyketid-syntázy typu I (PKSI) jsou velké multifunkční proteiny obsahující domény zajišťující všechny katalytické funkce nutné pro syntézu. Domény jsou organizovány do modulů, přičemž každý modul je zodpovědný za jeden krok elongace ve struktuře polyketidu. Naproti tomu polyketid-syntázy typu II (PKSII) tvoří komplexy samostatných monofunkčních proteinů. Společným znakem obou typů PKS je využívání acyl carrier proteinu (ACP) k vazbě polyketidových intermediátů. Nezávisle na ACP funguje třetí typ polyketid-syntáz. PKSIII skládající se z homodimerických proteinů přímo využívá acyl-CoA jako substrát pro syntézu polyketidu (Dewick, 2009b).

Jako polyketid-syntázy typu I jsou označovány multidoménové proteiny s katalytickými funkcemi zajišťujícími výběr, spojení a úpravy stavebních jednotek. Existují 3 základní domény, které dohromady tvoří jádro každého modulu – acyltransferáza (AT), ketosyntáza (KS) a acyl carrier protein (ACP). AT doména rozeznává a aktivuje substráty, které se poté připojují na thiolovou skupinu fosfopanteteinového raménka ACP domény. KS doména následně katalyzuje dekarboxylativní kondenzaci mezi substrátem vázaným na ACP a nascentním řetězcem. Tyto 3 domény jsou nezbytné pro syntézu polyketidu, moduly mohou být ale také doplněné o další domény, které před dalším kolem elongace mění oxidační stav β -ketoskupiny metabolitu – ketoreduktázu (KR), dehydratázu (DH) a enoylreduktázu (ER) (Chan *et al.*, 2009). Thioesterázová doména (TE) následně zakončuje syntézu uvolněním polyketidu.

Podle strategie využívání jednotlivých modulů se PKSI dělí na iterativní a modulární. Iterativní PKS syntetizují polyketidy prostřednictvím sady domén, která je používána opakovaně. Tento typ se uplatňuje převážně při produkci polyketidů vyskytujících se u hub, například lovastatinu (Ma & Tang, 2007). Typická je pro ně schopnost různého stupně modifikace β -ketoskupiny, a proto tyto polyketid-syntázy bývají dále členěny na nereduční, částečně reduční a vysoce reduční (Hertweck, 2009). Modulární PKS jsou systémy skládající se z několika modulů, jejichž počet většinou odpovídá množství inkorporovaných prekurzorů a do určité míry lze ze sekvence genů předpovědět výslednou podobu polyketidového řetězce. Tento mechanismus byl objeven u mnoha bakteriálních PKS účastnících se mimo jiné syntézy erytromycinu (Donadio *et al.*, 1991) nebo avermektinu (Ikeda *et al.*, 1999). Jedním z nejvíce studovaných typů modulární PKS je deoxyerytronolid syntáza podílející se na tvorbě 6-deoxyerytronolidu B, makrocyclického jádra erythromycinu. Organizace jednotlivých modulů této syntázy je znázorněna na obrázku 4.



Obr. 4: Deoxyerytronolid B syntáza, modulární PKSI nezbytná pro biosyntézu makrolidového antibiotika erythromycinu (převzato z Hertweck, 2009).

Bakteriální typ PKSI byl všeobecně považován za systém s pravidelnou modulární organizací, který koreluje se strukturou výsledné sloučeniny. Přelomem byly nové poznatky o syntéze polyketidů v posledních letech, které změnily dosavadní paradigma. Důkazy o přeskokování nebo opakovaném používání celých modulů u bakteriálních PKS jsou jen několika ukázkovými příklady, které změnily pohled na syntézu polyketidů u bakterií (Hong *et al.*, 2016).

Polyketid-syntázy typu II jsou definovány jako komplexy monofunkčních polypeptidů, pro které je charakteristické iterativní působení enzymatických aktivit. Stejně jako PKSI

disponují ACP doménou vázající polyketidový řetězec, od prvního typu syntáz je však odlišuje přítomnost dvou ketoreduktáz, KS_{α} a KS_{β} . Jejich enzymatické aktivity jsou různé, zatímco KS_{α} (stejně jako doména KS u PKS I) katalyzuje kondenzaci, funkcí KS_{β} je kontrola délky rostoucího produktu. ACP a obě jednotky KS jsou základem každé PKS II a tvoří tzv. minimální PKS (Chan *et al.*, 2009). Do syntézy se mohou zapojit další mono- nebo bifunkční enzymy, například ketoreduktáza (KR) a aromatáza/cykláza (ARO/CYC) modifikující vzniklý poly- β -keto intermediát na aromatickou sloučeninu (Ames *et al.*, 2011). Potenciální úpravy pomocí dimeráz, P450 monooxygenáz, metyltransferáz, glykosyltransferáz a jiných přídatných enzymů dále zvyšují antibiotickou aktivitu konečného produktu (Ridley *et al.*, 2008). PKS II se často uplatňují při syntéze aromatických polyketidů, a to především u aktinobakterií. Řadí se k nim actinorhodin (Okamoto *et al.*, 2009), doxorubicin (Malla *et al.*, 2010) a biologicky aktivní produkty.

Evoluce PKS je dlouhodobý proces, na kterém se podílela řada mechanismů. K vývojovým změnám polyketid-syntáz typu I docházelo bodovými mutacemi, duplikacemi genů a modulů, homologní rekombinací a také horizontálním přenosem genetické informace. Předpokládá se, že diverzita polyketidů syntetizovaných PKS I je ovlivněna převážně duplikací modulů a získem AT či přídatných domén. Sekvenční analýzou byla také prokázána důležitost přenosu genů mezi bakteriemi (Ridley *et al.*, 2008). U iterativních polyketid-syntáz typu II je horizontální přenos genů klíčovým faktorem účastnícím se evoluce polyketidů. Dokládá to komparativní sekvenční analýza provedená u aktinobakterií izolovaných z půdy (Metsä-Ketelä *et al.*, 2002). Byly vybrány 2 geny, kódující 16S rRNA a ketosyntázu (KS_{α}), pro které byly sestrojeny fylogenetické stromy. Objev sekvenčně rozdílných genů pro KS u 13 izolátů s identickými sekvencemi genu pro 16S rRNA a naopak sekvenčně podobných genů u 2 izolátů s odlišnými sekvencemi genu pro 16S rRNA jsou jen některými z mnoha příkladů, které naznačují horizontální přenos genů pro syntézu aromatických polyketidů a nezávislost evoluce těchto metabolitů na evoluci bakteriálních druhů.

Jak již bylo zmíněno v kapitole Sekundární metabolismus půdních bakterií, na diverzitu PKS v půdním prostředí má vliv mnoho faktorů, mezi které se řadí geografická vzdálenost, typ biomu nebo typ půdy. Četnost genů kódujících biosyntetické dráhy polyketidů je rovněž důsledkem různých environmentálních činitelů. Určení těchto faktorů bylo jedním ze závěrů studie z roku 2014, věnující se kvantifikaci genů pro PKS v tropických půdách ovlivněných lidskou činností (Le *et al.*, 2014). Abundance genů pro PKS negativně korelovala s koncentrací některých antibiotik, kovů a s dostupností síranu. Naopak typ půdy se ukázal být faktorem, jenž

nekoreluje s množstvím genů pro PKS. Autoři studie také zjistili, že absolutní abundance PKS I byla ve všech půdních vzorcích vyšší než PKS II. Ze stanovených počtů kopií na gram půdy (pohybujících se od $1,7 \times 10^6$ do $4,7 \times 10^6$ pro PKS I a od $2,4 \times 10^5$ do $1,5 \times 10^6$ pro PKS II) je patrné, že geny kódující oba typy polyketid-syntáz jsou v půdě velmi hojné. Produkce sekundárních metabolitů je běžným jevem i v extrémních habitatech, což bylo pozorováno u aktinobakterií izolovaných ze sedimentu Mariánského příkopu (Pathom-Aree *et al.*, 2006). Gen pro PKS I byl amplifikací pomocí specifických primerů detekován u 5 z 38 kmenů, gen pro PKS II byl nalezen pouze u 1 izolátu. Autoři nicméně upozorňují, že možný výskyt méně konzervovaných úseků těchto genů může být důvodem nízké homologie s primery, a tudíž je pravděpodobné, že velká část producentů polyketidů zůstává zatím neprozkoumána. Je tedy zřejmé, že schopnost biosyntézy polyketidů ve variabilních typech prostředí je velmi častá, rozmístění genů pro PKS ovšem zpravidla není podobně jako distribuce půdních společenstev kosmopolitní, a vykazuje jistý biogeografický vzorec (Wawrik *et al.*, 2007).

3.2.2 Rezistenční mechanismy

Antibiotická rezistence je přirozený jev vyskytující se u producentů antibiotik, u kterých slouží jako ochrana před účinky těchto látek. Geny kódující rezistenci se často nachází v biosyntetickém klastru daného antibiotika. Exprese těchto genů může být konstitutivní, a tedy nezávislá na expresi genů biosyntetického klastru, častěji je ale různými mechanismy regulována. *Streptomyces griseus* má například v biosyntetickém klastru streptomycinu gen *strA* (zvaný též *aphD*), který kóduje fosfotransferázu inaktivující toto aminoglykosidové antibiotikum (Ohnuki *et al.*, 1985). Transkripce tohoto genu je pozitivně regulována A-faktorem. Tato signální molekula se po dosažení určité koncentrace váže na protein ArpA a způsobuje jeho vyvázání z promotoru genu *adpA*. Tím dochází k produkci proteinu AdpA, který následně spouští expresi *strR* (transkripční faktor většiny biosyntetických genů) a také *strA* (Ohnishi *et al.*, 1999). Výsledkem této signální kaskády je zajištění rezistence před nahromaděním účinné koncentrace streptomycinu v buňce. Gen *strA* se v půdě pravděpodobně podílí na horizontálním přenosu, což dokazuje přítomnost tohoto genu u geneticky a fenotypicky vzdálených kmenů *Streptomyces* (Wiener *et al.*, 1998). Rezistence tedy není omezena pouze na producenty antibiotik, a právě horizontální přenos genetické informace hraje klíčovou roli v šíření půdního rezistomu. Častý výskyt genů antibiotické rezistence na mobilních elementech usnadňuje jejich přenos, zvláště v prostředí s vysokým selekčním tlakem. Problémem je pak především získání těchto genů patogenními bakteriemi. Identifikace a

porovnání rezistenčních genů vedla Jiang a kol. (2017) k domněnce, že některé mechanismy rezistence u patogenů pochází z aktinobakterií. Za zmínku stojí geny *cmx* a *lmrA* kódující rezistenci k chloramfenikolu a linkomycinu, u nichž autoři předpokládají nedávný horizontální přenos z aktinobakterií do proteobakterií. Vzhledem k tomu, že proteobakterie zahrnují patogenní zástupce (například *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa*), tento proces může komplikovat antibiotickou léčbu bakteriálních infekcí a mít tak negativní dopad na lidské zdraví.

Mnohočetná rezistence na antibiotika (multidrug resistance) je v půdním prostředí běžným jevem, ačkoliv je variabilní a liší se v rámci různých lokalit. D'Costa a kol. (2006) zkoumali u půdních bakterií citlivost na 21 antibiotik zahrnující přírodní, semisyntetické i syntetické preparáty. Každý kmen byl rezistentní v průměru k 7 až 8 antibiotikům, z toho 2 kmeny vykazovaly rezistenci vůči 15 antimikrobiálním látkám. Multirezistence půdních bakterií byla také náplní práce z roku 2013 (Walsh & Duffy, 2013). Necitlivost na více antibiotik byla prokázána u všech izolátů, z nichž více než 80 % bylo rezistentních k 16 až 23 látkám s antibiotickým účinkem. Přítomnost mnohočetné rezistence byla potvrzena i mezi bakteriemi izolovanými ze sedimentů dvou lokalit 170 až 259 metrů pod povrchem půdy (Brown & Balkwill, 2009). 90 % kmenů bylo rezistentních alespoň na 1 antibiotikum ze 13 testovaných. Udržování více mechanismů rezistence by bylo z důvodu nedostatku živin v těchto podmínkách náročné, a proto autoři předpokládají, že multirezistence je zajištěna efluxním systémem umožňujícím transport více typů antimikrobiálních látek. Alternativním řešením by byl horizontální přenos genové kazety obsahující několik genů rezistence. Autoři zmíněných studií se nicméně zaměřili pouze na kultivovatelný podíl bakterií, a tudíž je celková diverzita mnohočetné rezistence mnohem vyšší.

Horizontální přenos genetické informace je příčinou rezistence zvané získaná, která také vzniká jako důsledek genetických mutací. Vrozená rezistence je necitlivost na antibiotikum způsobená přirozenými vlastnostmi daného organismu, například nepřítomností zásahového místa. Mechanismy antibiotické rezistence se dají obecně rozdělit do tří skupin (Blair *et al.*, 2015):

- Omezení intracelulární koncentrace antibiotika sníženou permeabilitou nebo aktivním efluxem
- Modifikace zásahového místa antibiotika mutací nebo posttranslační úpravou
- Modifikace antibiotika a jeho inaktivace hydrolýzou nebo navázáním chemických skupin

3.2.2.1 Inaktivace antibiotika

Modifikace antibiotika a jeho inaktivace je zprostředkována dvěma hlavními způsoby - degradací, nebo napojením chemické skupiny, která stericky brání antibiotiku vázat se na cílové místo. V obou případech se na antibiotické rezistenci podílí specifické enzymy. Hydrolýza beta-laktamového kruhu pomocí beta-laktamázy je nejznámějším příkladem enzymatické inaktivace penicilinů, cefalosporinů, monobaktamů a karbapenemů (Drawz & Bonomo, 2010). Druhý způsob inaktivace antibiotika je důsledkem rozmanité skupiny transferáz, které modifikují antibiotika napojením různorodých chemických skupin. Tyto enzymy katalyzují acetylaci, fosforylaci, nukleotidylaci, ribosylaci, glykosylaci nebo přenos thiolové skupiny (Wright, 2005). Enzymatická modifikace je důležitým rezistenčním mechanismem vůči aminoglykosidovým antibiotikům. Aminoglykosidy jsou velké molekuly s hydroxylovými a aminovými skupinami, a právě ty jsou cílem různých transferáz (Blair *et al.*, 2015). Výsledná rezistence je pak následkem snížené afinity modifikovaného antibiotika k zásahovému místu. Aminoglykosid modifikující enzymy (AME) se podle vázané chemické skupiny dělí do tří skupin: aminoglykosid acetyltransferázy, aminoglykosid fosfotransferázy a aminoglykosid nukleotidyltransferázy. Nomenklatura nejčastěji využívaná pro identifikaci AME se skládá z třípísmenné zkratky určující jejich enzymatickou aktivitu (AAC pro acetyltransferázy, APH pro fosfotransferázy a ANT pro nukleotidyltransferázy), arabské číslice naznačující místo modifikace, římské číslice pro rezistenční profil a malého písmena pro unikátní označení proteinu (Shaw *et al.*, 1993).

Aminoglykosid N-acetyltransferázy jsou třídou enzymů katalyzující acylaci aminoskupiny. AAC jsou součástí rodiny enzymů zvané GNAT (GCN5 příbuzné N-acetyltransferázy), kam se řadí i histon acetyltransferázy (Wybenga-Groot *et al.*, 1999). Jejich společným znakem je použití acetyl-CoA jako donoru acetylové skupiny. AAC jsou největší skupinou aminoglykosid modifikujících enzymů a jejich přítomnost byla prokázána u grampozitivních i gramnegativních bakterií. Jsou schopny acylace aminoskupiny na čtyřech různých pozicích, z toho aminoglykosid 6'-acetyltransferázy modifikující aminoskupinu aminohexózy v pozici 6' jsou schopny inaktivace klinicky nejvýznamnějších aminoglykosidů (Vakulenko & Mobashery, 2003). Dosud byly popsány dvě skupiny AAC(6'), které se liší spektrem inaktivovaných aminoglykosidů, AAC(6')-I a AAC(6')-II. Jejich hlavní rozdíl spočívá v schopnosti acylovat amikacin a gentamicin. Zatímco AAC(6')-I jsou schopny modifikovat amikacin, AAC(6')-II účinně modifikují gentamicin (Rather *et al.*, 1992). Oba typy enzymů zajišťují rezistenci k tobramycinu, netilmicinu, sisomicinu a dibekacinu (Shaw *et al.*, 1993). Acetyltransferázy typu AAC(6')-Ib jsou rozšířeny u gramnegativních patogenů, což

je spolu s častou přítomností na mobilních elementech důvodem jejich významu v klinické praxi (Thungapathra *et al.*, 2002; Sarno *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2004). Pozornost je také věnována variantám AAC(6′)-Ib s neobvyklou enzymatickou aktivitou. Mezi tyto acetyltransferázy se řadí AAC(6′)-Ib₁₁ s rozšířeným spektrem rezistence s účinkem na gentamicin (Casin *et al.*, 2003) nebo AAC(6′)-Ib-cr schopné acetylce ciprofloxacinu ze skupiny fluorochinolových antibiotik (Robicsek *et al.*, 2006). Častým jevem je také fúze AAC(6′) s jinými AME. Bifunkční enzym AAC(6′)-APH(2′′) navozuje rezistenci k většině aminoglykosidů využívaných v klinické praxi, streptomycin ovšem inaktivován není. Jeho enzymatická aktivita je rozhodujícím rezistenčním faktorem u mnoha gram pozitivních zástupců, převážně rodu *Enterococcus*, *Staphylococcus* a *Streptococcus* (Thomas & Archer, 1989; Woodford *et al.*, 1993; Horaud *et al.*, 1996). Gen *aac(6′)-aph(2′′)* se nachází na transpozonu, který může být integrován do chromozomu nebo je součástí plazmidu (Woodford *et al.*, 1993; Horaud *et al.*, 1996). Přítomnost na konjugativních plazmidech umožňuje šíření tohoto bifunkčního enzymu mezi populacemi gram pozitivních bakterií.

Druhou největší skupinou aminoglykosid acetyltransferáz jsou AAC(3). Podskupina AAC(3)-I přináší výhodu hlavně enterobakteriím a dalším klinicky významným gram negativním bakteriím. Působením této enzymatické aktivity jsou bakterie necitlivé ke gentamicinu, sisomicinu a fortimicinu (Ramirez & Tolmasky, 2010). Geny kódující AAC(3)-I byly nalezeny v genových kazetách umístěných v integronech gram negativních zástupců rodů *Pseudomonas* (Riccio *et al.*, 2003), *Salmonella* (Cabrera *et al.*, 2009), *Vibrio* (Ahmed *et al.*, 2004) a dalších.

Aminoglykosid O-fosfotransferázy katalyzují fosforylaci hydroxylových skupin aminoglykosidů. Donorem fosfátové skupiny je molekula ATP. Dosud bylo charakterizováno 7 tříd APH, jejichž geny jsou často nalezeny na plazmidech, transpozonech a integronech (Wright, 2005). Inaktivace streptomycinu je katalyzována APH(6). Jsou známy 4 enzymy fosforylující hydroxylovou skupinu na pozici 6 streptidinového kruhu, všechny nesou označení APH(6)-I. Gen *strA* kódující APH(6)-Ia byl nalezen v biosyntetickém klastru streptomycinu aktinobakterie *Streptomyces griseus*, a má proto důležitou funkci v ochraně před antimikrobiálními účinky vlastního produktu (Distler *et al.*, 1987). Díky přítomnosti *strA* má *Streptomyces griseus* vůdčí postavení mezi bakteriemi rezistentními ke streptomycinu v půdním prostředí a má výrazný podíl na šíření genů zajišťující odolnost k tomuto aminoglykosidu. Rezistence k streptomycinu u *Streptomyces griseus* je také zajištěna genem *aphE* kódující APH(3′′)-Ia, který není na rozdíl od APH(6)-Ia součástí biosyntetického klastru

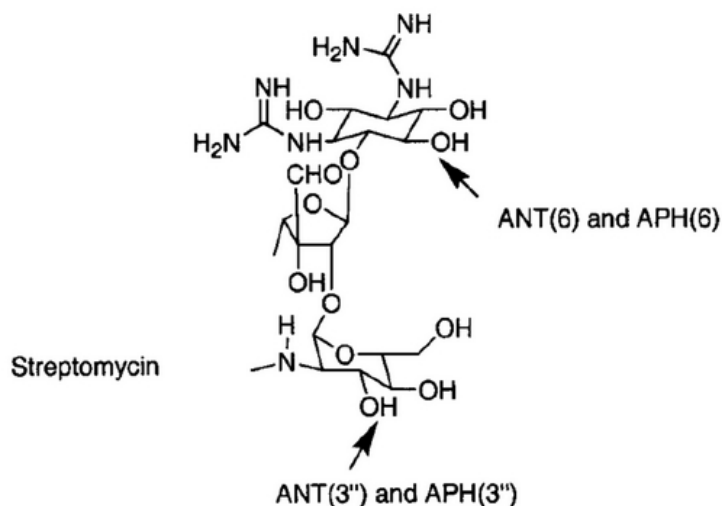
(Heinzel *et al.*, 1988). Vysoká sekvenční podobnost byla pozorována při srovnání aminokyselinové sekvence produktu genu *strA* s APH(6)-Ib kódovanou genem *sph* u producenta hydroxystreptomycinu, *Streptomyces glaucescens* (Vögtli & Hütter, 1987). Výskyt determinant rezistence na mobilních elementech byl prokázán u APH(6)-Ic i APH(6)-Id. Gen pro APH(6)-Ic byl spolu s *aph(3')-II* (kódujícím rezistenci ke kanamycinu) a *ble* (kódujícím rezistenci k bleomycinu) lokalizován na transpozonu Tn5 (Mazodier *et al.*, 1985). Gen *strB*, jehož produktem je fosfotransferáza APH(6)-Id, je často spojen s genem kódujícím APH(3'')-Ib způsobujícím také rezistenci k streptomycinu. Dvojice genů označovaná jako *strA-strB* byla nalezena na plasmidech komenzálních i patogenních bakterií izolovaných z rostlin, živočichů a také lidí (Shaw *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1997; L'Abée-Lund & Sørum, 2000). Geny *strA-strB* jsou také součástí transpozonů a integronů, což umožnilo jejich rozšíření mezi nejméně 21 bakteriálními rody (Sundin, 2002).

Streptomycin ovšem není jediným substrátem aminoglykosid fosfotransferáz. Navození rezistence fosforylací hydroxylové skupiny bývá také zprostředkováno enzymy APH(3'), které byly podle rezistenčního profilu rozděleny do 7 skupin. Skupina APH(3')-I se vyznačuje schopností inaktivovat široké spektrum aminoglykosidů, například kanamycin, neomycin, lividomycin, paromomycin a ribostamycin (Vakulenko & Mobashery, 2003).

Aminoglykosid O-nukleotidyltransferázy zvané též adenylyltransferázy způsobují inaktivaci aminoglykosidových antibiotik přenosem AMP z molekuly ATP na jejich hydroxylovou skupinu. Podle adenylované hydroxylové skupiny bylo popsáno 5 skupin ANT, které se stejně jako předchozí třídy enzymů hojně vyskytují na mobilních elementech, což jim umožňuje snazší šíření (Ramirez & Tolmasky, 2010). ANT(6) navozuje rezistenci k streptomycinu modifikací -OH skupiny v pozici 6 streptidinového kruhu (Latorre *et al.*, 2016). Gen kódující ANT(6)-I byl nalezen u více než 80 % bakterií rodu *Staphylococcus* a *Enterococcus* získaných z francouzských nemocnic (Ounissi *et al.*, 1990) a u zhruba 50 % izolátů *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* odebraných od pacientů v Japonsku (Kobayashi *et al.*, 2001). Rezistence navozená nukleotidyltransferázou ANT(6) byla také zjištěna u necelých 7 % klinických izolátů *Enterococcus faecalis* ze zdravotnických zařízení na Slovensku (Filipová *et al.*, 2006).

Na obrázku 5 lze vidět, že streptomycin je kromě již uvedených transferáz také substrátem enzymů skupiny ANT(3''). V tomto případě je modifikována hydroxylová skupina na pozici 3''. U molekuly spektinomycinu, který je také substrátem této adenylyltransferázy, je modifikována pozice 9. Jsou rozšířeny u gramnegativních bakterií, výskyt *ant(3'')-I* byl

polymerázovou řetězovou reakcí prokázán u 85 % klinických izolátů *Acinetobacter baumannii* z Číny (Wen *et al.*, 2014) a u 80 % bakterií rodu *Salmonella* získaných od pacientů z Jižní Afriky (Zishiri *et al.*, 2016). ANT(3'') má velký podíl na navození ochrany před působením antibiotické aktivity aminoglykosidů, Shaw a kol. (1991) došli k závěru, že za polovinu rezistencí k streptomycinu je u klinických izolátů gramnegativních bakterií zodpovědný právě tento enzym. Zástupci skupiny enzymů ANT (3'') jsou často ve fúzi s jinými AME, tyto bifunkční enzymy s rozšířeným rezistenčním profilem pak poskytují svým nositelům selektivní výhodu. Bývají také součástí genových kazet a mohou se nacházet na integronech, plazmidech a transpozonech. To potvrzuje studie, jež zkoumala rezistenci k streptomycinu u bakterií půdních habitatů Evropy (van Overbeek *et al.*, 2002). Výsledkem bylo zjištění, že *ant(3'')* je nejčastější determinantou rezistence k streptomycinu vyskytující se na mobilních genetických elementech. Tento gen se vyskytoval na 85 % plazmidech, často v kombinaci s jinými geny zajišťujícími rezistenci k streptomycinu. Ačkoliv se umístění více determinant rezistence k určitému typu antibiotika na jednom plazmidu může zdát jako zbytečné, jedná se o běžný jev. Prokazuje to i uvedená studie, která určila, že 62 % plazmidů obsahujících geny pro enzymy modifikující streptomycin kóduje 2 a více těchto enzymů. Všechny ale nemusí být funkční, případně mohou být jejich geny různě exprimovány podle toho, v jakém hostitelském organismu se plazmid nachází.



Obr. 5: Cílová místa aminoglykosid modifikujících enzymů u streptomycinu (převzato a upraveno z Vakulenko & Mobashery, 2003)

Je tedy zřejmé, že enzymatická inaktivace je častou příčinou rezistence u mnoha bakteriálních rodů. Z tohoto důvodu má dnes velký potenciál vývoj aminoglykosidů, které jsou k aminoglykosid modifikujícím enzymům necitlivé. Perspektivním lékem se ukázal být plazomicin, semisyntetický derivát sisomicinu, jenž si zachoval antibiotickou aktivitu v přítomnosti 15 ze 17 testovaných AME (Cox *et al.*, 2018). Aktivita tohoto aminoglykosidu je nicméně inhibována působením 16S rRNA metyltransferáz.

3.2.2.2 Modifikace zásahového místa

Schopnost antibiotika vázat se na cílové místo je nezbytným předpokladem pro usmrcení bakterií nebo inhibici jejich růstu. Vazebným místem jsou v bakteriální buňce povrchové struktury i komponenty cytoplazmatického prostoru, jejichž modifikace jsou častým mechanismem navození rezistence. Mezi modifikovaná zásahová místa antibiotik se řadí penicilin vazebný protein, peptidoglykan a jeho prekurzory, lipopolysacharid, ribozom a také enzymy RNA polymeráza, DNA gyráza a topoizomeráza IV (Lambert, 2005).

U bakterií necitlivých k antibiotikům prostřednictvím změny cílového místa byly popsány 2 základní mechanismy rezistence. Prvním z nich je ochrana zásahového místa, kterým je v případě tetracyklinů 30S ribozomální podjednotka. Interakce specifických proteinů s ribozomem v procesu závislém na GTP uvolňuje tetracyklinové antibiotikum z vazebného místa a brání tak jeho funkci. Nejstudovanější zástupci tzv. proteinů ribozomální ochrany jsou proteiny Tet(M) a Tet(O) (Burdett, 1996; Trieber *et al.*, 1998). Druhým mechanismem je přímá modifikace cílového místa, která vyvolává rezistenci k široké skupině látek se stejným zásahovým místem. Ta může být zapříčiněna bodovou mutací v genu, enzymatickou modifikací, nebo obejitím či úplným nahrazením původního cíle. Necitlivost k účinku rifampicinu způsobuje bodová mutace v genu *rpoB*, jehož produktem je β podjednotka RNA polymerázy (Mariam *et al.*, 2004). I přes mutace si polymeráza většinou uchovává katalytickou aktivitu a je schopna transkripce. Fitness u mutantů může být však oproti citlivým kmenům sníženo.

Pomocí strategie využívající nahrazení původního místa jsou bakterie schopny vytvářet alternativní strukturu či enzym, který ovšem není danou antimikrobiální látkou inhibován a zároveň si uchovává podobné funkce jako výchozí komponenta. Typickým příkladem je necitlivost k meticilinu a dalším beta-laktamovým antibiotikům, jenž je determinována genem *mecA* kódujícím alternativní penicilin vazebný protein, PBP2a (Lambert, 2005). Kromě transpeptidázy PBP2a umožňující syntézu buněčné stěny i v přítomnosti beta-laktamů je

náhrada zásahového místa běžným mechanismem u enterokoků rezistentních na vankomycin. Vazbou na C-koncové části pentapeptidu brání toto glykopeptidové antibiotikum spojení sousedních řetězců ve struktuře peptidoglykanu. Rezistentní zástupci rodu *Enterococcus* mají pak díky produktům chromozomálně či plazmidově kódovaných genových klastrů pojmenovaných *van* nahrazen C-koncový D-alanin za D-laktát nebo D-serin, ke kterým vykazuje vankomycin nižší afinitu (Courvalin, 2006).

Enzymatická inaktivace cíle je nejlépe popsána u metylace ribozomální RNA, která hraje důležitou roli u bakterií vykazujících zkříženou rezistenci k antibiotikům skupiny MLS_B (makrolidům, linkosamidům a streptograminu B). Podílí se na ní metyltransferázy kódované geny *erm*, jež za přítomnosti S-adenosylmethioninu jako donoru metylové skupiny katalyzují metylaci nebo dimethylaci adeninu ve 23S rRNA velké ribozomální podjednotky. Vzniklý N⁶-mono- či dimetyladenin A2058 (pozice u *Escherichia coli*) v molekule 23S rRNA snižuje schopnost vazby MLS_B k peptidyltransferázovému centru (Weisblum, 1995).

Rezistence k antibiotikům MLS_B je mnohdy regulovaný proces a jeho exprese je zodpovědná za 3 odlišné fenotypy – konstitutivní rezistenci, indukibilní rezistenci a rezistenci pouze k makrolidům a streptograminu B (Coutinho *et al.*, 2010). Model regulace genové exprese u indukibilního typu rezistence byl detailně popsán na operonu *ermC* u *Staphylococcus aureus*. Upstream od kódující oblasti metyltransferázy se nachází sekvence leader peptidu, jehož transkripce v nepřítomnosti induktoru dává vznik sekundárním strukturám, jež zakrývají vazebné místo pro ribozom (RBS) *ermC*. Pokud je přítomen erythromycin nebo jiný makrolid, antibiotikum interaguje s ribozomem a celý komplex se váže na oblast leader peptidu, důsledkem čehož dochází ke konformačním změnám mRNA. RBS pro *ermC* je tímto způsobem odkryto a produkovaná metyltransferáza může navodit rezistenci k danému antibiotiku (Munita & Arias, 2016).

Velká část genů *erm* je lokalizována na mobilních genetických elementech, jako tomu je například u hlavních determinant rezistence bakterií rodu *Staphylococcus*, *ermA* a *ermC*. Na rozdíl od genu *ermA*, který je součástí transpozonu Tn554 se specifickým místem zaručujícím inzerci do chromozomu (Murphy, 1985), *ermC* je často kódován na plazmidech (Oliveira *et al.*, 1993). Na základě poznatků o umístění na mobilních elementech se dá předpokládat, že jsou tyto geny schopny přenášet se mezi různými organismy. Příklad možného HGT mezi bakteriemi ve své práci uvádí Jensen a kol. (2002). Jako první v publikaci identifikovali gen *ermB* u kmene *Bacillus cereus* izolovaného z půdy hnojené živočišným odpadem. Autoři se domnívají, že proběhl přenos genu mezi bakteriemi pocházejícími od živočichů

(pravděpodobně rodu *Enterococcus*) a půdní bakterií *Bacillus cereus*. Hypotézu horizontálního přenosu podpořila i fylogenetická analýza zaměřená na rRNA metyltransferázy (Park *et al.*, 2010). K vytvoření fylogenetického stromu byly vybrány alignmenty aminokyselinových sekvencí 111 metyltransferáz Erm. Ty podle svého původu způsobily rozvětvení sestrojeného stromu do dvou hlavních větví, pro kmeny *Actinobacteria* a *Firmicutes*. Klastr sekvencí kmene *Firmicutes* zahrnoval i metyltransferázy zástupců rodu *Arcanobacterium*, *Bacteroides*, *Neisseria* a *Escherichia*, což dokládá horizontální přenos *erm* mezi fylogeneticky vzdálenými bakteriemi. Odchytky ve fylogramu byly také zapříčiněny genovými duplikacemi, které na rozdíl od HGT dominovaly v rámci kladu *Actinobacteria*.

Bylo zjištěno, že rezistence k MLS_B u izolátů z klinického prostředí je běžným jevem. U bakterií rodu *Staphylococcus* se nejčastěji jedná o konstitutivní rezistenci, která byla detekována u 46,7 % izolátů z brazilské (Coutinho *et al.*, 2010) a u 42 % izolátů z turecké nemocnice (Cetin *et al.*, 2010). Nejčastější determinantou rezistence byl u zástupců *Staphylococcus aureus* získaných z obou uvedených zdravotnických zařízení gen *ermA*, v případě koaguláza negativních stafylokoků se jednalo o *ermC*. V půdním prostředí jsou množství a rozmanitost genů *erm* ovlivněny mnoha faktory. Jedná se především o vlastnosti půdy, například hodnotu pH nebo obsah organické hmoty v půdě. Jejich diverzita často vykazuje specifitu pro danou lokalitu a také se ukázalo, že sekvence těchto rezistenčních genů u aktinobakterií korelují s fylogenetickými vzdálenostmi sekvencí příslušných genů pro 16S rRNA (Ságová-Marečková *et al.*, 2011; Ságová-Marečková *et al.*, 2015b).

3.3 Metody detekce a kvantifikace

3.3.1 Návrh primerů

Použití vhodných primerů je základním předpokladem pro úspěšnou polymerázovou řetězovou reakci. Základem každého navrhování primerů je vyhledávání cílových sekvencí genů v databázi. Důležité je vyhledávání nukleotidových sekvencí, stejně důležité je ovšem i vyhledávání aminokyselinového složení proteinů. Pokud jsou například primery určeny k nasedání na homologní geny více druhů organismů, jenž v konzervovaných oblastech obsahují mírné změny, je potřeba navrhnout degenerované primery. Tyto oligonukleotidy mají na jedné nebo více pozicích několik možností bází, a jsou tedy dodávány jako směs primerů s variabilními bázemi na daných pozicích. Při návrhu primerů je tedy důležité najít v alignmentu konzervované aminokyseliny, které jsou následně přepsány do nukleotidové

sekvence. Při výběru konzervované oblasti je nezbytné sledovat aminokyseliny, které tato oblast obsahuje. Výhodné je vybírat taková místa, která obsahují aminokyseliny kódované jedním, případně dvěma kodóny. Mezi aminokyseliny s jedním kodónem se řadí methionin a tryptofan, naopak pro leucin, arginin a serin existuje 6 možných kodónů. Častým jevem je ovšem nerovnoměrné využívání kodónů pro dané aminokyseliny u různých organismů. Shodný vzor používání kodónů je typický pro jednotlivé taxony, skupiny a také druhy, v rámci jednoho druhu ovšem může být patrná variabilita využívání kodónů u různých genů (Sharp *et al.*, 1988). Z tohoto důvodu je srovnání sekvencí proteinů s příslušnými geny optimálním řešením pro výběr potenciálních primerů, které jsou esenciální pro účinnost amplifikace.

Veřejně přístupné databáze genů a proteinů (např. GenBank) obsahují velké množství sekvencí, avšak mají mnohdy uloženy sekvence, jejichž identifikace není kompletní. Mohou obsahovat neúplná, chybně určená či duplicitní data. Tyto faktory způsobují problémy při práci se sekvencemi, a proto je jejich shromažďování často podmíněno ověřováním původu, funkce a dalších údajů. Zejména při navrhování primerů pro enzymy je důležité vyhledat sekvence, u nichž byla potvrzena aktivita. Ověřit enzymatickou aktivitu lze mnoha technikami, jejichž popis je možné nalézt v publikaci uvedené u identifikačních údajů příslušného záznamu. I v případě, kdy nebyla přímo ověřena funkce daného genu, lze z informací uvedených v databázi s velkou přesností odhadnout správnost sekvence. Užitečné informace o daném genu lze zjistit i z analýzy genomu příslušného organismu. Některé databáze umožňují vizualizovat lokalizaci genu a jeho blízkého okolí, což může objasnit úlohu příslušného genu v organismu, zejména pokud je součástí klastru.

Při samotném výběru primerů pro PCR je důležité dodržovat několik zásad, které mají velký podíl na účinnosti a specifitě amplifikace. Obecně by se délka oligonukleotidů měla pohybovat mezi 18 a 24 nukleotidy (Dieffenbach *et al.*, 1993). S narůstající délkou se zvyšuje jejich specifita, nevýhodou je ovšem snižující se efektivita nasedání primerů na templátové vlákno. Faktorem, který je nezbytné vzít v úvahu při určování délky, je také teplota tání primerů. Ta je definována jako teplota, při které polovina oligonukleotidů vzájemně hybridizuje, zatímco druhá polovina je ve formě jednovláknových řetězců. Teplota tání pohybující se mezi 55 a 65 °C se ve většině případů ukazuje jako optimální. Existuje několik rovnic, ze kterých je možné určit tuto teplotu. Nejjednodušší byla rovnice dle Marmur a Doty (Marmur & Doty, 1962):

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Tato rovnice ovšem není vhodná pro výpočet teploty tání primerů delších než 13 nukleotidů, a je proto dnes využívána minimálně. V současné době je nejčastěji nahrazena metodou nejbližšího souseda (nearest neighbor method), která na rozdíl od výše uvedené rovnice nebere v úvahu pouze nukleotidové složení primerů, ale také jejich termodynamické vlastnosti.

Teplota tání se zvyšuje s narůstajícím obsahem GC párů. Je proto doporučováno navrhovat primery s 40 až 60 % GC párů. Tyto páry tvoří silnější vazbu než AT páry (díky 3 vodíkovým vazbám), a je proto často doporučována přítomnost guaninu nebo cytosinu na 3' konci, která napomáhá vazbě primeru na templát. 3' konec je pro účinnost PCR reakce klíčový. Pro zabránění misprimingu by posledních 5 až 6 nukleotidů na 3' konci primeru mělo dokonale párovat s templátovou DNA (Dieffenbach *et al.*, 1993).

Dalším důležitým faktorem, který je nutno respektovat při návrhu primerů, je schopnost oligonukleotidů vytvářet sekundární struktury. Důsledkem tvorby těchto struktur je snížení dostupnosti volných primerů v reakci, čímž se snižuje účinnost amplifikace. Komplementarita v rámci jednoho oligonukleotidu má za následek vznik vlásenek. Bylo prokázáno, že vlásenka může snižovat účinnost PCR až o 90 %. Velký pokles účinnosti amplifikace způsobují především vlásenky, které obsahují stopky o délce 4 a více nukleotidů (Singh *et al.*, 2000). Jestliže dva oligonukleotidové řetězce vzájemně hybridizují, dochází ke vzniku homodimerů (interakce dvou stejných primerů) nebo heterodimerů (přímý primer interaguje se zpětným primerem). Stabilitu sekundárních struktur lze charakterizovat změnou Gibbsovy energie ΔG , která vyjadřuje energii nutnou pro rozpad sekundární struktury. Čím nižší (více záporná) je hodnota ΔG , tím stabilnější je sekundární struktura. Je proto doporučováno navrhovat primery, jejichž vlásenky a dimery mají ΔG zhruba vyšší než -5 kcal/mol. Je ovšem důležité sledovat pozici struktury v oligonukleotidu, především na 3' konci mohou být vlásenky nebo dimery pro průběh reakce rozhodující, a jejich přítomnost je proto většinou nežádoucí.

V neposlední řadě je nezbytné navrhnout primery tak, aby délka produktu byla použitelná pro účely dané reakce (při real-time PCR je délka amplikonu zpravidla okolo 100 bp, u standardní může být produkt delší). Jedná se však o obecná pravidla a vždy je nutné vzít v úvahu konkrétní požadavky experimentu. V současné době je situace usnadněna dostupností mnoha programů, s jejichž využitím lze vytvořit dostatečně účinné a specifické primery.

3.3.2 Digitální PCR

Digitální PCR (dPCR) je systém umožňující absolutní kvantifikaci cílových sekvencí nukleových kyselin ve vzorku. Na rozdíl od klasické polymerázové řetězové reakce je při digitálním PCR vzorek nejprve rozdělen na jednotlivé molekuly nukleových kyselin, které jsou náhodně distribuovány do kompartmentů (např. mikrokapek v olejové emulzi), přičemž ředění templátu musí být takové, aby některé kompartmenty neobsahovaly templátovou DNA a některé naopak obsahovaly jednu či více molekul templátu (Pinheiro et al., 2012). Výsledkem amplifikace a následné detekce vzniku produktu pomocí fluorescenčního značení je směs pozitivních (s cílovou molekulou) a negativních (bez cílové molekuly) reakcí. Použitím Poissonovy distribuce je pak stanovena absolutní koncentrace templátové DNA.

Principy digitálního PCR byly popsány již v 90. letech 20. století. První zmínky pochází z roku 1992, kdy byla popsána metoda kvantifikace leukemických buněk pomocí limitního ředění (Sykes et al., 1992). Pojem digitální PCR byl použit o několik let později, při popisu techniky použité k detekci mutace onkogenu K-ras (Vogelstein & Kinzler, 1999). Podmínkou identifikace této mutace bylo ředění DNA tak, aby jamková destička obsahovala v průměru jednu molekulu templátu na dvě jamky. Následovala PCR reakce, jejíž produkty byly analyzovány pomocí fluorescenčního značení. V následujících letech došlo k výraznému pokroku a komercializaci v oblasti digitálního PCR. Jedním z milníků byl vývoj technologie zvané BEAMing (beads, emulsion, amplification and magnetics) využívající magnetické mikrokuličky v kapičkách emulze, přičemž výsledkem amplifikace je mnoho kopií templátu navázaných na mikrokuličky, které jsou poté označeny fluorescenční sondou a analyzovány průtokovou cytometrií (Dressman et al., 2003). Průlomem se později staly metody, při kterých jednotlivé reakce probíhají nezávisle na sobě v 20 000 kapkách nanolitrových (ddPCR společnosti Bio-Rad Laboratories) (Hindson et al., 2011) nebo v 5 až 10 milionech kapičkách pikolitrových objemů (společnost RainDance Technologies, od roku 2017 součást Bio-Rad Laboratories) (Zonta et al., 2016).

Systém ddPCR (droplet digital PCR) QX200 společnosti Bio-Rad Laboratories je v současné době jedním z nejpoužívanějších nástrojů využívajících technologii digitální polymerázové řetězové reakce (Rutsaert et al., 2018). Na začátku je důležitá příprava směsi obsahující cílovou DNA, primery a příslušný supermix s TaqMan sondou nebo fluorescenčním barvivem (např. EvaGreen) (Miotke et al., 2014). Vzorky jsou následně v generátoru kapek náhodně rozděleny do 20 000 kapek o objemu 1 nl. Každá kapka je nezávislá jednotka, v níž probíhá PCR reakce. Pokud je templátová DNA přítomna, proběhne amplifikace a je detekován

fluorescenční signál, který je ve srovnání s negativními kapkami intenzivnější (Hindson et al., 2011). Podíl pozitivních a negativních reakcí pak slouží k absolutní kvantifikaci templátového vlákna, výsledky jsou zpracovány v programu QuantaSoft. Vysoká citlivost a přesnost ddPCR umožňuje jeho využití v mnoha oblastech molekulární biologie, od kvantifikace nukleových kyselin, přes stanovení variant počtu kopií (copy number variations), měření genové exprese až po detekci vzácných cílových sekvencí a mutací ve vzorku (Mazaika & Homsy, 2014). Rozšíření ddPCR dokazuje i fakt, že k listopadu 2018 bylo publikováno přes 3000 článků, ve kterých byla tato technika využita (https://www.researchgate.net/institution/Bio-Rad_Laboratories/post/5b62eead11ec73b20966de72_Droplet_Digital_PCR_is_leading_the_way_to_discovery2).

Ačkoliv je real-time PCR stále standardním postupem při kvantifikaci nukleových kyselin, alternativní digitální PCR disponuje řadou výhod. Ve srovnání s real-time PCR umožňuje kvantifikaci bez nutnosti přípravy standardů a konstrukce standardní křivky (Pinheiro et al., 2012). Jednou z předností je také citlivost a přesnost digitálního PCR při kvantifikaci malého množství templátové DNA (Taylor et al., 2017). Podobné jsou i výsledky se vzorky obsahujícími různé kontaminace a inhibitory PCR. Jako většina metod má i digitální PCR své limity, přesto se díky svým přednostem stal slibným nástrojem zastávajícím důležitou roli ve výzkumu i medicíně.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Tab. 1: Seznam použitých chemikálií

Název	Výrobce/dodavatel	Zkratka/vzorec
10X Dream Taq Buffer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	
2X Rapid Ligation Buffer	Promega, Madison, WI, USA	
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid	Duchefa, Haarlem, Nizozemí	X-gal
5X Colorless GoTaq Reaction Buffer	Promega, Madison, WI, USA	
Agaróza	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	
Ampicilin	Duchefa, Haarlem, Nizozemí	
D-glukóza	Penta, Praha, Česká republika	
Dihydrogenfosforečnan sodný	Penta, Praha, Česká republika	NaH ₂ PO ₄
Dimetylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	DMSO
dNTP	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	
DreamTaq™ DNA polymeráza	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	
Etanol	Penta, Praha, Česká republika	
Fenol	MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA	
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	
GoTaq® DNA polymeráza	Promega, Madison, WI, USA	
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega, Madison, WI, USA	
Hexadecyltrimetylamoniumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	CTAB
Chlorid draselný	Penta, Praha, Česká republika	KCl
Chlorid hořečnatý	Promega, Madison, WI, USA	MgCl ₂

Chlorid sodný	Penta, Praha, Česká republika	NaCl
Chlorid vápenatý	Penta, Praha, Česká republika	CaCl ₂
Chloroform	Lach-Ner, Neratovice, Česká republika	
Isoamylalkohol	Penta, Praha, Česká republika	
Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid	Duchefa, Haarlem, Nizozemí	IPTG
Isopropylalkohol	Penta, Praha, Česká republika	
Kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonová	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	HEPES
Kyselina etylendiamintetraoctová	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	EDTA
Malt extract	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	
Octan sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	
PCR vkládací pufr Yellow load	Top-Bio, Vestec, Česká republika	
Pepton	HiMedia, Bombaj, Indie	
pGEM [®] -T Easy Vector	Promega, Madison, WI, USA	
QX200 [™] ddPCR [™] EvaGreen [®] supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA	
SYBR [®] Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	
T4 DNA ligáza	Promega, Madison, WI, USA	
Tris(hydroxymetyl)aminometan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	Tris
Trypton	BD, Franklin Lakes, NJ, USA	
Yeast extract	HiMedia, Bombaj, Indie	

4.1.2 Média a pufry

Tab. 2: Seznam a složení použitých médií a pufřů

Název	Složení	Koncentrace/množství
TE ⁻¹	Tris (pH 8)	10 mM
	EDTA (pH 8)	0,1 mM
TAE	Tris-acetát	40 mM
	EDTA (pH 8)	1 mM
Müllerův pufř	NaH ₂ PO ₄ (pH 8)	50 mM
	NaCl	50 mM
	Tris-HCl (pH 8)	500 mM
GYM médium	D-glukóza	4 g
	Yeast extract	4 g
	Malt extract	10 g
	CaCO ₃	2 g
	Agar	12 g
	dH ₂ O	1000 ml
SOC médium (pH 7)	Trypton	20 g
	Yeast extract	5,5 g
	NaCl (1M)	10 ml
	KCl (1M)	2,5 ml
	dH ₂ O	970 ml
YEME (Yeast Extract-Malt Extract) médium	Yeast extract	3 g
	Malt extract	3 g
	Pepton	5 g
	D-glukóza	10 g
	dH ₂ O	1000 ml
LB médium (pH 7,5)	Trypton	10 g
	Yeast extract	5 g
	NaCl	10 g
	dH ₂ O	1000 ml

4.1.3 Komerční soupravy

- GENE CLEAN[®] Turbo Kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)
- QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN, Venlo, Nizozemí)
- Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)
- Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)
- pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA)

4.1.4 Oligonukleotidy

Tab. 3: Seznam a sekvence použitých oligonukleotidů

Název	Sekvence	Zdroj
pUCM13F	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	pGEM [®] -T Promega
pUCM13R	5'-CACAGGAAACAGCTATGAC-3'	pGEM [®] -T Promega
strA_F	5'-GCGGCTGCTCGACCACGAC-3'	Tolba <i>et al.</i> (2002)
strA_R	5'-CCGTCCTCGATGTCCCACAGGG-3'	Tolba <i>et al.</i> (2002)
DOI-f	5'-GTSCTSTCCTSAAGCAG-3'	Kharel <i>et al.</i> (2003) (upraveno)
DOI-r	5'-CSGTGTGSCCGTACTCC-3'	Kharel <i>et al.</i> (2003) (upraveno)
DKF	5'-GTGCCGGTNC CRTGNGYYTC-3'	Moffitt & Neilan (2001)
DKR08	5'-GCGATGGAYCCNCARCARYG-3'	Moffitt & Neilan (2001)
ks2f	5'-GGITGCACSTCIGGIMTSGAC-3'	Wawrik <i>et al.</i> (2005)
ks2r	5'-CCGATSGCICCSAGIGAGTG-3'	Wawrik <i>et al.</i> (2005)
rB1f	5'-ARCWCGGYCAGAA YTTYCT-3'	Čermák <i>et al.</i> (2008)
rB1r	5'-CGSGCSACYTCCCA YTG-3'	Čermák <i>et al.</i> (2008)
Acti-1154	5'-GRDACYGCCGGGGTYAACT-3'	Pfeiffer <i>et al.</i> (2014)
Act-1339	5'-TCWGC GATTACTAGCGAC-3'	Pfeiffer <i>et al.</i> (2014)
16Seu27f	5'-AGAGTTTGATCMTGGCKCAG-3'	Čermák <i>et al.</i> (2008)
783r-a	5'-CTACCAGGGTATCTAATCCTG-3'	Sakai <i>et al.</i> (2004)
783r-b	5'-CTACCGGGTATCTAATCCCG-3'	Sakai <i>et al.</i> (2004)
783r-c	5'-CTACCGGGTATCTAATCCGG-3'	Sakai <i>et al.</i> (2004)
ATm71fa	5'-GCACRACGCSCCSCCSTAC-3'	tato práce
ATm71fb	5'-CACRACGCSCCSCCSTAC-3'	tato práce
AATm71degF	5'-ACRACGCSCCSCCSTAY-3'	tato práce

AATm125R	5'-TCCGGGTGSCGGSWSCG-3'	tato práce
AATm125degR	5'-TCSGGGTGSCGSSWSCK-3'	tato práce
AATm183R	5'-AGSGCYTCSGCGTGRTG-3'	tato práce
AATm148R	5'-CCRTGSGGSYSRTCCCA-3'	tato práce
Aph_F1	5'-TGCCAYGGSGAYCTSTGC-3'	tato práce
Aph_F2	5'-TGCCAYGGSGAYCTSTG-3'	tato práce
Aph_R	5'-AGSCGGCCSASGTCGA-3'	tato práce
Amitr_F	5'-GACGAGGTSATCGTSCC-3'	tato práce
Amitr_R1	5'-TGSGCGCAGTCCTCGA-3'	tato práce
Amitr_R2	5'-GSGCGCAGTCCTCGA-3'	tato práce
2DOIS_F	5'-TGCTSTTCCGCGGSATC-3'	tato práce
2DOIS_R	5'-CGTTCTTSACSACCTCGC-3'	tato práce

Tab. 4: Cílové geny použitých oligonukleotidů

Název	Produkt cílového genu
pUCM13F	část vektoru pGEM®-T Easy Vector + inzert
pUCM13R	
strA_F	aminoglykosid fosfotransferáza
strA_R	
DOI-f	2-deoxy- <i>scyllo</i> -inosóza syntáza
DOI-r	
DKF	β-ketoacylsyntázová (KS) doména polyketid-syntázy typu I
DKR08	
ks2f	β-ketoacylsyntáza, součást polyketid-syntázy typu II
ks2r	
rB1f	rRNA metyltransferáza
rB1r	
Acti-1154	16S rRNA
Act-1339	
16Seu27f	16S rRNA
783r-a	
783r-b	
783r-c	

ATm71fa	aminoglykosid acetyltransferáza
ATm71fb	
AATm71degF	
AATm125R	
AATm125degR	
AATm183R	
AATm148R	
Aph_F1	aminoglykosid fosfotransferáza
Aph_F2	
Aph_R	
Amitr_F	L-glutamine:2-deoxy- <i>scyllo</i> -inosóza aminotransferáza
Amitr_R1	
Amitr_R2	
2DOIS_F	2-deoxy- <i>scyllo</i> -inosóza syntáza
2DOIS_R	

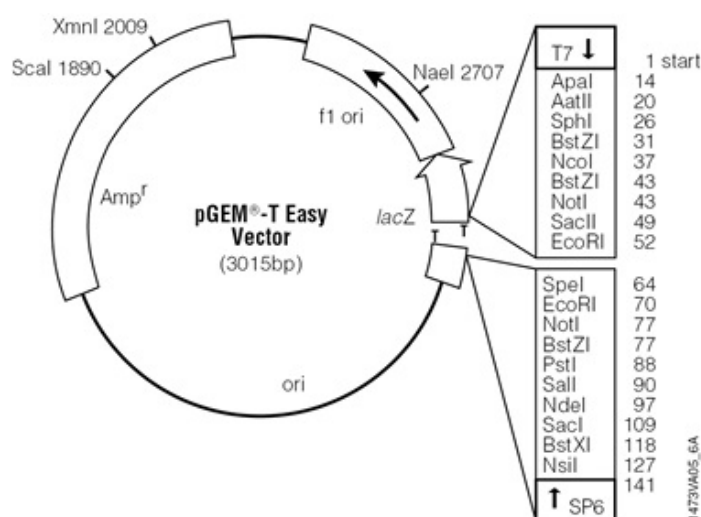
4.1.5 Bakteriální kmeny

- *Streptomyces griseus* CCM 3178 – producent streptomycinu, při optimalizaci PCR byl použit jako pozitivní kontrola obsahující geny kódující aminoglykosid acetyltransferázu, aminoglykosid fosfotransferázu a L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázu
- *Streptomyces fradiae* CCM 3174 – producent neomycinu a tylosinu, při optimalizaci PCR byl použit jako pozitivní kontrola obsahující geny kódující aminoglykosid acetyltransferázu, aminoglykosid fosfotransferázu, L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázu, 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntázu, PKS I a rRNA metyltransferázu
- *Streptomyces stelliscabiei* DSM 41803 - při optimalizaci PCR byl použit jako pozitivní kontrola obsahující gen kódující aminoglykosid acetyltransferázu
- *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 – producent auricinu, při optimalizaci PCR byl použit jako pozitivní kontrola obsahující gen kódující PKS II
- *Streptomyces lincolnensis* DSM 40355 - při optimalizaci PCR byl použit jako pozitivní kontrola obsahující geny kódující rRNA metyltransferázu
- *Escherichia coli* JM109 – použit jako recipientní kmen pro transformaci

4.1.6 Vektory

- **pGEM-T Easy Vector**

Systém pGEM-T Easy se využívá ke klonování PCR produktů. Jedná se o linearizovaný vektor s přesahujícími thymidiny na obou 3' koncích, které umožňují vnesení produktu do vektoru a zvyšují účinnost ligace zabráněním recirkularizace. Inzercí ampliconu dochází k přerušení genu *lacZ* kódujícího β -galaktosidázu. Vektor nese rezistenci k ampicilinu, která slouží k selekci transformovaných bakterií. Součástí vektoru jsou také místa nasedání primerů pUCM13F a pUCM13R (jejich sekvence jsou uvedeny v tab. 3). Pozice přímého primeru na mapě vektoru (obrázek 6) je od iniciačního místa transkripce T7 RNA polymerázy v pozici 2949-2972, zpětný primer nasedá na nukleotidy v pozicích 176-197.



Obr. 6: Schéma vektoru pGEM[®]-T Easy (převzato z <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems>)

4.1.7 Popis lokalit

Pro optimalizaci primerů na environmentálních vzorcích byla vybrána DNA izolovaná ze tří lokalit – Zakopaná (ZA), Ruzyně (RU) a Třeboň. Z Třeboně byly použity dva vzorky, odebrané z organického (TR-O) a z minerálního (TR-M) půdního horizontu.

Cílovým územím vybraným k provedení závěrečných experimentů byly Jizerské hory, konkrétně oblast vrcholu Paličnick (944 m.n.m.). Odebrané půdní vzorky pocházejí z míst, jejichž nadmořská výška se pohybuje mezi 635 a 680 m.n.m. Průměrný roční úhrn srážek je v této oblasti zhruba 1200 mm a průměrná roční teplota se pohybuje mezi 4 a 7 °C (Remrová & Císlerová, 2010). Zájmovými lokalitami byla dvě stanoviště lišící se stromovým patrem –

bukový les charakterizovaný bukem lesním a smrkový les tvořený monokulturou smrku ztepilého. Klimatické podmínky obou lesů jsou totožné. Dominantním půdním typem je pro bukové stanoviště kambizem, pro smrkové stanoviště kryptopodzol. Společným znakem obou lokalit je kyselost jejich půd – půdy smrkového lesa jsou mírně kyselější (pH $4,72 \pm 0,17$) než půdy lesa bukového (pH $5,66 \pm 0,17$) (Bradová *et al.*, 2015). Odběry byly provedeny v září 2015 z půdních profilů obou stanovišť. Vzorky byly odebrány celkem z pěti horizontů – L (opadový), F (fermentační), H (humusový), A (organo-minerální) a B (minerální). Průměrné hloubky horizontů bukového lesa jsou pro L 0-2,5 cm, F 2,5-5,1 cm, H 5,1-8,4 cm, A 8,4-11,2 cm a pro B od 11,2 cm směrem do hloubky. Pro smrkový porost byly průměrné hloubky porostů následující: L 0-2,6 cm, F 2,6-5,3 cm, H 5,3-8,9 cm, A 8,9-12,2 cm a B 12,2 cm a hlouběji.

4.2 Metody

4.2.1 Extrakce environmentální DNA z půdy

Extrakce DNA byla provedena podle protokolu Ságová-Marečková *et al.* (2008). Do 2 ml šroubovacích zkumavek bylo naváženo 0,5 g směsi skleněných kuliček o průměru 0,1 mm a 0,5 mm (1:1). Po sterilizaci zkumavek do nich bylo odváženo 0,5 g půdního vzorku.

Následně bylo do zkumavek přidáno 600 μ l Müllerova extrakčního pufru a 300 μ l směsi fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Zkumavky byly vloženy do mlýnku 3110 BX Mini-BeadBeater-1 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA), ve kterém po dobu 2 minut při 2500 kmitech za minutu proběhla desintegrace buněk a homogenizace. Vzorky byly poté odstředěny v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5418 (Eppendorf, Hamburk, Německo) 2 minuty při $16\,000 \times g$ a vzniklý supernatant byl odebrán do čistých 2 ml zkumavek. Do původních zkumavek s půdními vzorky bylo přidáno 300 μ l Müllerova pufru a vzorky byly v mlýnku homogenizovány po dobu 30 sekund při 2500 kmitech za minutu. Poté byly zkumavky vloženy do centrifugy, a stejně jako v předchozím případě byly vzorky centrifugovány 2 minuty při $16\,000 \times g$. Odstředěný supernatant byl odebrán a smíchán se supernatantem z předchozího kroku.

K supernatantu byl přidán stejný objem směsi fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Vzorky poté byly důkladně promíchány a centrifugovány při $6000 \times g$ po dobu 5 minut. Do čistých zkumavek byl odebrána vodná fáze, která byla na termobloku zahřáta na $65\,^{\circ}\text{C}$. Do každé zkumavky byl přidán 5M roztok chloridu sodného na výslednou koncentraci

1,5 M a dále 10% CTAB na výslednou koncentraci 1 %. Vzorky byly 30 minut inkubovány na termobloku při teplotě 65 °C a poté ochlazeny na ledu na teplotu zhruba 20 °C. Následně byl přidán chloroform o objemu stejném jako byl objem vzorku. Po promíchání byly zkumavky vloženy do centrifugy na 15 minut při 3500×g a vodná fáze byla pak odebrána do nové zkumavky. K ní bylo přidáno 10 % objemu 3M roztoku octanu sodného (pH 5) a 60 % objemu izopropylalkoholu. Vzorky byly promíchány a poté inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. V chlazené centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf) byly po uplynutí této doby vzorky odstředěny po dobu 20 minut při 10 000×g a teplotě 4 °C.

Po proběhlé centrifugaci byly vzorky zbaveny supernatantu a peleta byla promyta 50 µl vychlazeného 70% etanolu. Opět byla provedena centrifugace při 4 °C, tentokrát po dobu 5 minut při 10 000×g. Etanol byl odlit a peleta byla vysušena ve vakuovém koncentrátoru CentriVap (Labconco, Kansas City, MO, USA) při 40 °C. Peleta byla následně rozpouštěna v 30 µl destilované vody po dobu 60 minut při teplotě 65 °C. Nakonec byl k objemu vzorku přidán stejný objem 1M roztoku chloridu vápenatého v 1M pufru HEPES (pH 8), a směs byla ponechána po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla DNA přečištěna pomocí kitu GENE CLEAN® Turbo.

Přečištění bylo provedeno podle protokolu výrobce. K vzorku byl přidán roztok GeneClean Turbo Salt Solution o pětinasobném objemu, vzorky byly promíchány a objem jednotlivých zkumavek byl přenesen na přečišťovací kolonku se sběrnými zkumavkami. Ty byly centrifugovány přibližně 5 sekund při 14 000×g. Obsah sběrných zkumavek byl slit a na filtr kolonky bylo nanášeno 500 µl roztoku GeneClean Turbo Wash. Vzorky byly znovu 5 sekund centrifugovány při 14 000×g. Obsah sběrných zkumavek byl opět vylit a promytí bylo ještě jednou zopakováno. Po vylití obsahu zkumavek byly ještě vzorky 4 minuty centrifugovány při 14 000×g, čímž byl z kolonek odstředěn zbylý roztok. Kolonky byly následně přeneseny do čistých mikrozkušek a na filtr se nanášelo 50 µl roztoku GeneClean Turbo Elution Solution. Vzorky byly 5 minut ponechány při laboratorní teplotě. Následovalo poslední stočení v centrifuze po dobu 1 minuty při 14 000×g. Tím byla izolovaná DNA uvolněna do mikrozkušky, která byla poté uložena do -80 °C.

4.2.2 Extrakce DNA z čistých kultur

Bakteriální kmeny byly z pevného GYM média přeneseny do tekutého YEME média. Kultivace v tekutém médiu probíhala při teplotě 28 °C a třepání 200 rpm po dobu 48 hodin.

Kultury byly poté přeneseny do 2 ml zkumavek, ve kterých bylo po uplynutí 2 minut při 10 000×g v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5418 (Eppendorf) odstředěno veškeré médium. Z pelety buněk byla následně DNA izolována pomocí kitu Wizard® Genomic DNA Purification Kit, postup byl oproti protokolu výrobce mírně modifikován.

Do 2 ml zkumavek se šroubovacím víčkem bylo odváženo 250 mg skleněných kuliček o průměru 0,1 mm a 250 mg kuliček o průměru 0,5 mm. Po sterilizaci zkumavek s kuličkami do nich byla přidána suspenze buněk v 600 µl Nuclei Lysis Solution. Obsah buněk byl v mlýnku homogenizován při 4 600 kmitech za minutu po dobu 5 minut. Následně byly vzorky 2 minuty centrifugovány při 14 000×g. Supernatant byl odebrán do čistých zkumavek a v termobloku zahřát na 80 °C po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby byly vzorky zchlazeny na laboratorní teplotu a poté k nim byly přidány 3 µl RNase Solution. Vzorky byly promíchány a poté 30 minut inkubovány při teplotě 37 °C. Vzorky byly zchlazeny na laboratorní teplotu a přidalo se k nim 200 µl Protein Precipitation Solution. Zkumavky byly několik sekund intenzivně promíchány na vortexu. Poté byly inkubovány na ledu po dobu 5 minut a centrifugovány 3 minuty při 14 000×g. Supernatant byl odebrán do čistých zkumavek, do kterých bylo přidáno 600 µl isopropylalkoholu. Vzorky byly promíchány a následně odstředěny v centrifuze za teploty 4 °C po dobu 5 minut při 14 000×g. Supernatant byl slit a peleta byla promyta 500 µl 80% etanolu. Vzorky byly opět centrifugovány při teplotě 4 °C po dobu 5 minut a při 14 000×g. Etanol se slil a pelety byly vysušeny ve vakuovém koncentrátoru CentriVap (Labconco) při 40 °C po dobu přibližně 15 minut. Do zkumavek bylo přidáno 100 µl TE⁻¹ pufru a vzorky se nechaly 60 minut při 65 °C rozpouštět v termobloku. Vzorky byly nanесeny na elektroforézový gel pro zjištění výtěžku. Koncentrace DNA a její čistota byla rovněž změřena na spektrofotometru NanoPhotometer (Implen, Mnichov, Německo). Koncentrace je na přístroji stanovena na základě absorbance při vlnové délce 260 nm. Kontaminace proteiny či rozpouštědly (např. fenolem) je dána poměry absorbancí při specifických vlnových délkách - A260/A280 a A260/A230. V případě čistoty vzorků se hodnota poměru A260/A280 pohybovala okolo 1,8 a hodnota A260/A230 okolo 2. Vzorky byly následně uloženy do -80 °C.

4.2.3 Elektroforéza

Účelem elektroforézy v agarózovém gelu bylo ověření správnosti izolace DNA a PCR reakcí. K přípravě 1% agarózového gelu bylo smícháno 50 ml TAE pufru a 0,5 g agarózy. Agaróza byla v mikrovlnné troubě rozpuštěna a poté byla pod tekoucí vodou zchlazena na

teplotu přibližně 55 °C. K rozpuštěné agaróze bylo přidáno 5 µl barviva SYBR® Safe DNA Gel Stain (dodávané jako 10 000× koncentrovaný roztok v DMSO), které bylo naředěno v DMSO v poměru 1:9. Roztok byl nalit do formy a poté byl přibližně 30 minut ponechán při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforézové vaničky s TAE pufrem tak, aby celý gel byl ponořený. Při ověřování výsledků izolace byl do každé jamky nanesen 1 µl vzorku DNA smíchaný s 2 µl pufru Yellow load. Při ověřování produktu PCR reakcí byly nanесeny 2 až 3 µl vzorku. Do jedné jamky v gelu bylo nanесeno 5 µl markeru GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder, který slouží k odhadu délky a množství fragmentu ve vzorku DNA. Po nanесení všech vzorků byla spuštěna elektroforéza při konstantním napětí 100 V a proudu 95 mA po dobu zhruba 20 minut. Gel byl následně detekován pod UV světlem, snímek gelu byl pořízen pomocí programu GeneSnap 7.12.

4.2.4 Polymerázová řetězová reakce

Pro PCR reakce byly použity dva typy DNA polymeráz, DreamTaq™ DNA polymeráza a GoTaq® DNA polymeráza. Složení reakční směsi se lišilo podle použité polymerázy, viz tabulky 5 a 6. Podmínky reakcí v termocykléru C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) byly optimalizovány podle jednotlivých primerů. Jednotlivé směsi byly namíchány do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml.

Tab. 5: Složení PCR reakce s DreamTaq™ DNA polymerázou

Složka (vstupní koncentrace)	Objem 1 reakce	Výsledná koncentrace
dH ₂ O	16,65 µl	
10X DreamTaq Buffer	2,5 µl	1X
DMSO	1,25 µl	
dNTP (10 mM)	1 µl	0,4 mM
Přímý primer (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Zpětný primer (10 µM)	1 µl	0,4 µM
DreamTaq DNA Polymerase (5 u/µl)	0,6 µl	3 U
DNA	1 µl	10-50 ng
Celkový objem	25 µl	

Tab. 6: Složení PCR reakce s GoTaq® DNA polymerázou

Složka (vstupní koncentrace)	Objem 1 reakce	Výsledná koncentrace
dH ₂ O	13,125 µl	
5X Colorless GoTaq Reaction Buffer	5 µl	1X
DMSO	1,25 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	2 mM
dNTP (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
Přímý primer (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Zpětný primer (10 µM)	1 µl	0,4 µM
GoTaq DNA Polymerase (5 u/µl)	0,125 µl	1,25 U
DNA	1 µl	10-50 ng
Celkový objem	25 µl	

4.2.5 Navrhování primerů

Pro návrh primerů byly z veřejných databází získány aminokyselinové i nukleotidové sekvence vybraných enzymů, respektive kódujících genů. Po shromáždění všech sekvencí byly pomocí funkce Muscle v programu MEGA 6.06 vytvořeny alignmenty. Ve stejném programu byly alignmenty sekvencí podrobeny fylogenetické analýze. Za pomoci metody maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood) byl sestrojen fylogenetický strom. Na základě podobností byly sekvence rozděleny do jednotlivých větví, čímž byla získána představa o fylogenezi jednotlivých genů a byl tak usnadněn návrh primerů. V případě velké heterogenity sekvencí nebyly v alignmentu konzervované úseky o dostatečné délce, a proto bylo nutné specifikovat skupinu organismů, pro kterou budou primery navrženy. K tomu bylo využito rozdělení fylogenetického stromu do několika klastřů. Jako předloha pro primery byl preferován klastř, jenž obsahoval sekvence s ověřenou funkcí.

Při samotném navrhování primerů bylo využito několik programů. Jedním z nich byl CEMAsuite 2.0.9 (Lane *et al.*, 2015), který na základě alignmentu více sekvencí (multiple sequence alignment) vyhledává konzervované oblasti. Podle alignmentů aminokyselinových a příslušných nukleotidových sekvencí byl program schopen za pomoci několika algoritmů vyhodnotit jednotlivé pozice. Po nastavení požadovaných parametrů byly nalezeny

konzervované úseky vhodné k návrhu primerů. V CEMAsuite bylo také ověřeno, zda oligonukleotidy netvoří sekundární struktury. Dalším z programů byl Primrose 2.17 (Ashelford *et al.*, 2002), který nalézá oligonukleotidy společné pro soubor vybraných nukleotidových sekvencí. Program po vložení cílových sekvencí a po nastavení požadované délky primeru a maximálního počtu degenerovaných bází identifikoval několik oligonukleotidů komplementárních s výchozím souborem sekvencí. Primrose také určil základní vlastnosti (např. teplotu tání nebo zastoupení GC párů) a specifitu potenciálních primerů. Kombinace výše uvedených programů spolu s editorem sekvencí BioEdit 7.2.6.0 (Hall, 1999) umožnila výběr vhodných primerů, které se daly podrobit dalšímu testování *in silico*.

Pokud nebyly vlastnosti primerů stanoveny v některém z uvedených programů, bylo využito nástroje OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>), který určil teplotu tání a případnou tvorbu dimerů či vlásenek oligonukleotidů. Důležitou hodnotou byla v tomto případě změna Gibbsovy volné energie ΔG potenciálních sekundárních struktur. Dimery a vlásenky všech vybraných primerů měly kladnou, případně mírně zápornou hodnotu ΔG . Sekvence zpětného primeru byla převedena v programu ReverseComplement 1.8 (Ashelford *et al.*, 2002). Specifita jednotlivých kombinací přímého a zpětného primeru byla ověřena programem OligoCheck 1.0 (Ashelford *et al.*, 2002). Oligonukleotidy byly poté dodány firmou Sigma-Aldrich.

4.2.6 Optimalizace podmínek PCR amplifikace

Navržené primery byly po testování *in silico* použity pro amplifikaci s genomickou DNA, jež byla izolována ze sbírkových kmenů, u kterých byla ověřena přítomnost daného genu. Pokud byly navrženy primery s více variantami přímého nebo zpětného primeru, byly použity všechny možné kombinace. Vybrané kombinace v případě amplifikace úseku genu pro aminoglykosid acetyltransferázu byly přizpůsobeny rozdílným teplotám tání primerů.

Složení reakční směsi pro PCR reakce je uvedeno v tabulkách 5 a 6. Tabulka 5 sloužila jako návod k přípravě reakce s primery pro amplifikaci aminoglykosid acetyltransferázy, ostatní reakce probíhaly dle tabulky 6. Protokoly PCR reakce s navrženými primery se také lišily podle použité polymerázy a jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8. Teplota nasedání primerů byla optimalizována pro každý pár primerů zvlášť.

Tab. 7: Protokol PCR reakce s DreamTaq™ DNA polymerázou

Krok	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	94 °C	5 min	1×
Denaturace	94 °C	30 s	35×
Nasednutí primerů	56-68 °C	50 s	
Syntéza	72 °C	30 s	
Závěrečná syntéza	72 °C	7 min	1×

Tab. 8: Protokol PCR reakce s GoTaq® DNA polymerázou

Krok	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C	2 min	1×
Denaturace	95 °C	30 s	35×
Nasednutí primerů	56-68 °C	50 s	
Syntéza	72 °C	30 s	
Závěrečná syntéza	72 °C	5 min	1×

Byly rovněž optimalizovány podmínky PCR reakcí s primery, které byly převzaty z publikací. Reakce s primery strA_F a strA_R byla ověřena na DNA ze *Streptomyces griseus* a *Streptomyces fradiae*, DOI-f a DOI-r na DNA ze *Streptomyces fradiae*. Reakční směs s párem strA_F a strA_R byla připravena podle tab. 5, s párem DOI-f a DOI-r podle tab. 6. Protokol uvedený v tab. 7 byl aplikován pro reakční směs se strA_F a strA_R. V publikaci byla pro PCR použita teplota nasedání primerů 63 °C, pro optimalizaci bylo proto vyzkoušeno několik teplot blízkých této teplotě - v rozmezí 59 až 64,5 °C. Reakce s primery DOI-f a DOI-r probíhaly dle tab. 8. Teplota nasedání primerů uvedená v publikaci byla 54 °C, vzhledem k úpravám primerů byla ovšem amplifikace testována za vyšších teplot, v rozmezí 56 až 66 °C.

Pokud byla specifita PCR reakcí u sbírkových kmenů dostatečná a vznikal tedy produkt o správné velikosti, byly primery použity pro amplifikaci s půdní DNA a výsledné amplicony byly následně sekvenovány.

Další primery určené ke kvantifikaci digitálním PCR byly rovněž otestovány na chromozomální DNA sbírkových kmenů, konkrétně páry DKF a DKR08 na *Streptomyces fradiae*, ks2f a ks2r na *Streptomyces aureofaciens* a dále rB1f a rB1r na *Streptomyces fradiae* a *Streptomyces lincolnensis*. K amplifikaci byla použita GoTaq[®] DNA polymeráza (obsah reakční směsi je uveden v tab. 6), posléze proběhlo testování s reakční směsí pro ddPCR (tab. 13). Pro primery byly nastaveny podmínky PCR reakcí podle publikací, úprava podmínek byla provedena pouze u protokolu pro oligonukleotidy DKF a DKR08, kdy teplota nasedání primerů byla na základě testování několika teplot zvýšena na 69 °C. U těchto primerů již byla v minulosti v naší laboratoři ověřena jejich specifita, a proto nebylo potřeba produkty amplifikace sekvenovat (Kopecký, nepublikováno).

4.2.7 Klonování

Pro klonování byly použity amplikony získané ze vzorků environmentální DNA z lokalit TR-O (Třeboň - organický horizont), TR-M (Třeboň - minerální horizont), ZA (Zakopaná) a RU (Ruzyně), a dále z chromozomální DNA kmene *Streptomyces griseus*. Produkty PCR byly nejprve přečištěny pomocí komerční sady QIAquick[®] PCR Purification Kit, postupovalo se podle návodu výrobce. V některých případech se na elektroforézovém gelu vytvořil nespecifický produkt, který by znehodnotil výsledky sekvenování. Proto bylo potřeba izolovat správný DNA fragment z gelu za pomoci komerční sady Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System.

Pro klonování byla použita komerční souprava pGEM[®]-T Easy Vector System společnosti Promega. Byla namíchána ligační směs, která obsahovala 1 µl vektoru (50 ng), 1 µl T4 DNA ligázy (3 U), 5 µl 2X ligačního pufru a přečištěný produkt v množství, které odpovídalo molárnímu poměru zhruba 5:1 (inert:vektor). Směs byla promíchána a inkubována 60 minut při laboratorní teplotě. Následně byly zkumavky přeneseny na led a bylo přidáno 50 µl kompetentních buněk *Escherichia coli* JM109 (dodávané s pGEM[®]-T Easy Vector). Zkumavky byly 20 minut ponechány na ledu, poté byly na 1 minutu přeneseny do termobloku nastaveného na teplotu 42 °C a nakonec opět zchlazeny na ledu po dobu 2 minut. Vzorky byly přeneseny do sterilních 10 ml zkumavek a bylo k nim přidáno 950 µl SOC média. Zkumavky byly následně inkubovány na rotační třepačce při teplotě 37 °C a 200 rpm po dobu 90 minut.

Vzorky byly vysety na předem připravené misky s LB médiem, ke kterému byl přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml, 0,4 mM roztok IPTG a X-gal do výsledné koncentrace 30 µg/ml. Z každého vzorku byly naočkovány 2 misky, na jednu bylo vyseto 100

μl vzorku a na druhou zbylé buňky po oddělení centrifugací a resuspendování pelety. Misky byly 16 hodin inkubovány při 37 °C. Přepis genu *lacZ* je indukován přítomností IPTG, který uvolňuje lac represor z lac operonu. V případě správného vložení PCR produktu do vektoru se naruší gen *lacZ*, který kóduje β-galaktosidázu. Substrátem tohoto enzymu je X-gal, který se po hydrolýze β-galaktosidázou mění na sloučeninu s modrým zbarvením. Úspěšné vložení inzertu do vektoru je indikováno bílou barvou kolonií, u kterých je kódující sekvence *lacZ* přerušena a gen pro enzym rozkládající X-gal není přepisován.

4.2.8 Koloniová PCR

Z vyrostlých kolonií byly vybrány bílé kolonie, které byly pomocí párátko přeneseny do mikrozkušavek s 5 μl sterilní destilované vody. Mikrozkušavky byly poté vloženy do termocykléru a byl spuštěn denaturační program (zahřátí na 95 °C po dobu 5 min).

Následovala polymerázová řetězová reakce, reakční směs v každé mikrozkušavce byla připravena podle tabulky 9. Jako přímý primer byl použit pUCM13F, zpětným primerem byl pUCM13R. Samotná PCR reakce proběhla v termocykléru podle protokolu uvedeného v tabulce 10. Vzorky byly poté nanášeny na elektroforézový gel, na kterém byla ověřena velikost fragmentů. Pokud byl amplikon vložen do vektoru, vznikl produkt o délce daného inzertu + zhruba 260 bp (délka amplifikované části vektoru). Produkty se správnou velikostí byly podle návodu výrobce přečištěny pomocí komerční sady QIAquick® PCR Purification Kit a následně sekvenovány.

Tab. 9: Složení reakce pro koloniovou PCR

Složka (vstupní koncentrace)	Objem 1 reakce	Výsledná koncentrace
dH ₂ O	14,8 μl	
10X DreamTaq Buffer	2,5 μl	1X
dNTP (10 mM)	0,5 μl	0,2 mM
Přímý primer (10 μM)	1 μl	0,4 μM
Zpětný primer (10 μM)	1 μl	0,4 μM
DreamTaq DNA Polymerase (5 u/μl)	0,2 μl	1 U
DNA	5 μl	
Celkový objem	25 μl	

Tab. 10: Protokol koloniové PCR

Teplota	Čas	Počet opakování
94 °C	5 min	1×
94 °C	1 min	35×
54 °C	50 s	
68 °C	90 s	
68 °C	5 min	1×

4.2.9 Sekvence a zpracování výsledků

Po přečištění byly vzorky přeneseny do 96jamkové destičky a poté odeslány do firmy Macrogen (Macrogen Europe Laboratory, Amsterdam, Nizozemí) k sekvenování. K zpracování dat byl použit program Chromas Lite 2.6.4.0, ve kterém byly sekvence upraveny tak, aby části sekvence vektoru byly odstraněny. Upravené sekvence byly převedeny na FASTA formát a porovnány s databází GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vyhledávacím protokolem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

4.2.10 Real-time PCR

Cílem real-time PCR bylo vyloučení potenciálního působení inhibičních faktorů v humusovém horizontu, které by mohly snižovat účinnost amplifikace. Výsledky kvantifikace stanovené digitálním PCR by tak měly nižší hodnoty a neodpovídaly by reálnému stavu společenstva.

Z bukového i smrkového stanoviště Paličnicku byla vybrána DNA izolovaná ze 2 horizontů (H a A), u kterých bylo prostřednictvím real-time PCR stanoveno množství aktinobakterií s použitím primerů Acti-1154 a Acti-1339. Byla připravena ředící řada, ve které byla templátová DNA z obou horizontů bukového i smrkového porostu ředěna 10×, 100×, 1000× a 10 000×. Celkové složení reakční směsi je uvedeno v tab. 11. Reakce probíhala v přístroji StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) podle protokolu uvedeného v tab. 12.

Tab. 11: Složení reakce pro real-time PCR

Složka (vstupní koncentrace)	Objem 1 reakce	Výsledná koncentrace
dH ₂ O	1,5 µl	
GoTaq qPCR Master Mix	7,5 µl	1X
Přímý primer (10 µM)	0,5 µl	0,3 µM
Zpětný primer (10 µM)	0,5 µl	0,3 µM
DNA	5 µl	0,002-120 ng
Celkový objem	15 µl	

Tab. 12: Protokol real-time PCR

Krok	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1×
Denaturace	95 °C	15 s	45×
Nasednutí primerů	60 °C	30 s	
Syntéza	72 °C	30 s	

V programu StepOne Software v2.2.2 bylo také nutné zkontrolovat křivku tání produktů, která by měla být pro všechny vzorky přibližně stejná a měla by mít jen jeden vrchol.

4.2.11 Digitální PCR

Metodou ddPCR byly stanoveny počty kopií genů pro PKS I (primery DKF a DKR08), PKS II (primery ks2f a ks2r) a metyltransferázu kódovanou genem *erm* (primery rB1f a rB1r). Pro stanovení zastoupení bakterií byl použit přímý primer 16Seu27f se směsí zpětných primerů 783r-a, 783r-b a 783r-c, pro kvantifikaci aktinobakterií byly použity oligonukleotidy Acti-1154 a Acti-1339, v obou případech amplifikující úseky genu pro 16S rRNA. Jejich sekvence jsou uvedeny v tab. 3. Templátem byla DNA izolovaná z Paličnicku.

Byla namíchána reakční směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce 13. Připravená směs měla objem 25 µl, pouze 20 µl pak bylo v generátoru kapek QX200™ Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories) převedeno na emulzi obsahující zhruba 20 000 kapek. Amplifikace templátové DNA následně probíhala v 96jamkové destičce určené pro ddPCR v termocykléru C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). PCR reakce probíhaly podle postupu uvedeného v tabulce č. 14, protokol byl s výjimkou teploty nasedání primerů vždy stejný. Pro

primery rB1f, rB1r a 16Seu27f, 783r-a, 783r-b a 783r-c byla vybrána teplota 56 °C, pro primery Acti-1154, Acti-1339 a ks2f, ks2r 60 °C a v případě primerů DKF a DKR08 se jednalo o teplotu 69 °C.

Po proběhnutí amplifikace byla 96jamková destička se vzorky vložena do Q200™ Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories), ve kterém byla měřena intenzita fluorescence jednotlivých kapek. Výsledná data byla poté analyzována v programu QuantaSoft 1.7.4.0917 (Bio-Rad Laboratories). Výstupem experimentu bylo rozdělení jednotlivých kapek podle intenzity fluorescence na pozitivní (obsahující alespoň jednu kopii cílové DNA) a negativní (neobsahující cílovou DNA). Program automaticky určil hranici mezi pozitivními a negativními kapkami. V případě nepřesného rozdělení kapek (např. z důvodu velkého množství pozitivních kapek) nebyla stanovena hranice automaticky a bylo nutné ji nastavit manuálně. K manuálnímu nastavení bylo možné využít histogram zobrazující četnost kapek při různých intenzitách fluorescence. Program poté z podílu pozitivních kapek určil počet kopií genů na jeden mikrolitr reakční směsi.

Tab. 13: Složení reakce pro ddPCR

Složka (vstupní koncentrace)	Objem 1 reakce	Výsledná koncentrace
dH ₂ O	4 µl	
QX200 ddPCR EvaGreen supermix	10 µl	1X
Přímý primer (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
Zpětný primer (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
DNA	5 µl	0,3-200 ng
Celkový objem	20 µl	

Tab. 14: Protokol ddPCR

Krok	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C	5 min	1×
Denaturace	95 °C	30 s	40×
Nasednutí primerů	56-69 °C	45 s	
Syntéza	72 °C	45 s	
Závěrečná syntéza	72 °C	5 min	1×

5 Výsledky

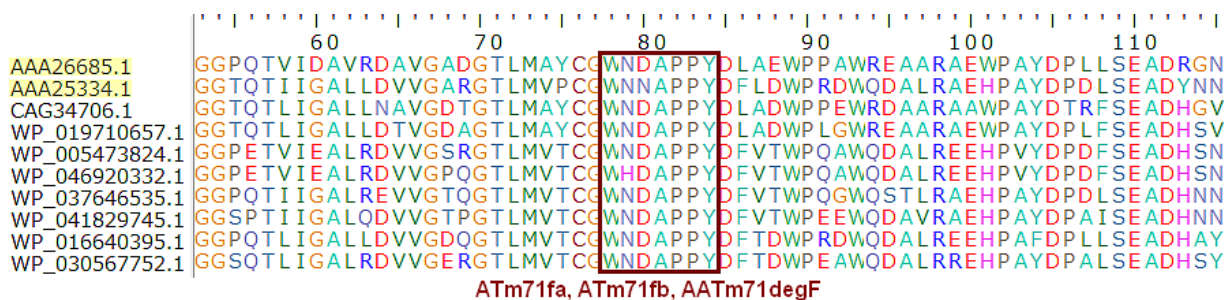
5.1 Návrh primerů

V databázi GenBank byly vyhledány aminokyselinové a nukleotidové sekvence aminoglykosid modifikujících enzymů (aminoglykosid acetyltransferázy a aminoglykosid fosfotransferázy) a enzymů účastnících se biosyntézy aminoglykosidů (L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázy a 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntázy). K vyhledávání byl využit i algoritmus BLAST, který podle enzymů s ověřenou funkcí našel sekvencně podobné proteiny. Následně byla provedena fylogenetická analýza. Pokud byly sekvence příliš heterogenní a rozdělily se do několika klastrů, byly pro návrh primerů preferovány klastry, jež obsahovaly sekvence s potvrzenou funkcí genu. Na základě sestavených alignmentů bylo vytvořeno několik sad primerů pro geny kódující dané enzymy. Seznam těchto oligonukleotidů je uveden v tabulce 15.

Tab. 15: Seznam navržených primerů. Teplota tání T_m byla vypočtena nástrojem OligoAnalyzer 3.1.

Název primeru	T_m (°C)	Délka (bp)	Orientace	Produkt cílového genu
ATm71fa	68,9-71,7	19	přímý	aminoglykosid acetyltransferáza
ATm71fb	66,2-69,4	18	přímý	
AATm71degF	64,9-69,1	17	přímý	
AATm125R	70,7-71,7	17	zpětný	
AATm125degR	69,8-72	17	zpětný	
AATm148R	62,6-71,5	17	zpětný	
AATm183R	63,8-69,2	17	zpětný	
Aph_F1	63,4-69,3	18	přímý	aminoglykosid fosfotransferáza
Aph_F2	60,1-66,6	17	přímý	
Aph_R	67,5-68,1	16	zpětný	
Amitr_F	60,3-61,2	17	přímý	L-glutamine:2-deoxy- <i>scyllo</i> - inosóza aminotransferáza
Amitr_R1	64,9-65,6	16	zpětný	
Amitr_R2	62,7-63,6	15	zpětný	
2DOIS_F	63,2-64,7	17	přímý	2-deoxy- <i>scyllo</i> -inosóza syntáza
2DOIS_R	61,9-62	18	zpětný	

Při navrhování primerů pro amplifikaci části genu kódujícího aminoglykosid acetyltransferázu bylo z databáze GenBank a s pomocí algoritmu BLAST shromážděno celkem 60 sekvencí, u 2 z nich byla heterologní expresí potvrzena jejich funkce. Alignment a sestrojení fylogenetického stromu v programu MEGA rozdělilo sekvence do dvou větších klastrů, z nichž jeden obsahoval oba enzymy s ověřenou funkcí. Tento klast (obsahující 22 sekvencí) byl použit pro následné navrhování primerů. Pro přímé primery byla vybrána konzervovaná oblast začínající na pozici 78 v alignmentu aminokyselinových sekvencí (viz obrázek 7). Byly navrženy 2 varianty – o délce 18 a 19 nukleotidů. Dále byla vytvořena i varianta primeru o 17 nukleotidech s degenerací na 3' konci (AATm71degF). Také byly lokalizovány 3 úseky, které byly vybrány pro návrh zpětných primerů. Jejich pozice v alignmentu je znázorněna na obrázku 8. U primeru začínajícího na pozici 130 v aminokyselinové sekvenci byla také navržena varianta s degenerací na 3' konci.

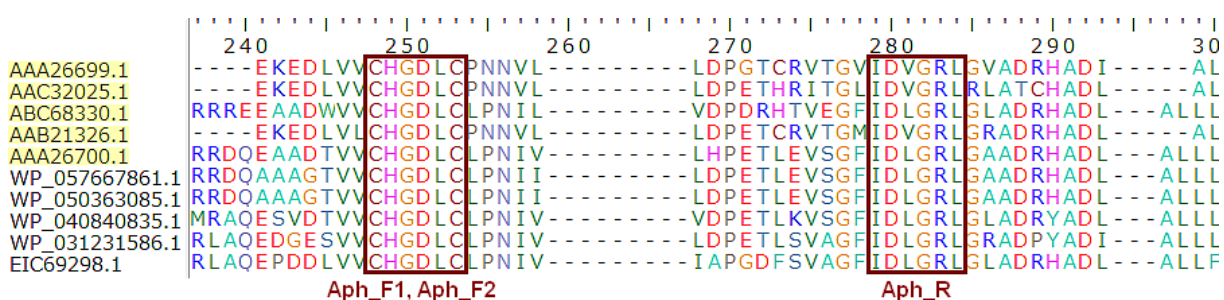


Obr. 7: Alignment aminokyselinových sekvencí aminoglykosid acetyltransferázy s vyznačením sekvence použité pro návrh přímých primerů. Jednotlivé sekvence jsou označeny přístupovými čísly v databázi GenBank. Žlutě zvýrazněné jsou enzymy s ověřenou funkcí.



Obr. 8: Alignment aminokyselinových sekvencí aminoglykosid acetyltransferázy s vyznačením sekvencí použitých pro návrh zpětných primerů. Jednotlivé sekvence jsou označeny přístupovými čísly v databázi GenBank. Žlutě zvýrazněné jsou enzymy s ověřenou funkcí.

Návrh primerů pro amplifikaci části genu kódujícího aminoglykosid fosfotransferázu vycházel z 61 sekvencí vytvářejících ve fylogramu jeden klast, jehož součástí bylo 5 sekvencí s ověřenou funkcí. V sestrojeném alignmentu byly nalezeny 2 úseky, jejichž sekvence byly shledány jako nejvhodnější pro výběr přímého a zpětného primeru. Jejich pozice v alignmentu aminokyselinových sekvencí je zobrazena na obrázku 9, výsledný produkt by tedy měl mít po amplifikaci velikost zhruba 85 bp. Pro optimalizaci teploty nasedání oligonukleotidů na templát byly navrženy 2 přímé primery, z nichž jeden je dlouhý 18 nukleotidů a druhý je o 1 nukleotid zkrácen.



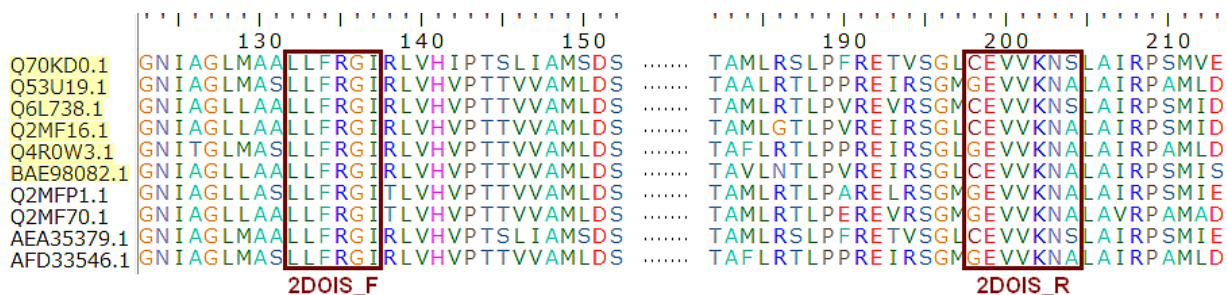
Obr. 9: Alignment aminokyselinových sekvencí aminoglykosid fosfotransferázy s vyznačením sekvencí použitých pro návrh primerů. Jednotlivé sekvence jsou označeny přístupovými čísly v databázi GenBank. Žlutě zvýrazněné jsou enzymy s ověřenou funkcí.

Postup při návrhu primerů pro první gen účastníci se biosyntézy byl stejný jako v předchozích případech. V databázi GenBank bylo nalezeno 30 sekvencí L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázy, z nichž u 6 byla potvrzena enzymatická aktivita. Všech 30 sekvencí použito pro návrh primerů. Alignment ukázal podobnost jednotlivých sekvencí, k následnému testování byly vybrány 2 úseky použitelné pro návrh primerů. Vzdálenost mezi oligonukleotidy byla zhruba 250 nukleotidů (83 aminokyselin). Aby byla teplota tání přímého a zpětného primeru podobná, byla navržena alternativní varianta zpětného primeru o 15 nukleotidech. Obrázek 10 ukazuje jednotlivé sekvence s označenými oblastmi aminokyselin, které sloužily jako předloha pro primery.

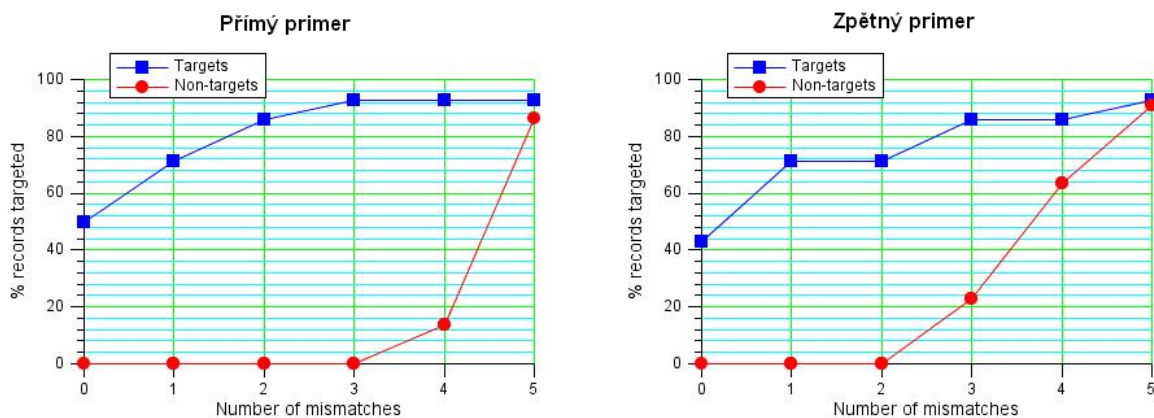


Obr. 10: Alignment aminokyselinových sekvencí L-glutamine:2-deoxy-scyлло-inosóza aminotransferázy s vyznačením sekvencí použitých pro návrh primerů. Jednotlivé sekvence jsou označeny přístupovými čísly v databázi GenBank. Žlutě zvýrazněné jsou enzymy s ověřenou funkcí.

Oligonukleotidy pro amplifikaci části genu kódujícího 2-deoxy-scyлло-inosóza syntázu (2-DOIS) byly navrženy podle alignmentu 14 sekvencí získaných z databáze GenBank, 6 z nich mělo ověřenou funkci. K další optimalizaci byl použit přímý a zpětný primer, který by po PCR měl vytvářet asi 220 bp dlouhý produkt. Aminokyselinové sekvence konzervovaných úseků použitých pro návrh primerů jsou znázorněny na obrázku 11. V tomto případě bylo také nutné vyhledat a shromáždit sekvence genů kódujících 3-dehydroquinát syntázu, enzym šikimátové dráhy katalyzující podobnou reakci jako 2-DOIS. V programu OligoReport byla *in silico* ověřena specifita obou oligonukleotidů. Výstupy z programu (viz obrázek 12) ukazují schopnost nasedání primerů při zvyšujícím se počtu nesprávného párování bází (mismatch).



Obr. 11: Alignment aminokyselinových sekvencí 2-deoxy-scyлло-inosóza syntázy s vyznačením sekvencí použitých pro návrh primerů. Jednotlivé sekvence jsou označeny přístupovými čísly v databázi GenBank. Žlutě zvýrazněné jsou enzymy s ověřenou funkcí.



Obr. 12: Selektivita přímého a zpětného primeru pro 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntázu (modře) a 3-dehydroquinát syntázu (červeně)

5.2 Testování primerů

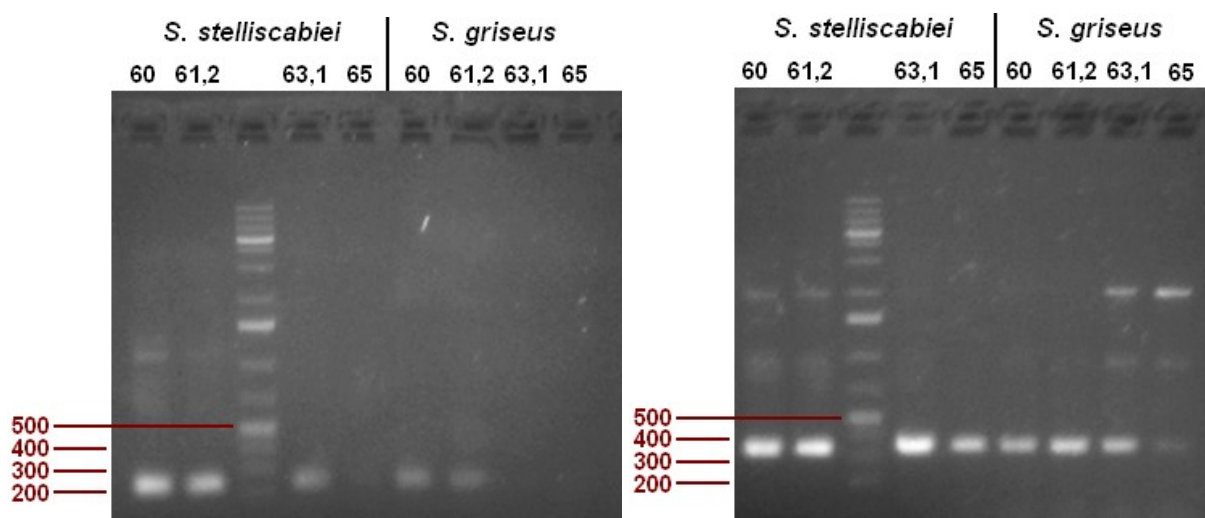
5.2.1 Optimalizace podmínek pro primery

Účelem optimalizace bylo nalezení takových podmínek PCR reakcí, při kterých vznikal v dostatečné koncentraci specifický produkt. Optimalizace podmínek zahrnovala především testování kombinací primerů a teplot nasedání na templátovou DNA (viz tabulka 16).

Tab. 16: Kombinace navržených primerů při ověřování amplifikace. Rozmezí testovaných teplot nasedání primerů je uvedeno ve čtvrtém sloupci. V reakcích byla použita DNA izolovaná z bakteriálních kmenů uvedených v pátém sloupci.

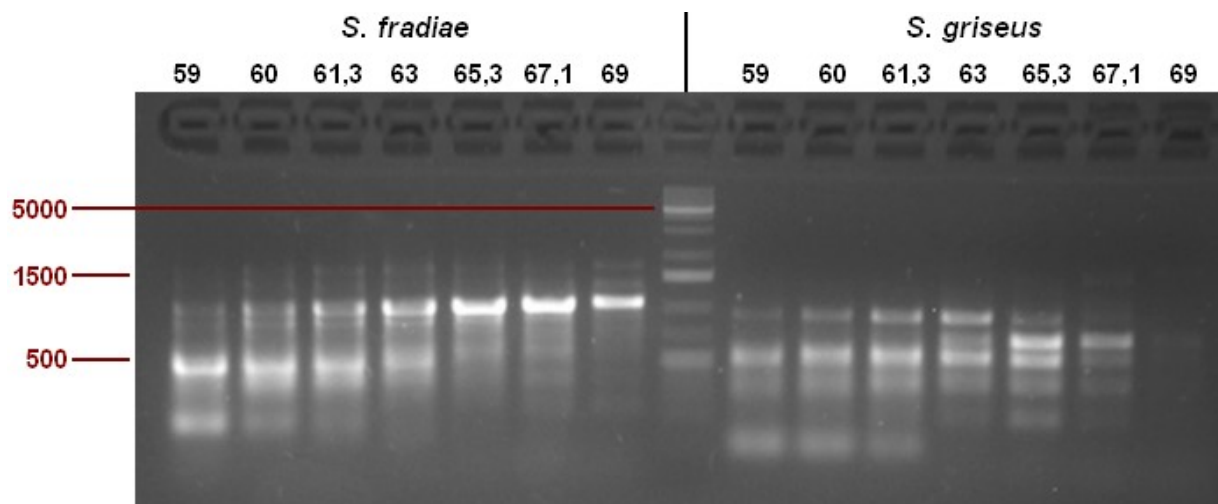
Přímý primer	Zpětný primer	Délka amplikonu	T _{ann}	Sbírkový kmen
ATm71fa	AATm125R	170 bp	56-68 °C	<i>Streptomyces fradiae</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces stelliscabiei</i>
	AATm125degR	170 bp		
ATm71fb	AATm148R	240 bp		
	AATm183R	350 bp		
AATm71degF	AATm125R	170 bp		
	AATm125degR	170 bp		
	AATm148R	240 bp		
	AATm183R	350 bp		
Aph_F1	Aph_R	85 bp	56-66 °C	<i>Streptomyces fradiae</i>
Aph_F2		85 bp		<i>Streptomyces griseus</i>
Amitr_F	Amitr_R1	250 bp	53-67 °C	<i>Streptomyces fradiae</i>
	Amitr_R2	250 bp		<i>Streptomyces griseus</i>
2DOIS_F	2DOIS_R	220 bp	56-66 °C	<i>Streptomyces fradiae</i>

V PCR reakcích s primery pro aminoglykosid acetyltransferázu byly nejprve na sbírkových kmenech otestovány všechny kombinace primerů uvedené v tabulce 16 při teplotách 56 až 68 °C. Elektroforézou byl při porovnání s markerem ověřen vznik produktu o správné velikosti. Reakcí přímých primerů (ATm71fa a AATm71degF) se zpětnými primery AATm125R a AATm125degR nevznikal žádný produkt, případně vznikal produkt větší (cca 700 bp), a proto byly tyto zpětné primery vyloučeny z dalšího testování. Přímý primer ATm71fb včetně varianty s degenerací AATm71degF v kombinaci se zpětnými primery AATm148R a AATm183R dával vznik amplikonům o správné velikosti - 240 bp pro AATm148R a 350 bp pro AATm183R. V dostatečné koncentraci vznikal při amplifikaci s AATm71degF a AATm148R nebo AATm183R u sbírkových kmenů *S. stelliscabiei* a *S. griseus* (obrázek 13). V menší míře docházelo také k nespecifické amplifikaci větších úseků, zejména se zpětným primerem AATm183R. Následovalo testování obou kombinací primerů na DNA izolované z půdy (vzorky TR-O, TR-M, ZA-O a RU). Na gelu bylo zřejmé, že u půdní DNA nedocházelo k amplifikaci žádaného úseku genu, a proto bylo v tomto kroku zkoušení primerů zastaveno.

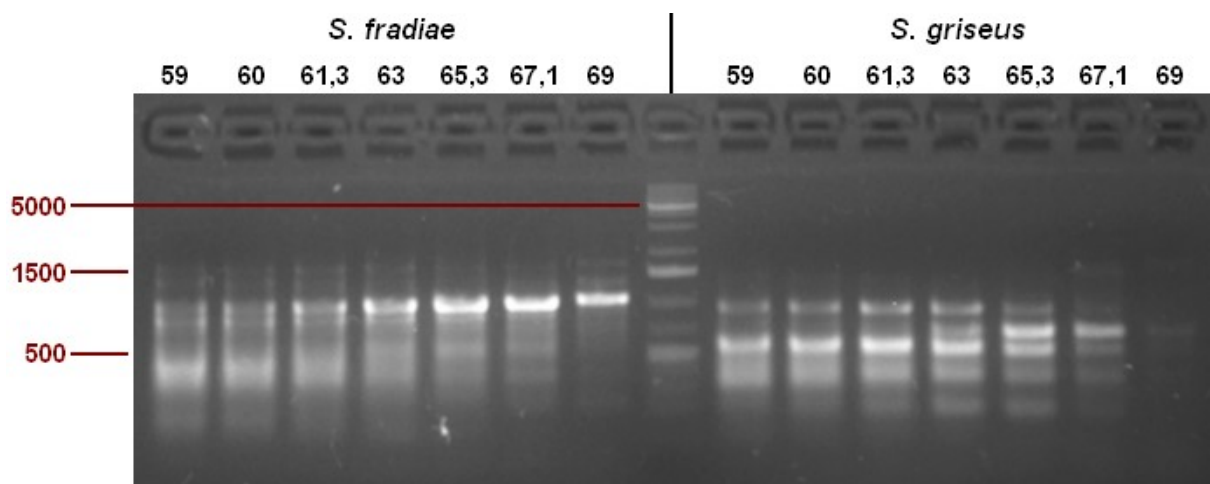


Obr. 13: Elektroforetická separace produktů amplifikace s přímým primerem AATm71degF a zpětnými primery AATm148R (vlevo) a AATm183R (vpravo) v agarózovém gelu

Testování primerů navržených pro aminoglykosid fosfotransferázu (Aph_F1, Aph_F2 a Aph_R) bylo ukončeno po prvních PCR reakcích, při kterých templátem byla DNA izolovaná ze sbírkových kmenů. Ve vysoké koncentraci docházelo totiž k amplifikaci větších úseků genů, výtěžek produktu o velikosti 85 bp byl velmi malý (obrázky 14 a 15).

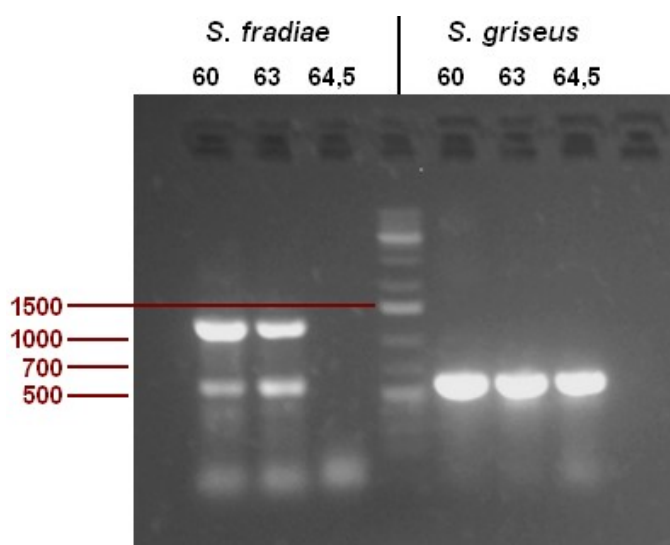


Obr. 14: Elektroforetická separace produktů amplifikace s primery Aph_F1 a Aph_R v agarózovém gelu

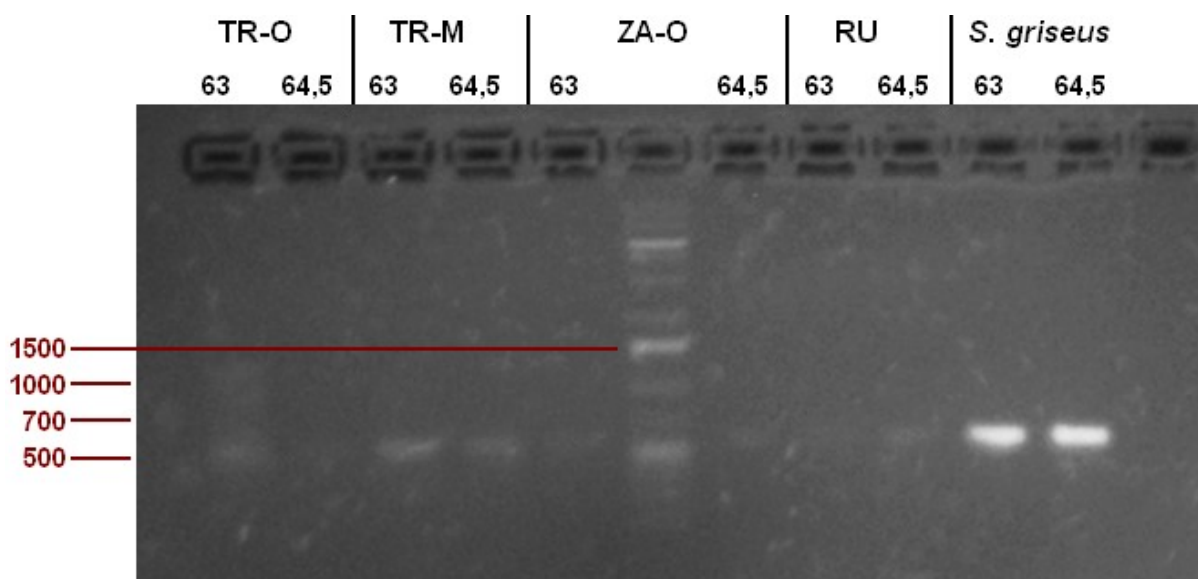


Obr. 15: Elektroforetická separace produktů amplifikace s primery Aph_F2 a Aph_R v agarózovém gelu

Rovněž byla ověřena účinnost PCR s primery převzatými z publikace, strA_F a strA_R, které také amplifikují úsek genu pro aminoglykosid fosfotransferázu. Nejdříve byla otestována amplifikace, při které byla templátem DNA ze sbírkových kmenů *S. fradiae* a *S. griseus*. Amplifikace fragmentu o délce 570 bp probíhala u obou kmenů, v případě *S. fradiae* ovšem docházelo ke vzniku dalšího produktu (o délce přibližně 1200 bp) (obrázek 16). Žádaný produkt vznikl v PCR reakcích provedených na půdních vzorcích (TR-O, TR-M, ZA-O a RU) při teplotách nasedání primerů 63 a 64,5 °C (obrázek 17). Po přečištění byly ke klonování zvoleny vzorky, u nichž proběhlo nasedání primerů při teplotě 63 °C. Ty byly posléze odeslány k sekvenování.

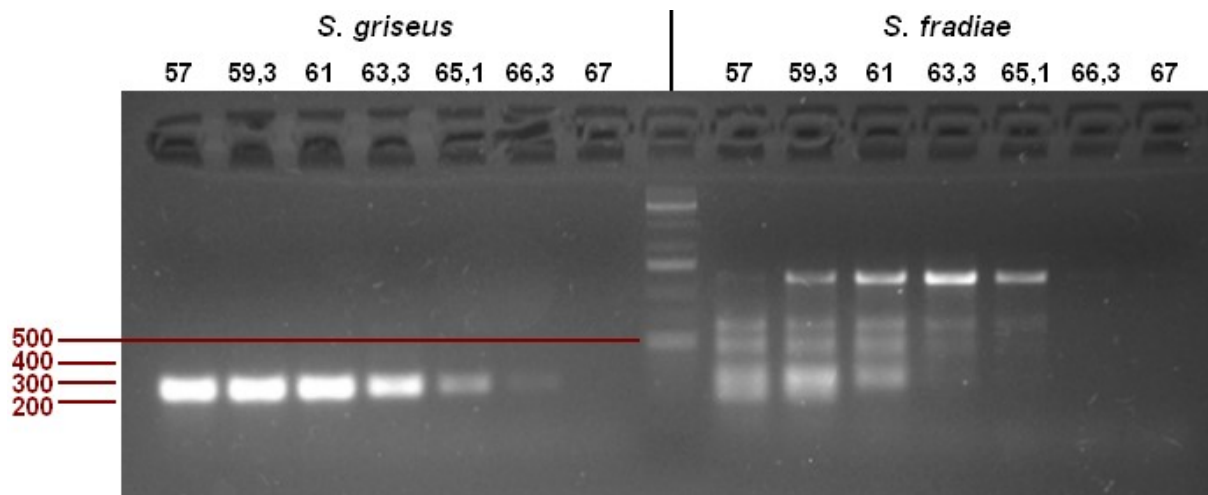


Obr. 16: Elektroforetická separace produktů amplifikace s primery strA_F a strA_R v agarózovém gelu

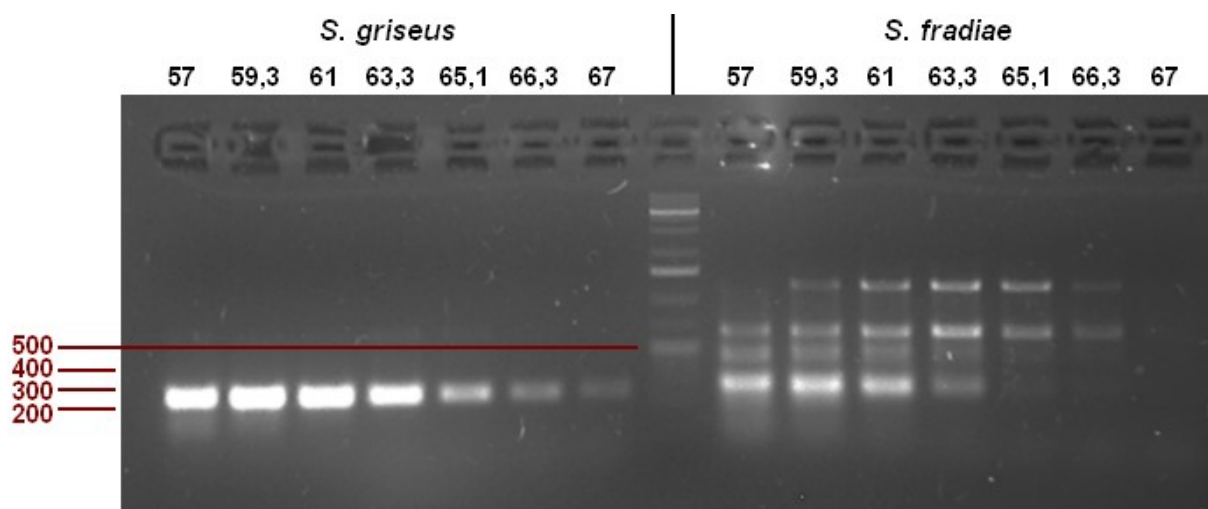


Obr. 17: Elektroforetická separace přečištěných produktů amplifikace s primery strA_F a strA_R v agarózovém gelu

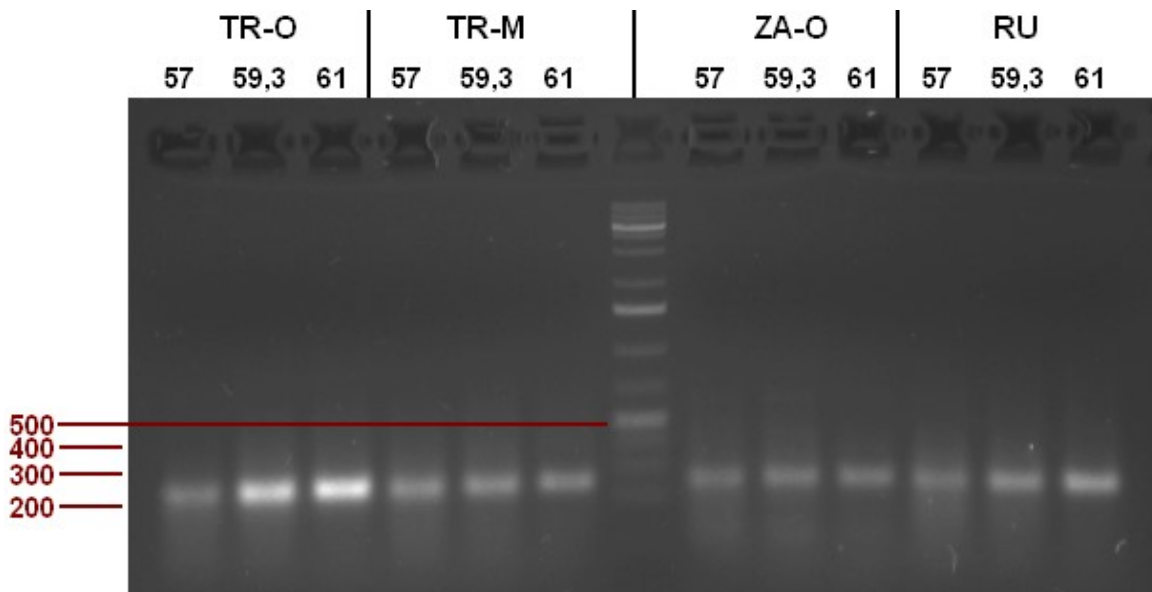
Amplifikace části genu pro L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázu s použitím primerů Amitr_F, Amitr_R1 a Amitr_R2 probíhala nejprve na sbírkových kmenech. Lepších výsledků bylo dosaženo v PCR reakcích, u kterých byla templátovou molekulou DNA ze *S. griseus*. Použití genomové DNA izolované ze *S. fradiae* opět dávalo kromě úseku genu o délce 250 bp také vznik nespecifickým produktům (obrázky 18 a 19). Po otestování teplot nasedání primerů v rozmezí 53 až 67 °C byly v dalších krocích vybrány teploty 57, 59,3 a 61 °C, při vyšších byla amplifikace méně účinná. Vybrané teploty byly použity v PCR s půdními vzorky TR-O, TR-M, ZA-O a RU. V tomto kroku bylo z gelu patrné, že se vytvářel úsek genu pro L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázu o správné velikosti (viz obr. 20). Vyšší čistota produktů s kombinací primerů Amitr_F a Amitr_R2 byla důvodem jejího využití v dalších krocích. Po přečištění vzorků (obrázek 21) bylo provedeno klonování a sekvenace. Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo při teplotě nasedání primerů 61 °C, a proto byly ke klonování vybrány PCR produkty amplifikované při této teplotě.



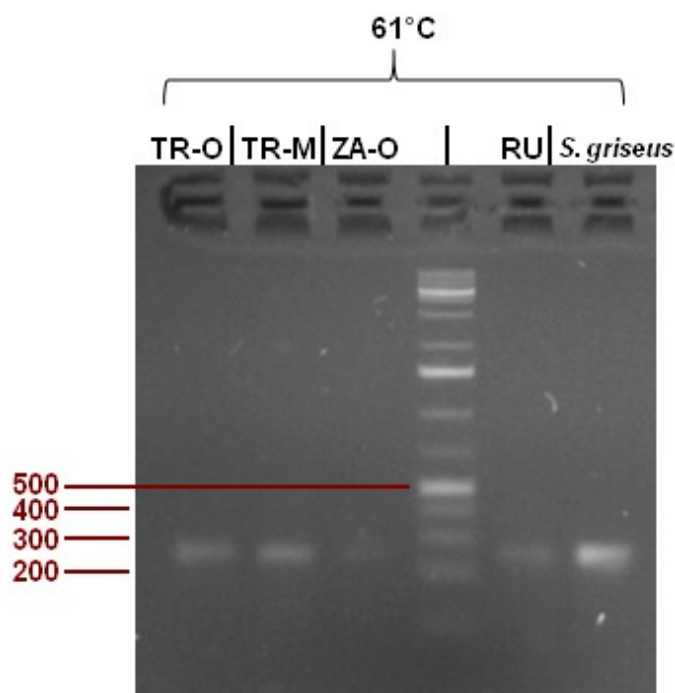
Obr. 18: Elektroforetická separace produktů amplifikace s primery Amitr_F a Amitr_R1 v agarózovém gelu (chromozomální DNA)



Obr. 19: Elektroforetická separace produktů amplifikace s primery Amitr_F a Amitr_R2 v agarózovém gelu (chromozomální DNA)



Obr. 20: Elektroforetická separace produktů amplifikace s primery Amitr_F a Amitr_R2 v agarózovém gelu (půdní DNA)



Obr. 21: Elektroforetická separace přečištěných produktů amplifikace s primery Amitr_F a Amitr_R2 v agarózovém gelu

Optimalizace podmínek pro navržené oligonukleotidy 2DOIS_F a 2DOIS_R probíhala PCR reakcemi s templátovou DNA ze *S. fradiae*. Výsledkem byla tvorba produktů o větší velikosti než bylo očekáváno, a proto tento pár primerů nebyl použit v následných reakcích s půdními vzorky.

Byly také otestovány zkrácené varianty primerů převzatých z publikace, DOI-f a DOI-r. Tyto oligonukleotidy rovněž amplifikují úsek genu kódujícího 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntázu, jejich pozice v genu je ovšem odlišná – u typového kmene *S. fradiae* přímý primer DOI-f nasedá v pozici 417 až 435, zpětný primer DOI-r na 739 až 755. V této práci navržený primer 2DOIS_F nasedá na nukleotidy 354 až 371, 2DOIS_R na 555 až 573. Toto umístění umožnilo provést PCR reakce s jejich kombinacemi, ani v těchto případech ovšem nedocházelo ke vzniku hledaného produktu. Z tohoto důvodu byly všechny primery určené k amplifikaci úseku genu pro 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntázu vyřazeny z dalších experimentů.

5.2.2 Klonování a koloniová PCR

Ke klonování byly vybrány vzorky, u kterých byly primery dostatečně účinné, a byl specificky amplifikován produkt v PCR reakcích s environmentální DNA izolovanou z půdy. Jednalo se o amplifikace s dvojicemi primerů Amitr_F, Amitr_R2 a strA_F, strA_R. Jako pozitivní kontrola byl přidán vzorek s amplifikovaným úsekem z DNA *S. griseus*. Byla provedena selekce klonů, při níž byly z vyrostlých kolonií vybrány kolonie bílé barvy. V případě klonování s primery Amitr_F a Amitr_R2 bylo vybráno celkem 133 kolonií, se kterými proběhla koloniová PCR. Z tohoto množství bylo 96 vzorků následně sekvenováno. K sekvenování byly zvoleny amplikony o požadované délce (zhruba 510 bp).

Postup klonování a následná selekce produktů PCR reakcí s primery strA_F a strA_R byl obdobný. Bylo vybráno 161 bílých kolonií, u kterých byla koloniovou PCR ověřena přítomnost vloženého fragmentu. Jestliže došlo k úspěšné inzerci úseku genu pro aminoglykosid fosfotransferázu, vznikal produkt o délce přibližně 830 bp. 91 vzorků s amplikony této velikosti bylo poté odesláno k sekvenování.

5.2.3 Sekvence a zpracování výsledků

Sekvenací byla ověřena specifita primerů. Jednotlivé sekvence byly po zpracování porovnány pomocí algoritmu BLAST s databází GenBank. Nesmyslné a příliš krátké sekvence byly z porovnávání vyřazeny.

Po vyřazení nevhodných sekvencí bylo s databází porovnáno 92 klonů s fragmentem genu amplifikovaným pomocí primerů Amitr_F a Amitr_R2.

Tab. 17: Výsledky sekvenování klonů s fragmentem genu pro L-glutamin:2-deoxy-scyllo-inosóza aminotransferázu

Lokalita (kmen)	Sekvenované klony	Klony porovnané s databází GenBank	Klony podobné se sekvencí cílového genu z GenBank (identita nad 60 %)
TR-O	21	21	2 (9,5 %)
TR-M	24	22	1 (4,5%)
ZA	23	22	0 (0 %)
RU	23	23	0 (0 %)
<i>S. griseus</i>	5	4	4 (100 %)

Jako pozitivní kontrola sloužila čistá kultura *Streptomyces griseus*. Sekvenováním byla potvrzena přítomnost genu u všech klonů porovnaných s databází GenBank. Podobnost ve srovnání se sekvencemi z databáze byla vysoká, jejich procento shody se pohybovalo od 93 do 98 % a E-hodnota od $3e-24$ do $4e-34$.

U klonů s půdní DNA byla specifita primerů nízká. U 2 klonů z TR-O byl podíl shodných bází více než 60 % ve srovnání se sekvencemi genu pro L-glutamin:2-deoxy-scyllo-inosóza aminotransferázu z databáze. Procento shody bylo v obou případech 62 % a jejich E-hodnoty byly $6e-16$ a $1e-25$. Vyšší sekvenční podobnost i nižší E-hodnoty vykazovaly tyto klony s genem pro aminotransferázu patřící do stejné rodiny, mající ale funkci v primárním metabolismu. Nejvyšší procento shody vykazovaly s aminotransferázami účastnicími se syntézy buněčné stěny (72 a 84 %) s E- hodnotami $2e-19$ a $5e-40$. Vysoká podobnost (pohybující se od 63 do 83 %) s aminotransferázou účastnicí se syntézy buněčné stěny byla identifikována u dalších 7 klonů.

Pouze jeden klon z TR-M měl podíl shodných bází více než 60 % ve srovnání se sekvencí genu kódujícího cílový enzym. Tento klon vykazoval 73% podobnost a E-hodnotu $2e-12$ v porovnání s genem pro L-glutamin:2-deoxy-scyllo-inosóza aminotransferázu z databáze. Vyšší podobnosti bylo ovšem opět dosaženo s genem pro aminotransferázu podílející se na stavbě buněčné stěny – procento shody s klonem bylo 74 % a E-hodnota $3e-23$. Vysoká sekvenční podobnost (více než 70 %) s aminotransferázou podílející se na syntéze buněčné stěny byla potvrzena u dalších 4 klonů pocházejících z TR-M.

Po porovnání klonů pocházejících ze ZA se sekvencemi z databáze nebyla potvrzena amplifikace požadované oblasti genu biosyntézy aminoglykosidů. 13 z 22 klonů vykazovalo více než 50% podobnost s genem kódujícího aminotransferázu mající úlohu v primárním

metabolismu, z nichž u 7 podíl shodných bází převyšoval 73 %. E-hodnoty těchto 13 klonů byly v rozmezí od $9e-24$ do $3e-36$.

Ani sekvence klonů z Ruzyně nevykazovaly relevantní podobnost s žádaným genem. Algoritmem BLAST bylo u 2 klonů zjištěno procento shody více než 50 % se sekvencemi aminotransferázy, jenž má odlišnou funkci a nepodílí se na syntéze aminoglykosidů. Procenta shody těchto 2 klonů ve srovnání s databází byla 57 a 75 % a E-hodnoty $8e-17$ a $5e-22$.

Klonováním amplikonu aminoglykosid fosfotransferázy (primery strA_F a strA_R) bylo získáno 91 sekvencí, z nichž 29 bylo z důvodu nesmyslné sekvence vyřazeno. Zbýlých 62 bylo porovnáno s databází GenBank.

Tab. 18: Výsledky sekvenování klonů s fragmentem genu pro aminoglykosid fosfotransferázu

Lokalita (kmen)	Sekvenované klony	Klony porovnané s databází GenBank	Klony podobné se sekvencí cílového genu z GenBank (identita nad 60 %)
TR-O	21	15	1 (6,7 %)
TR-M	22	14	2 (7,1 %)
ZA	18	11	3 (27,3 %)
RU	25	18	3 (16,7 %)
<i>S. griseus</i>	5	4	4 (100 %)

Vysoká specifita primerů u čisté kultury byla prokázána po sekvenování úseku amplifikovaném v PCR reakci, při které byla templátem DNA ze *Streptomyces griseus*. Všechny 4 klony porovnané s databází vykazovaly více než 80% podobnost se sekvencemi genů pro aminoglykosid fosfotransferázu *S. griseus* (od 81 do 100 %) a E-hodnoty od $2e-62$ do $6e-127$.

U půdních vzorků primery specificky nasedaly na templátovou DNA pouze u malé části klonů. Jediný klon z TR-O vykazoval po porovnání s databází dostatečně vysoký podíl shodných bází se sekvencí genu pro aminoglykosid fosfotransferázu - 86 % (E-hodnota $8e-27$). 7 porovnaných klonů mělo inzertovány amplikony jiných genů, u zbylých 7 nebyla nalezena podobnost s žádným genem z databáze.

Z TR-M bylo celkem porovnáno s databází 14 klonů. Z tohoto množství měly 2 sekvenované klony při porovnání alignmentů algoritmem BLAST více než 60 % nukleotidů na

stejně pozici jako sekvence požadovaného genu anotovaného v GenBank. Jejich podíly shodných bází byly 63 % (E-hodnota $1e-26$) a 80 % (E-hodnota $5e-102$). U 5 klonů nebyla zjištěna podobnost s žádným genem, u dalších 7 byla prokázána podobnost se sekvencemi jiných genů.

Na základě vysoké podobnosti úseků genů inzerovaných do plazmidu ve srovnání s nukleotidovými sekvencemi v databázi byla potvrzena amplifikace genu pro aminoglykosid fosfotransferázu u 3 klonů z lokality ZA. BLAST procentuálně vyjádřil jejich procenta shody jako 83, 86 a 98 %. Specifita primerů byla rovněž determinována jejich E-hodnotami, které byly $4e-77$, $2e-85$ a $3e-110$. U ostatních klonů nebyly primery specifické a nasedaly na jiné geny.

Podíly shodných bází i E-hodnoty 3 klonů s DNA z RU dosahovaly signifikantních hodnot. Nejvyšší podobnost se sekvencí z databáze měl klon, jenž vykazoval 98% podobnost a E-hodnotu $3e-111$. Procento shody zbylých 2 klonů bylo v obou případech 82 %, jejich E-hodnoty se lišily zhruba o 2 řády – měly hodnoty $4e-93$ a $2e-95$. Bez podobnosti s geny z databáze bylo 5 sekvencí fragmentů inzerovaných do vektoru, u zbylých 10 byla nalezena podobnost s jinými geny.

5.3 Real-time PCR

Po provedení potřebných kalibrací bylo výstupem real-time PCR množství DNA v nanogramech na reakci. Křivka tání produktů byla v pořádku. Pokud by v reakci působily inhibitory, poměry ředící řady by neodpovídaly množství DNA v reakci. V H horizontu poměr hodnot klesal přibližně o jeden řád, což odpovídá ředění templátu. Výjimkou bylo ředění $10\ 000\times$ u bukového porostu, kdy bylo množství DNA stanovené real-time PCR $1,02E-06$ ng na reakci, což nekoreluje s ředěním $1000\times$, kdy byla hodnota $8,72E-06$ ng na reakci. Tato nepřesnost byla pravděpodobně způsobena chybou při pipetování, ostatní ředění vzorků H horizontu totiž odpovídala koncentraci templátu. Výstupy z real-time PCR jsou uvedeny v tab. 19.

Tab. 19: Množství DNA stanovené real-time PCR v humusovém a organickém horizontu

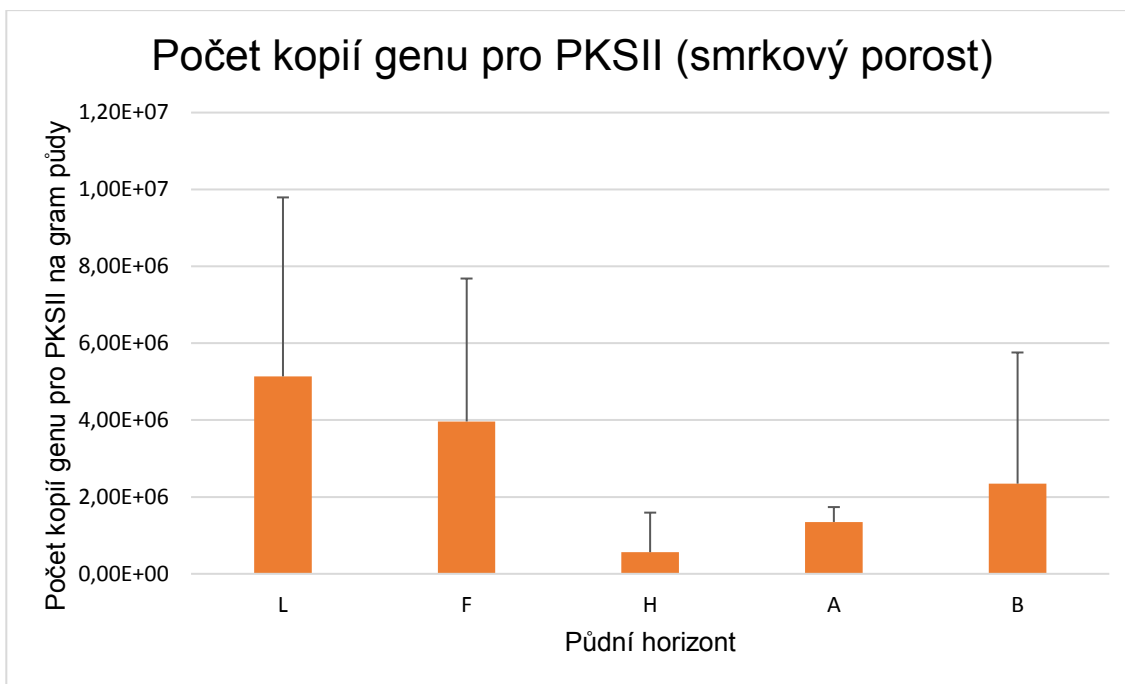
Porost	Ředění	Množství DNA (ng na reakci)	
		H horizont	A horizont
Smrk	10	7,96E-04	3,04E-03
Smrk	100	8,06E-05	2,70E-04
Smrk	1000	4,44E-06	1,09E-05
Smrk	10 000	3,62E-07	1,14E-06
Buk	10	8,12E-04	6,88E-03
Buk	100	7,23E-05	5,35E-04
Buk	1000	8,72E-06	4,24E-05
Buk	10 000	1,02E-06	8,62E-07

5.4 Digitální PCR

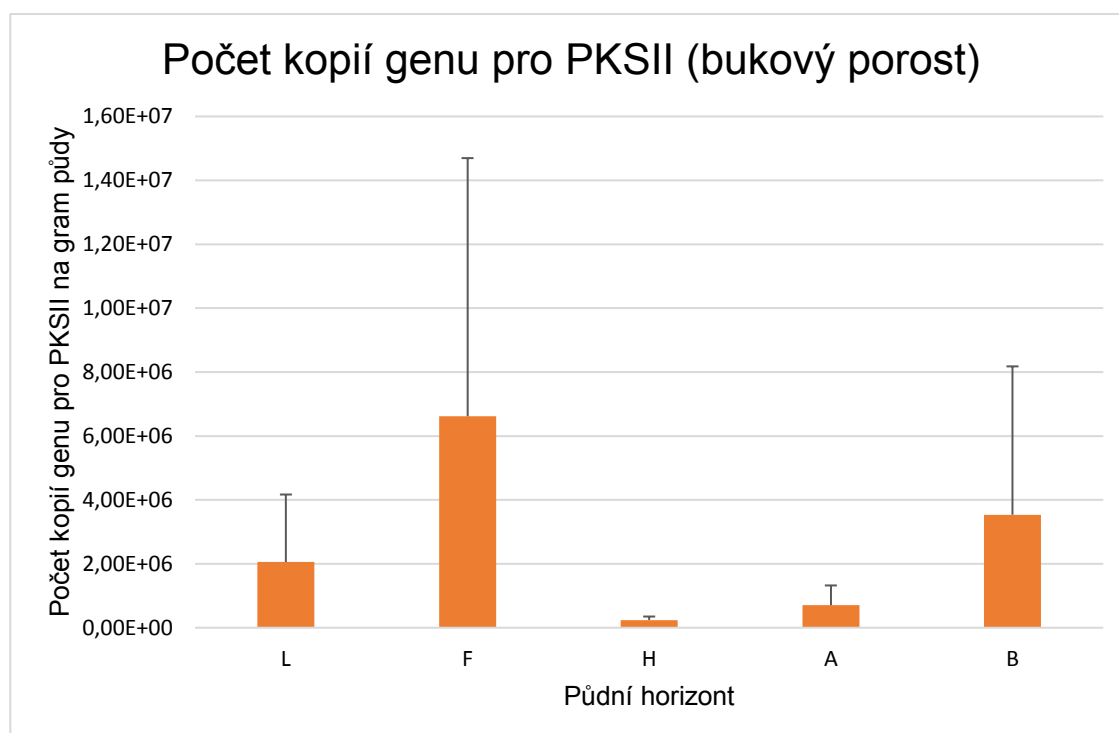
Digitálním PCR byl stanoven počet kopií genů na jeden mikrolitr reakční směsi. Tyto hodnoty byly převedeny na množství kopií genů na gram půdy. Počty kopií genů byly naměřeny pro DNA izolované v sedmi opakováních. Při čtvrtém opakování A a B horizontů bukového porostu nemohly být vzorky z důvodu výskytu kamene v půdě odebrány, a proto bylo pro tyto horizonty provedeno pouze šest opakování. Pro každý horizont byla vypočtena směrodatná odchylka a spolu s ní byla naměřená data zobrazena v grafech.

5.4.1 Kvantifikace genů sekundárního metabolismu

Počty kopií genů sekundárního metabolismu byly stanoveny pro PKSII a metyltransferázu kódovanou genem *erm*. Gen pro PKS I byl po neúspěšných pokusech na digitálním PCR z kvantifikace vyřazen. Důvodem byla vysoká intenzita fluorescence negativních kapek, a z toho plynoucí nedostatečné rozdělení pozitivních a negativních kapek, důsledkem čehož nebylo možné uplatnit model Poissonovy distribuce. Tato chyba byla pravděpodobně způsobena dimery primerů, které se při amplifikaci úseku genu pro PKS I tvořily. Hodnoty pro PKSII a *Erm* metyltransferázu byly spolu se směrodatnými odchylkami vyneseny do grafů (viz obr. 22 a 23 zobrazující počty kopií genů pro PKSII a obr. 24 a 25 zobrazující počty kopií genů pro *Erm* metyltransferázu).

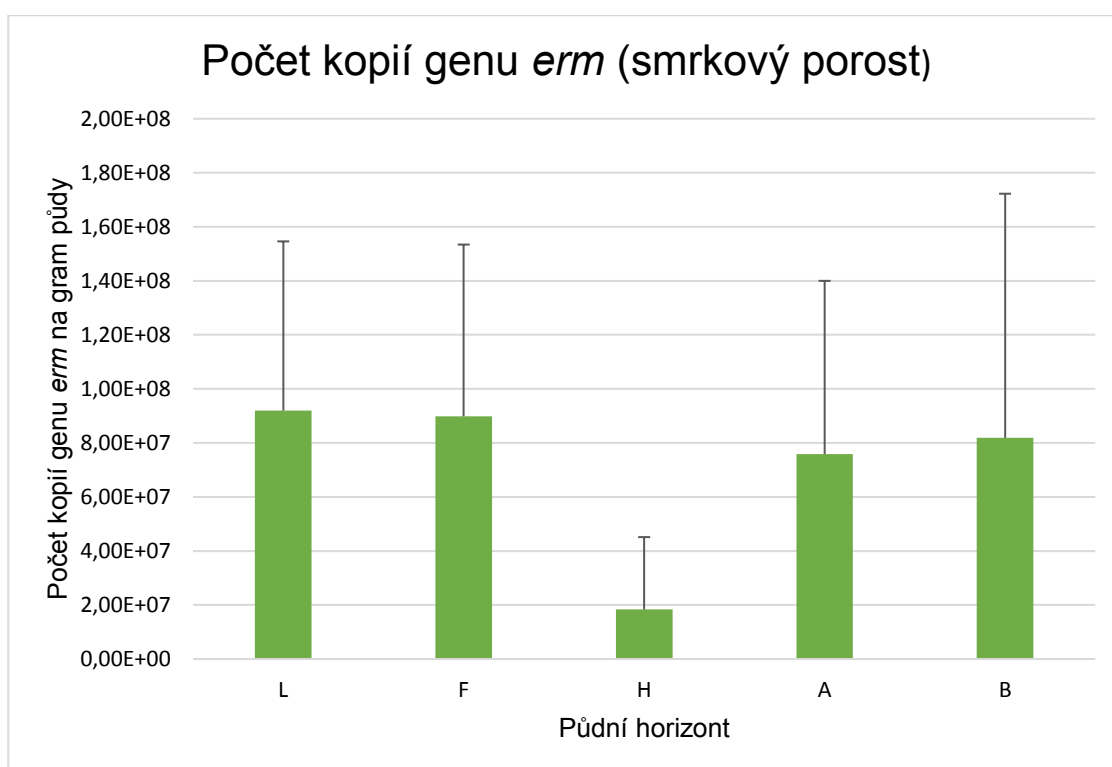


Obr. 22: Graf zobrazující počet kopií genu pro PKSII ve smrkovém porostu. Hodnoty jsou průměrem ze sedmi opakování (n=7), ke kterým byly stanoveny směrodatné odchylky. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

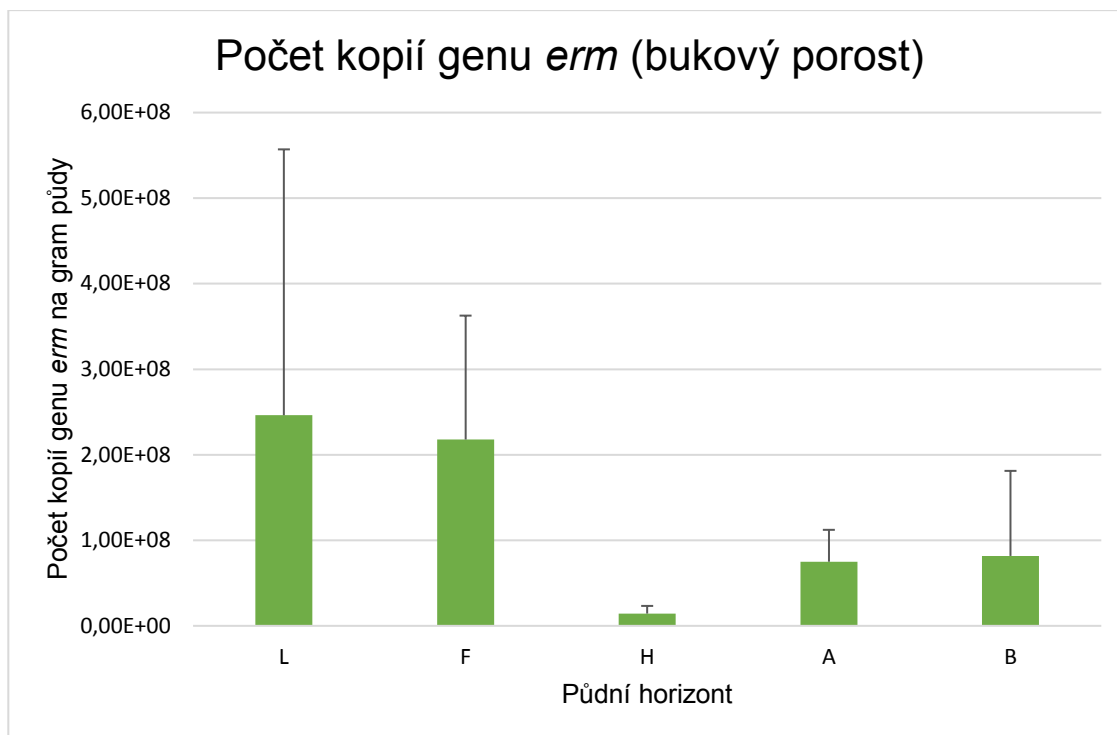


Obr. 23: Graf zobrazující počet kopií genu pro PKSII v bukovém porostu. Pro horizonty L, F a H jsou hodnoty průměrem ze sedmi opakování (n=7), v případě A a B horizontu z šesti opakování (n=6). Ke všem hodnotám byly stanoveny směrodatné odchylky. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

Z obrázků 22 a 23 je možné sledovat opačnou tendenci zastoupení PKSII v L a F horizontu při srovnání smrkového a bukového stanoviště. Zatímco ve smrkovém stanovišti počet kopií klesá od L do H horizontu, u bukového stanoviště se s přechodem do F horizontu počet genů pro PKSII výrazně zvyšuje. Od humusového horizontu je trend obou lokalit obdobný. Pro humusový horizont je typické nízké množství PKSII (až o řád nižší než u ostatních horizontů), směrem do hloubky hojnost producentů polyketidů druhé třídy mírně stoupá.



Obr. 24: Graf zobrazující počet kopií genu pro Erm metyltransferázu ve smrkovém porostu. Hodnoty jsou průměrem ze sedmi opakování (n=7), ke kterým byly stanoveny směrodatné odchylky. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

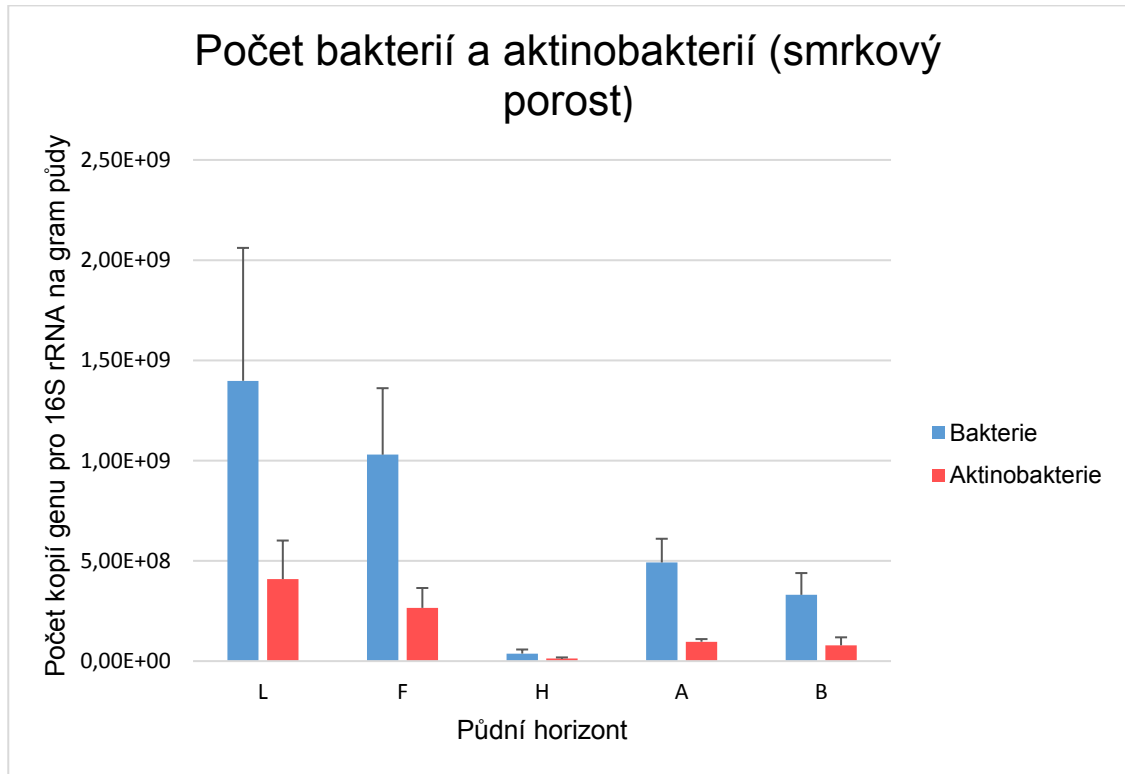


Obr. 25: Graf zobrazující počet kopií genu pro Erm metyltransferázu v bukovém porostu. Pro horizonty L, F a H jsou hodnoty průměrem ze sedmi opakování ($n=7$), v případě A a B horizontu z šesti opakování ($n=6$). Ke všem hodnotám byly stanoveny směrodatné odchylky. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

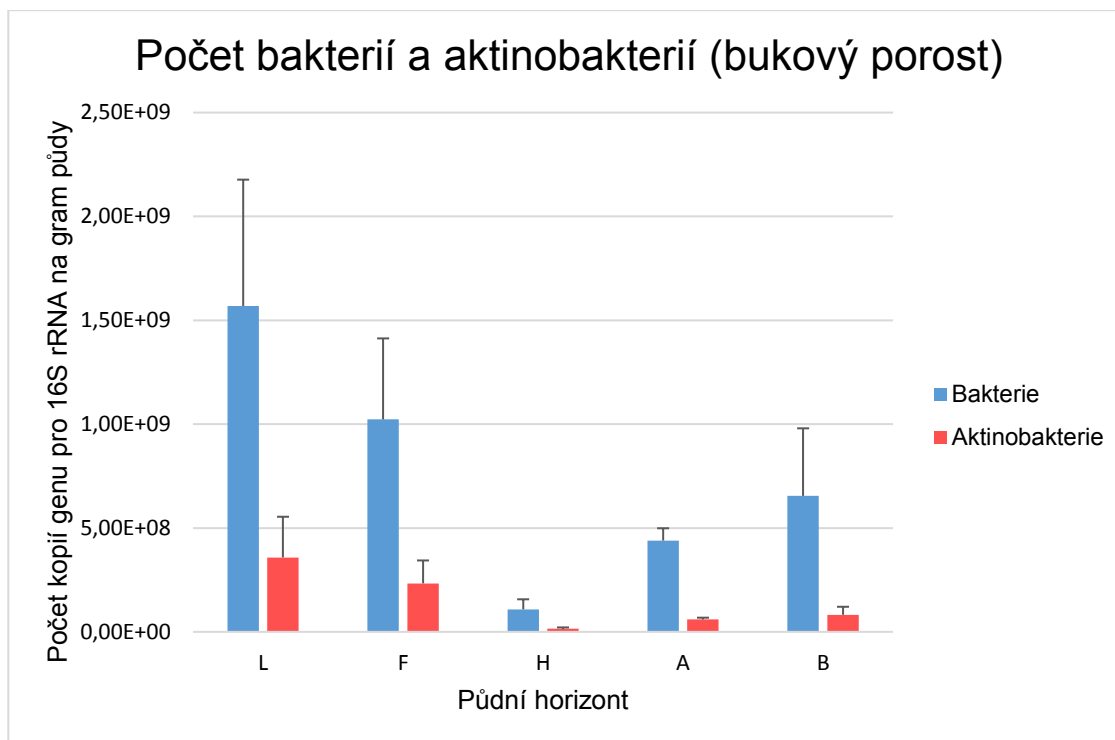
Naměřené počty genů pro metyltransferázu kódovanou genem *erm* jsou oproti PKSII až o 2 řády vyšší. Stejně jako v předchozím případě lze pozorovat signifikantní pokles četnosti *erm* v H horizontu. Na smrkovém stanovišti jsou u ostatních horizontů hodnoty velmi podobné. U bukového porostu je patrné snížení počtu metyltransferázy v hlubších vrstvách půdy. Absolutní množství jsou v A a B horizontech u obou typů stanovišť podobná, nejvyšší počty nositelů *erm* se nacházejí ve svrchních vrstvách půdy bukového porostu.

5.4.2 Kvantifikace bakterií a aktinobakterií

Počet bakterií a aktinobakterií byl stanoven prostřednictvím kvantifikace kopií genů pro 16S rRNA. Průměry výsledných hodnot ze všech opakování včetně příslušných směrodatných odchylek byly vneseny do grafů. Porovnání obou složek ilustruje zastoupení aktinobakterií v bakteriálním společenstvu.



Obr. 26: Graf zobrazující množství bakterií a aktinobakterií ve smrkovém porostu. Hodnoty jsou průměrem ze sedmi opakování ($n=7$), ke kterým byly stanoveny směrodatné odchylky. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.



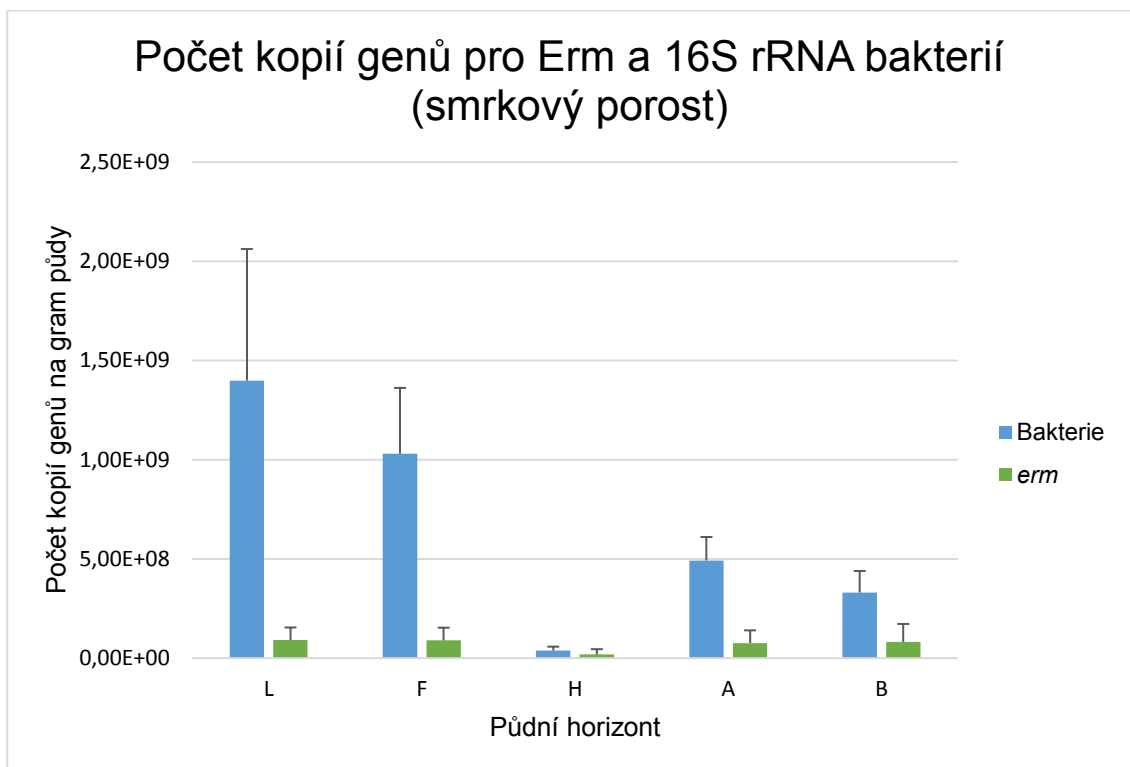
Obr. 27: Graf zobrazující množství bakterií a aktinobakterií v bukovém porostu. Pro horizonty L, F a H jsou hodnoty průměrem ze sedmi opakování (n=7), v případě A a B horizontu z šesti opakování (n=6). Ke všem hodnotám byly stanoveny směrodatné odchylky. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

Uvedená grafická znázornění ukazují obdobný trend početnosti bakterií a aktinobakterií napříč půdním profilem. Nejvyšší zastoupení vykazuje svrchní L horizont, po kterém dochází k pozvolnému poklesu v F horizontu. U H horizontu je opět pozorován výrazný úbytek počtu naměřených kopií genů. V A horizontu poté dochází ke zvýšení zastoupení bakterií i aktinobakterií. Na smrkovém stanovišti je pak množství v B horizontu nižší, naopak na bukovém stanovišti lze sledovat vzestupnou tendenci četnosti bakterií i aktinobakterií.

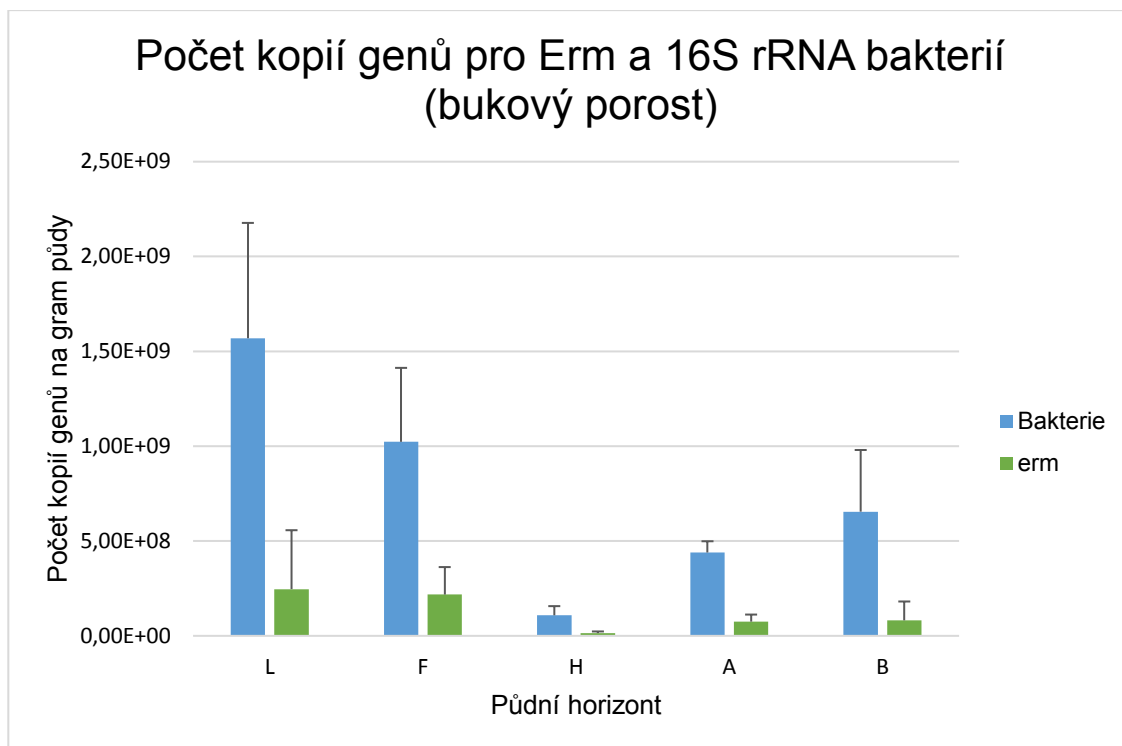
Z grafů je také možno pozorovat podíl aktinobakterií vůči bakteriím. Procentuální zastoupení aktinobakterií se pohybuje od 12,6 % do 34%. Smrkové stanoviště má ve všech horizontech vyšší podíl aktinobakterií než stanoviště bukové - nejvyšší je v H horizontu (34 %), nejnižší v A horizontu (19,6 %). U bukového porostu se relativní zastoupení aktinobakterií vertikálně snižuje – nejvyšší je ve svrchních L a F horizontech (22,8 %), nejnižší je v B horizontu (12,6 %).

5.4.3 Porovnání bakterií, aktinobakterií a genů sekundárního metabolismu

Pro porozumění významu sekundárního metabolismu v bakteriálních společenstvech je důležité porovnat množství genů účastnících se sekundárního metabolismu s kvantitativním stanovením bakterií, případně i aktinobakterií. Produkce obou měřených genů sekundárního metabolismu byla dána do souvislosti s množstvím bakterií, PKSII také s množstvím aktinobakterií. Vzájemný vztah četnosti bakterií a Erm metyltransferázy je znázorněn na obrázcích 28 a 29.



Obr. 28: Graf zobrazující počty kopií genů pro Erm metyltransferázy a pro 16S rRNA bakterií ve smrkovém porostu. Hodnoty jsou průměrem ze sedmi opakování ($n=7$), ke kterým byly stanoveny směrodatné odchylky. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

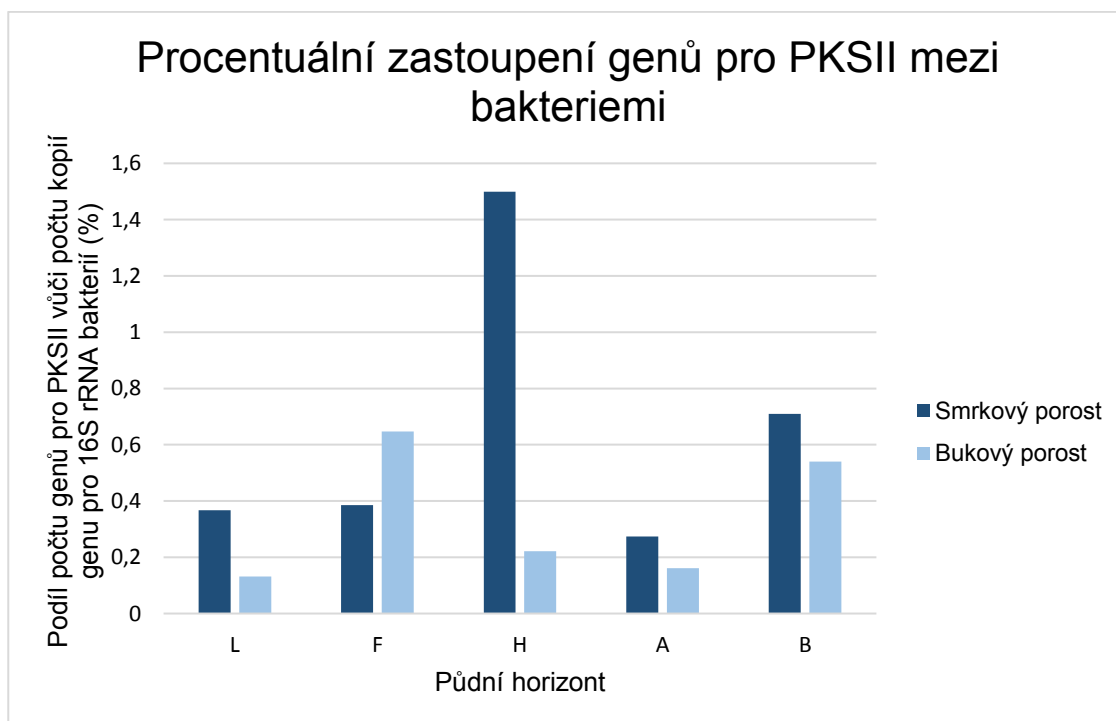


Obr. 29: Graf zobrazující počty kopií genů pro Erm metyltransferázy a pro 16S rRNA bakterií v bukovém porostu. Pro horizonty L, F a H jsou hodnoty průměrem ze sedmi opakování (n=7), v případě A a B horizontu z šesti opakování (n=6). Ke všem hodnotám byly stanoveny směrodatné odchylky. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

Na smrkovém stanovišti byly nalezeny nejvyšší počty bakteriálních genů pro 16S rRNA i genů pro Erm metyltransferázy v prvních dvou svrchních horizontech, přičemž v F je oproti L horizontu patrný mírný pokles obou stanovovaných složek. Stanovená množství výrazně klesají v humusovém horizontu, v případě bakterií skoro o 2 řády. V horizontech A a B je tendence počtu genů pro Erm metyltransferázy a 16S rRNA bakterií opačná – množství bakterií v B horizontu mírně klesá ve srovnání s A horizontem, počet kopií genů pro Erm metyltransferázu naopak v B horizontu mírně stoupá. V bukovém porostu je trend obou měřených prvků shodný. Kvantita obou složek se do dosažení humusového horizontu snižuje, v následujících dvou horizontech pak dochází k nárůstu. Procentuální zastoupení metyltransferáz vůči kopiím genu pro 16S rRNA bakterií se na smrkovém stanovišti pohybuje od 6,6 % do 48,8%, na stanovišti buku se pak hodnoty pohybují od 12,5 % do 21,3 %. Nejvyšší podíl nositelů determinanty *erm* byl u smrkového porostu v humusovém horizontu (48 %), na stanovišti buku v A horizontu (17 %).

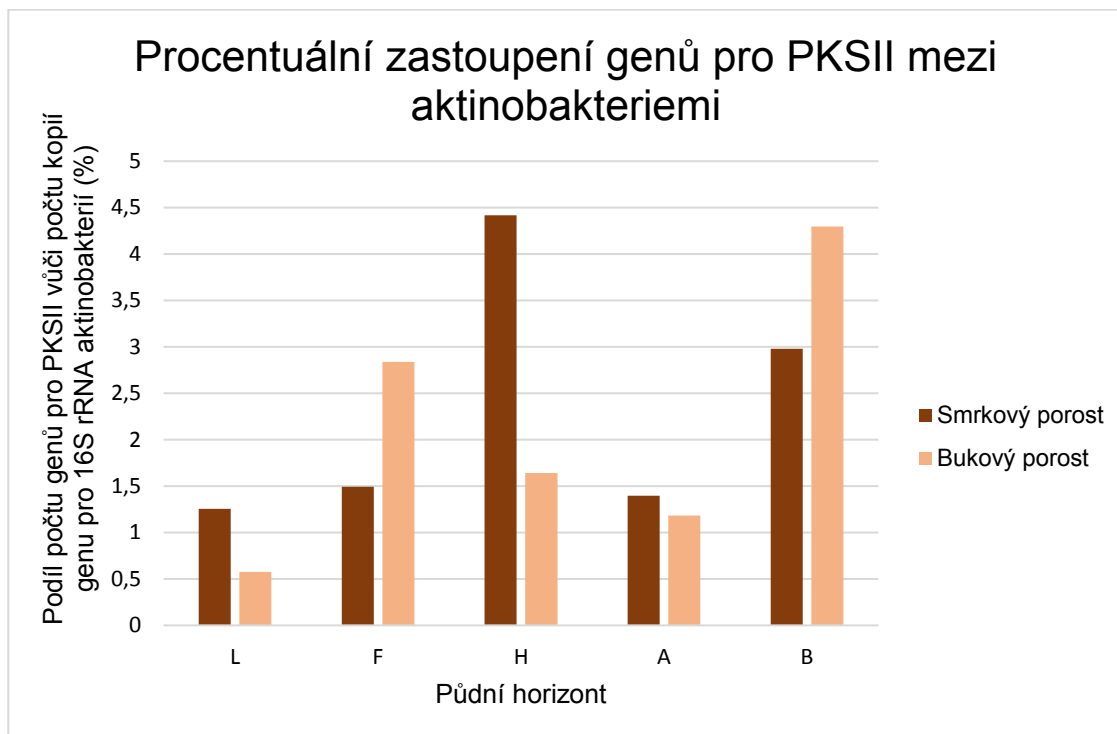
Z důvodu nízkého množství kopií genů pro PKSII vůči bakteriím nebylo možné jejich absolutní abundance vynést do společného sloupcového grafu. Z výše uvedených grafů znázorňujících počty kopií genů pro PKSII (obr. 22 a 23) a počty kopií genů pro 16S rRNA bakterií (obr. 26 a 27) lze nicméně pozorovat heterogenitu množství PKSII ve srovnání s bakteriemi. U smrkového porostu lze nestejnorodost pozorovat v hlubších vrstvách půdy (horizonty A a B). Kvantita bakterií se v B horizontu ve srovnání s A horizontem snižuje, množství PKSII v této vrstvě mírně narůstá. Ve svrchních půdních horizontech je patrná sestupná tendence obou složek. Na bukovém stanovišti se naopak zastoupení PKSII odlišuje ve svrchních vrstvách půdy. V F horizontu dochází k prudkému nárůstu počtu kopií genů pro PKSII a naopak poklesu bakterií. Od H horizontu zastoupení obou složek stoupá.

Vzhledem k tomu, že absolutní abundance kopií genů pro PKSII a 16S rRNA bakterií nebylo možné v grafu porovnat, bylo vyjádřeno procentuální zastoupení genů pro PKSII vůči bakteriím (viz obr. 30). Podíl producentů vybavených PKSII mezi bakteriemi se u smrkového porostu pohybuje od 0,3 do 1,5 %, u bukového porostu od 0,1 do 0,6 %. Na smrkovém stanovišti byl nejvyšší podíl producentů PKSII mezi bakteriemi v H horizontu (1,5 %), v bukovém porostu byl největší podíl producentů v F horizontu (0,6 %).



Obr. 30: Graf zobrazující podíl počtu genů pro PKSII vůči počtu kopií genu pro 16S rRNA bakterií. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

Polyketidy syntetizované PKSII jsou ve většině případů produkty aktinobakterií, a proto je i jejich porovnání relevantní. Procentuální zastoupení mezi aktinobakteriemi je v rozmezí od 1,3 do 4,4 % na smrkovém stanovišti a od 0,6 do 4,3 % na bukovém stanovišti (viz obr. 31). Kromě B horizontu lze při srovnání obou lesů pozorovat obdobný trend podílu PKSII jako u bakterií. Největší podíl genů pro PKSII mezi aktinobakteriemi je na smrkovém porostu stejně jako mezi bakteriemi v H horizontu (4,4 %), v bukovém porostu je ovšem největší podíl v B horizontu (4,3 %).



Obr. 31: Graf zobrazující podíl počtu genů pro PKSII vůči počtu kopií genu pro 16S rRNA aktinobakterií. Jednopísmenné zkratky označují horizonty: L – opadový, F – fermentační, H – humusový, A – organo-minerální, B – minerální.

6 Diskuze

V první části této diplomové práce bylo cílem navrhnout specifické primery, které by mohly být použity v modelovém pokusu za účelem sledování četnosti biosyntetických a rezistenčních genů sekundárního metabolismu. Při testování navržených primerů byly hledány optimální podmínky pro účinnou amplifikaci částí cílových genů, a po nalezení takových podmínek byla klonováním a sekvenováním amplikonu ověřena specifita primerů. Pouze jeden pár navržených primerů (Amitr_F a Amitr_R2) amplifikoval s dostatečnou účinností úsek genu pro L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázu dané velikosti z DNA izolované z půdy, nicméně po provedení sekvenace nebyla specifita primerů v půdních vzorcích potvrzena. Při amplifikaci s chromozomální DNA sbírkového kmene ovšem na rozdíl od půdních vzorků docházelo k tvorbě požadovaného úseku genu. Z výsledků lze vyvodit závěr, že navržené primery nejsou dostatečně specifické pro detekci genu pro L-glutamine:*scyllo*-inosóza aminotransferázu ve vzorcích environmentální DNA izolované z půdy, identifikace tohoto genu u čistých kultur bakteriálních kmenů je s využitím těchto primerů možné dosáhnout.

Vysvětlením nízké specifity navržených primerů Amitr_F a Amitr_R2 může být jejich nasedání na oblasti konzervované pro celou skupinu enzymů. Výsledným produktem PCR při amplifikaci z půdní DNA byl totiž často fragment genu kódujícího jiný enzym, náležející ovšem do stejné rodiny DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferáz. Tato rodina zahrnuje aminotransferázy přenášející aminoskupiny na cukry, jejichž součástí je i enzym L-glutamine:*scyllo*-inosóza aminotransferáza. Porovnáním aminokyselinových sekvencí enzymů katalyzujících transaminaci cukrů byly nalezeny 4 vysoce konzervované oblasti (Hwang *et al.*, 2004). Jednou z oblastí je sekvence (G, D)-D-E-V-(I, V), která je identická s částí genu použitou pro návrh přímého primeru Amitr_F. Zpětné primery Amitr_R1 a Amitr_R2 jsou naproti tomu součástí dalšího konzervovaného motivu, jehož sekvence je (I, L, V)-X-(I, L, V)-(I, L, V)-E-D-X-A-(Q, H, E). Primery pocházející ze stejných konzervovaných oblastí ovšem byly již použity a autoři identifikovali požadovaný gen při sekvenační analýze genového klastru tobramycinu (Kharel *et al.*, 2003). V uvedené práci nicméně nebyla ověřena účinnost oligonukleotidů na environmentálních vzorcích. Použití primerů pro amplifikaci ze vzorků DNA izolované z půdy bylo předmětem práce z roku 2005 (Nagaya *et al.*, 2005). Autorům této práce se podařilo amplifikovat úsek žádaného genu prostřednictvím nested PCR, která se využívá pro zvýšení specifity reakce.

Při testování primerů pro aminoglykosid acetyltransferázu docházelo u sbírkových kmenů k tvorbě produktů o požadované velikosti, specifita primerů ovšem z důvodu

neúspěšných reakcí s půdní DNA potvrzena nebyla. Přesto je možné, že pro detekci v DNA izolované ze sbírkových kmenů jsou tyto primery dostatečné, k ověření by však bylo nutné produkty amplifikace sekvenovat. Ostatní oligonukleotidy navržené v rámci této práce nebyly schopné detekovat příslušné geny, a byly tedy vyřazeny z dalších experimentů.

Pro oligonukleotidy strA_F a strA_R (amplifikující úsek genu pro aminoglykosid fosfotransferázu) převzaté z publikace byly také optimalizovány podmínky PCR reakcí. Z výsledků testování primerů očekávaná specifita strA_F a strA_R nebyla v enviromentálních vzorcích prokázána, a tyto primery tedy nebyly využity jako prostředky k identifikaci aminoglykosid fosfotransferázy u půdních bakteriálních společenstev. Z porovnání sekvencí produktů PCR amplifikace z chromozomální DNA a záznamů z databáze GenBank se však lze domnívat, že primery jsou dostatečně účinné pro detekci genu pro aminoglykosid fosfotransferázu v DNA izolované z čistých kultur.

K různým závěrům při ověřování specifity primerů strA_F a strA_R došly dvě publikace. V práci, ze které byly primery převzaty, se autorům podařilo z půdní DNA úspěšně amplifikovat fragment o požadované délce, který hybridizací a následnou sekvenací identifikovali jako gen *strA* (Tolba *et al.*, 2002). Avšak Laskaris a kol. (2012) pozorovali variabilitu produktů vznikajících amplifikací z půdní DNA za účasti těchto primerů. Jenom malá část detekovaných PCR produktů vznikla specifickou amplifikací genu *strA* z biosyntetického klastru streptomycinu. Fylogenetická analýza sekvencí amplikonů ukázala, že pouze 7 z celkového množství 105 sekvencí se nalézalo ve stejném kladu jako *strA*. U zbylých sekvencí autoři předpokládají aktivitu fosfotransferázy, s jistotou ovšem neprokázali funkci aminoglykosid modifikujícího enzymu.

Testování primerů strA_F a strA_R rovněž poukázalo na problém neúplností databází, jenž může komplikovat ověřování specifity primerů. V této práci byla velká část sekvencí při porovnání s databází označena za sekvence hypotetických proteinů, u mnohých nebyla shledána shoda s žádným záznamem z databáze. V reakci na tento problém byla při identifikaci genů antibiotické rezistence v půdním prostředí využita metagenomická analýza (Riesenfeld *et al.*, 2004). Autoři publikace zjistili, že devět z deseti analyzovaných genů rezistence kódovalo proteiny, jejichž sekvenční identity byly nižší než 60 % ve srovnání s již známými sekvencemi. Publikace zdůraznila, že potenciál techniky PCR není při detekci nepopsaných enzymů dostatečný. Tato technika je totiž závislá na primerech, které se navrhuje podle známých sekvencí. Z výsledků publikace lze usuzovat, že kvůli velké diverzitě některých determinantů antibiotické rezistence je význam půdních bakterií stále z velké části neprozkoumán.

Náplní druhé části této diplomové práce byla aplikace primerů v modelovém pokusu. Žádný z oligonukleotidových párů navržených v této práci nebyl dostatečně specifický, a proto byly vybrány primery z publikací, u kterých byla ověřena jejich specifita. Digitálním PCR bylo vyzkoušeno několik sad primerů, v závěrečném experimentu byla nakonec provedena kvantifikace bakterií, aktinobakterií, genů kódující Erm metyltransferázy a PKSII. Překvapivý byl signifikantní pokles všech sledovaných složek v H horizontu. Jednou z hypotéz vysvětlující tyto výsledky byla přítomnost inhibitorů v půdě. Tato hypotéza však byla vyvrácena kvantifikací aktinobakterií v ředící řadě pomocí metody real-time PCR. I přesto byl vyvozen závěr, že výsledky mohly být ovlivněny jinými faktory půdy, a relevance dat naměřených v H horizontu je sporná.

Stromové patro hraje důležitou roli ve složení společenstev půdních mikroorganismů. Cílem studie Urbanové a kol. (2015) bylo zjistit, zda rozdílné druhy stromů mají odlišný účinek na půdní mikroorganismy. Autoři došli k závěru, že půdní i houbová společenstva jsou v opadu i půdě stromovým patrem ovlivněna. Vliv na bakterie je ovšem částečně důsledkem různých chemických vlastností půd a opadu pod jednotlivými druhy stromů. Převážně půdní pH je faktorem, který velkou mírou rozhoduje o složení bakteriálních společenstev. Důvod zřetelného účinku pH na bakterie vychází pravděpodobně z jejich schopnosti optimálního růstu v úzkém spektru pH.

Pro oblast Jizerských hor jsou charakteristické kyselé až silně kyselé půdy, na jejichž acidifikaci se podílely přírodní i antropogenní procesy. Bylo zjištěno, že půda smrkového lesa v oblasti Paličnicku je kyselejší než půda lesa bukového ve všech sledovaných horizontech. Ve všech horizontech smrkového porostu bylo v této práci stanoveno vyšší relativní zastoupení aktinobakterií. Nelze tudíž vyloučit, že právě půdní pH bylo jedním z faktorů podílejících se na zvýšení podílu aktinobakterií v kyselém prostředí.

Karimi a kol. (2018) došli k závěru, že pH půdy je na území Francie hlavním environmentálním faktorem působícím na distribuci 17 bakteriálních kmenů (phylum). Není překvapivé, že aktinobakterie tvořící důležitou složku půdního ekosystému, mají na struktuře bakteriálních společenstev výrazný podíl. Autoři výše uvedené studie zjistili, že pH půdy negativně koreluje se zastoupením aktinobakterií, což je v souladu s výsledky této práce z lokality na Paličnicku. V rozporu s těmito závěry je ovšem studie prováděná na území Severní a Jižní Ameriky, ve které byla pozorována pozitivní korelace zastoupení aktinobakterií a půdního pH (Lauber *et al.*, 2009). Význam půdního pH byl také náplní práce z roku 2010 (Rousk *et al.*, 2010). Autoři práce sledovali relativní zastoupení jednotlivých taxonomických

skupin bakterií a rovněž došli k závěru, že pH je v půdě důležitým faktorem rozhodujícím o složení bakteriálního společenstva. Na rozdíl od jiných prací ovšem neměla v tomto experimentu hodnota pH výrazný vliv na relativní zastoupení aktinobakterií. Příčiny heterogenity výsledků mohou být různorodé – kromě odlišných technik odběrů vzorků a jejich analýzy se také může jednat o rozdílné podmínky půdních stanovišť a interakce v nich probíhající.

Dále bylo stanoveno, že vertikální distribuce hodnot pH napříč půdním profilem se při srovnání obou lesů Paličnicku odlišuje. Zatímco na bukovém stanovišti se hodnoty pH řídí vzorcem $F = H = A < B$, pro smrkové stanoviště je typický vzorec $F = H < A < B$ (Bradová *et al.*, 2015). Pro L horizont hodnota pH nebyla měřena. Korelace absolutního množství bakterií, aktinobakterií ani relativního množství aktinobakterií s těmito vzorci nebyla pozorována, a vliv vertikálně se měnícího pH půdy na bakteriální společenstva tak nebyl prokázán. Je však zřejmé, že aktinobakterie představující v půdách Paličnicku 12,6 až 33,9 % všech bakterií, jsou významnou složkou kyselých půd. Toto tvrzení podporuje i srovnání s relativní abundancí aktinobakterií v kyselých půdách smrkového a bukového porostu ve Francii, kde byl podíl aktinobakterií nižší - 5,6 % v bukovém a 5,8 % ve smrkovém porostu (Uroz *et al.*, 2016).

Vlhkost půdy je dalším faktorem měnícím složení bakteriálních společenstev směrem ke gram pozitivním bakteriím v půdách s vyšší vlhkostí (Drenovsky *et al.*, 2014). Pro půdy smrkového i bukového lesa Paličnicku byl naměřen pokles vlhkosti s narůstající hloubkou (Bradová *et al.*, 2015). Ve svrchních (L a F) horizontech by snižující se vlhkost mohla vysvětlit změnu relativního zastoupení aktinobakterií, avšak pouze na bukovém stanovišti došlo k výraznému poklesu podílu aktinobakteriálních společenstev ve všech sledovaných půdních horizontech. V půdách smrkového lesa korelace relativního množství aktinobakterií s vlhkostí napříč celým zkoumaným půdním profilem patrná nebyla.

Podíl aktinobakterií ve svrchních vrstvách půdy je rovněž ovlivněn kvalitou opadu. Ta je obvykle stanovena jako poměr biogenních prvků, např. uhlíku a dusíku (C:N). Urbanová a kol. (2015) zjistili, že právě opadům s vysokým poměrem C:N (tedy méně kvalitním) dominují aktinobakterie. Hodnoty tohoto poměru byly u smrkového opadu v několika pracích stanoveny vyšší než u opadu buku (Augusto *et al.*, 2002), a dalo by se tudíž očekávat, že zastoupení aktinobakterií bude vyšší v L horizontu smrkového porostu Paličnicku. Tato hypotéza byla v této práci potvrzena – v opadovém horizontu smrkového lesa tvořily aktinobakterie 29,2 %, v opadu bukového lesa 22,8 %.

Na základě výsledků této práce bylo ověřeno, že složení půdních bakteriálních společenstev je důsledkem mnoha environmentálních faktorů a jejich interakcí, které jsou do určité míry ovlivněny vegetací a vertikálně se měnícími vlastnostmi půdy. Účinek narůstající hloubky je patrný ze signifikantně vyšších abundancí bakterií i aktinobakterií ve svrchních půdních horizontech. Odlišnost stanovišť dokládá například rozdílný trend v množství společenstev ve spodních horizontech (na smrkovém stanovišti množství bakterií i aktinobakterií při přechodu z A do B horizontu klesají, na bukovém stanovišti je tomu naopak). V horizontech s nižším obsahem organických látek hraje ovšem důležitou roli i charakter matečné horniny. Rozdíly v relativním zastoupení aktinobakterií napříč půdními profily obou lesů by nicméně mohly být důkazem, že druh stromu je významným faktorem, který (přímo či nepřímo) působí na strukturu půdních bakteriálních společenstev.

V rámci vyhledávání biologicky aktivních látek a jejich producentů v půdě jsou polyketid-syntázy atraktivním cílem. Biogeografie těchto enzymů v půdě je hojně studována. Wawrik a kol. (2005) zjistili, že ačkoliv některé PKSII vykazují kosmopolitní rozšíření, distribuce většiny genů pro PKSII je v půdním prostředí nepravidelná. Závislost rozmanitosti sekvencí polyketid-syntáz na typu půdy byla pozorována při mapování genové výbavy sekundárního metabolismu v půdách o odlišných charakteristikách (Charlop-Powers *et al.*, 2014). Diverzita PKS pozitivně korelovala s hodnotou pH, stejně jako s množstvím draslíku a vápníku v půdě. Kyselé půdy (pH < 5) tedy vykazovaly nízkou diverzitu PKS, vykazovaly ovšem i nízké relativní zastoupení aktinobakterií. Je tedy pravděpodobné, že menší bohatost PKS v kyselých půdách byla důsledkem poklesu množství aktinobakterií, a pH faktor tak nepřímo ovlivňuje diverzitu polyketid-syntáz a jiných enzymů účastnících se produkce sekundárních metabolitů.

Zatímco ve výše uvedené publikaci rozmanitost genů pro PKSII pozitivně korelovala s relativním zastoupením aktinobakterií, závislost četnosti genů pro PKSII na abundanci aktinobakterií v této diplomové práci potvrzena nebyla. Primery pro amplifikaci PKSII byly navrženy podle konzervovaných oblastí genu pro KS_α z PKSII aktinobakterií, a proto byla očekávána pozitivní korelace mezi množstvím aktinobakterií a polyketid-syntáz druhého typu (Wawrik *et al.*, 2005). Důvodů nepozorované korelace těchto složek může být několik a dá se jen odhadovat, který je správný. Dá se předpokládat, že měnící se fyzikální a chemické podmínky jednotlivých horizontů mění zastoupení producentů mezi aktinobakteriemi, případně se mění počet nebo zastoupení produkovaných polyketidů (a tedy i genů pro KS_α, pro které

byly primery navrženy). V neposlední řadě se také lze domnívat, že výsledky mohly být ovlivněny metodou izolace DNA či kvantifikace genů.

Absolutní četnost PKSII se v bukovém porostu Paličnicku pohybovala od $2,4 \times 10^5$ do $6,62 \times 10^6$ a ve smrkovém porostu od $5,63 \times 10^5$ do $5,14 \times 10^6$ kopií genů na gram půdy. Jednou z mála prací, která se rovněž věnovala abundanci genů pro PKSII v půdě, je práce autorů Le a kol. (2014). V jejich práci byly detekovány geny pro polyketid-syntázy prvního i druhého typu ve všech vzorcích odebraných z tropických půd a jejich kvantifikací došli autoři k závěru, že produkce polyketidů je obvyklým jevem. Absolutní četnost genů pro PKSII se v jejich práci pohybovala mezi $2,4 \times 10^5$ a $1,5 \times 10^6$ kopiemi na gram půdy. Při porovnání dat z Paličnicku je patrné, že horní hranice hodnot naměřených v této diplomové práci převyšují hodnoty stanovené ve výše uvedené publikaci, a aktinobakterie produkující polyketidy jsou tedy významnou složkou kyselých půd smrkových i bukových lesů Paličnicku.

Předmětem této práce bylo také sledování změn četnosti genů pro PKSII vlivem odlišných půdních vlastností studovaných lokalit. Absolutní četnost se v půdách bukového a smrkového stanoviště lišila, převážně ve svrchních vrstvách (horizonty L a F) se projevil vliv stromového patra. Překvapivým výsledkem byla četnost kopií genů pro PKSII bukového porostu. Na rozdíl od ostatních měřených složek nebyla totiž nejvyšší v nejsvrchnějším horizontu, v L horizontu byla dokonce zhruba třikrát nižší než v horizontu F. Relativní zastoupení mezi aktinobakteriemi bylo také v L horizontu bukového lesa nejnižší (0,6 %).

Diverzita genů *erm* kódujících rRNA metyltransferázy byla rovněž náplní mnoha výzkumů. Na základě nalezení několika konzervovaných úseků v aminokyselinové sekvenci těchto metyltransferáz se předpokládá, že pochází od společného předka. Nicméně variabilita příslušných nukleotidových sekvencí naznačuje, že pokud je původ genů všech jeho nositelů společný, jejich předek je velmi vzdálený (Van Elsas, 1992). Na sekvenční variabilitě se mimo jiné podílely duplikace a také horizontální přenos mezi příbuznými i fylogenetickými odlišnými bakteriemi (Park *et al.*, 2010). V půdě je patrný vztah variability genů *erm* a lokality, ve které se tyto geny nachází (Ságová-Marečková *et al.*, 2011). Rezistence k antibiotikům skupiny MLS_B je sledována převážně u klinických izolátů, nicméně schopnost horizontálně se přenášet prostřednictvím mobilních elementů je jedním motivů k jejich studiu i v půdním prostředí.

Primery k detekci rRNA metyltransferázy v půdních vzorcích z Paličnicku byly navrženy tak, aby amplifikovaly různé geny *erm* z bakterií s vysokým obsahem GC párů (Čermák *et al.*, 2008). Absolutní množství *erm* se v půdě studovaných lokalit na Paličnicku pohybovala od

$1,43 \times 10^7$ do $2,46 \times 10^8$ kopií na gram půdy. Četností genů *erm* v půdách se zabývala řada prací, avšak předmětem jejich zájmu většinou byly jednotlivé determinanty rezistence. Studie cílená na kvantifikaci šesti typů *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*, *ermT* a *ermX*) ve vzorcích z chlévských hnojů došla k závěru, že četnost těchto genů se odlišuje podle lokality původu a také podle typu genu (Chen *et al.*, 2007). Nejvyšší relativní zastoupení ve všech vzorcích vykazoval gen *ermB*. Celkové množství kopií *erm* se pak pohybovalo od $9,99 \times 10^3$ do $2,67 \times 10^{10}$ na gram materiálu. Hodnoty absolutních četností genů *erm* stanovených v této diplomové práci jsou tedy v rozsahu hodnot z výše uvedené publikace, jejich rozmezí je ovšem užší.

Ačkoliv byl v bukovém lese Paličnicku výraznější rozdíl mezi svrchními a spodními horizonty, relativní zastoupení genů *erm* v bakteriálních společenstvech se na rozdíl od smrkového stanoviště pohybovalo v úzkém rozmezí - od 12,5 do 21,3 % vzhledem k počtu kopií bakteriálního genu pro 16S rRNA. Relativní zastoupení metyltransferáz v půdách smrkového lesa se pohybovalo v rozmezí 6,6 a 48,8 %, přičemž nejnižší podíl byl v horizontech L a F (6,6 a 8,7 %). Absolutní četnosti byly na rozdíl od bukového stanoviště ve všech horizontech (s výjimkou H horizontu) velmi podobné. Tyto výsledky ukazují vliv stromového patra na množství i zastoupení genů *erm* v půdách. Je patrné, že největších rozdílů bylo dosaženo ve svrchních půdních horizontech – v absolutní četnosti v bukovém lese a v relativní četnosti v lese smrkovém.

Ze stanovených výsledků lze vyvodit závěry, že rozdílnost stanoviště má na množství kopií genů *erm* výrazný vliv. Nelze však určit, který z environmentálních faktorů měl největší podíl. Působením environmentálních faktorů na abundanci genů *erm* se zabývalo několik prací. Ty se ovšem na rozdíl od této diplomové práce zaměřily na jednotlivé typy genů. Knapp a kol. (2011) publikovali výsledky svého experimentu, při kterém sledovali korelace mezi četností genů antibiotické rezistence a vlastnostmi půdy. Autoři se zaměřili na vliv kovů v půdě, nicméně ukázali, že četnost genů rezistence koreluje i s pH půdy. V rozmezí pH hodnot 4,3 – 7,2 relativní abundance tří ze čtyř zkoumaných genů *erm* (*ermB*, *ermE* a *ermF*) pozitivně korelovala s hodnotou pH. V jiné práci závislost četnosti genů *ermB* a *ermC* na pH půdy pozorována nebyla (Wang *et al.*, 2016). Patrná byla v této práci pozitivní korelace s koncentrací makrolidů naměřenou v půdě, naznačující schopnost selekčního tlaku těchto antibiotik. V souhrnu lze říct, že četnost rRNA metyltransferáz je podmíněna jejich genetickým základem a pro jednotlivé determinanty rezistence se tedy odlišuje. Důležitou roli nicméně hrají i odlišné fyzikální a chemické vlastnosti půdy.

7 Souhrn

- V této práci bylo celkem navrženo 7 primerů (3 přímé a 4 zpětné), které měly sloužit k detekci aminoglykosid acetyltransferázy, 3 primery (2 přímé a 1 zpětný) k detekci aminoglykosid fosfotransferázy, 3 primery (1 přímý a 2 zpětné) k detekci L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázy a 2 primery k detekci 2-deoxy-*scyllo*-inosóza syntázy.
- Primery Amitr_F a Amitr_R2 jsou účinné při identifikaci L-glutamine:2-deoxy-*scyllo*-inosóza aminotransferázy v DNA izolované z čistých kultur, nejsou však dostatečně specifické při amplifikaci z DNA izolované z půdy. Kombinací přímého primeru AATm71degF se zpětným primerem AATm148R a AATm183R docházelo z chromozomální DNA k amplifikaci úseku genu o požadované velikosti, specifita primerů ovšem sekvenováním ověřena nebyla. Pro ostatní navržené oligonukleotidy nebyly nalezeny optimální podmínky amplifikace.
- Z důvodu nedostatečné specifity navržených primerů při amplifikaci z environmentálních vzorků byla ověřena specifita primerů převzatých z publikací – pro amplifikaci úseku genu pro aminoglykosid fosfotransferázu (strA_F a strA_R) a deoxy-*scyllo*-inosóza syntázu (DOI-f a DOI-r). Primery určené k identifikaci aminoglykosid fosfotransferázy byly specifické při amplifikaci s chromozomální DNA, s půdní DNA nebyla specifita primerů prokázána. Reakce s primery DOI-f a DOI-r dávaly vznik produktům o jiné velikosti, a proto nebyly použity k detekci deoxy-*scyllo*-inosóza syntázy v půdním prostředí.
- K detekci a kvantifikaci genů byly nakonec vybrány primery z literatury, jejichž specifita již byla ověřena. Jednalo se o primery pro polyketid-syntázu typu I, polyketid-syntázu typu II a Erm metyltransferázu. Oligonukleotidy určené k amplifikaci polyketid-syntáz typu I byly následně z důvodu tvorby dimerů z kvantifikace vyřazeny.
- Kvantifikací genů metodou digitálního PCR bylo zjištěno, že změny chemických a fyzikálních podmínek účinkem stromového patra a narůstající hloubky půdního profilu měly vliv na množství bakterií, aktinobakterií stanovené jako počty kopií genu pro 16S rRNA, i na četnost polyketid-syntáz typu II a metyltransferáz typu Erm.
- Napříč půdním profilem byl patrný úbytek množství bakterií a aktinobakterií s narůstající hloubkou, nejvyšší počty byly stanoveny v opadovém horizontu následovaném horizontem fermentačním.

- V rámci lokality vykazovaly absolutní četnosti aktinobakterií obdobný trend jako četnosti bakterií. Rozdíly mezi smrkovým a bukovým stanovištěm byly pozorovány především ve spodních vrstvách půdy.
- Zastoupení aktinobakterií bylo ve smrkovém porostu heterogenní, v bukovém porostu se projevila sestupná tendence zastoupení aktinobakterií s narůstající hloubkou. Změna podílu aktinobakterií v půdách bukového porostu byla rovněž výraznější než v půdách smrkového lesa.
- Absolutní počty kopií genů pro polyketid-syntázu typu II byly porostem ovlivněny převážně v opadovém a fermentačním horizontu, kde byl při srovnání obou stanovišť pozorován opačný trend četnosti PKSII. Relativní četnost genů pro PKSII byla v rámci půdních profilů proměnlivá.
- Vliv rozdílných půdních vlastností obou stanovišť byl také prokázán při stanovení četnosti genů pro Erm metyltransferázy. Na bukovém stanovišti byly absolutní počty signifikantně vyšší v opadovém a fermentačním horizontu. Na smrkovém stanovišti byly s výjimkou humusového horizontu podobné. Odlišnosti v relativní četnosti vztahované k celkovým počtům bakterií byly naopak na tomto stanovišti ve srovnání s bukovým lesem výraznější.
- Počty kopií všech sledovaných genů byly signifikantně nižší v humusovém horizontu, což může naznačovat účast půdních faktorů, které negativně ovlivnily práci s půdní DNA, vliv inhibitorů PCR amplifikace však nebyl prokázán.

8 Seznam použité literatury

- Ahlert, J., Distler, J., Mansouri, K., & Piepersberg, W. (1997). Identification of *stsC*, the gene encoding the L-glutamine:*scyllo*-inosose aminotransferase from streptomycin-producing Streptomyces. *Archives of Microbiology*, 168(2), 102–113.
- Ahmed, A. M., Nakagawa, T., Arakawa, E., Ramamurthy, T., Shinoda, S., & Shimamoto, T. (2004). New aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Id*, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 947–951.
- Ames, B. D., Lee, M.-Y., Moody, C., Zhang, W., Tang, Y., & Shiou-Chuan, T. (2011). Structural and biochemical characterization of Zhul aromatase/cyclase from the R1128 polyketide pathway. *Biochemistry*, 50(39), 8392–8406.
- Amoroso, M. J., Benimeli, C. S., & Cuzzo, S. A. (2013). *Actinobacteria: Application in Bioremediation and Production of Industrial Enzymes* (1st ed.). CRC Press.
- Aoki, R., Nagaya, A., Arakawa, S., Kato, C., & Tamegai, H. (2008). Identification and diversity of putative aminoglycoside-biosynthetic aminotransferase genes from deep-sea environmental DNA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), 1388–1393.
- Ashelford, K. E., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2002). PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Research*, 30(15), 3481–3489.
- Atlas, R. M. (1997). *Principles of Microbiology* (2nd ed.). Wm. C. Brown Publishers.
- Augusto, L., Ranger, J., Binkley, D., & Rothe, A. (2002). Impact of several common tree species of European temperate forests on soil fertility. *Annals of Forest Science*, 59(3), 233–253.
- Baltz, R. H. (2006). Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 507–613.
- Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(5), 557–563.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51.
- Boyd, D. A., Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M. P., Willey, B. M., *et al.* (2004). Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3758–3764.
- Bradová, M., Tejnecký, V., Borůvka, L., Němeček, K., Ash, C., Šebek, O., *et al.* (2015). The variations of aluminium species in mountainous forest soils and its implications to soil acidification. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16676–16687.
- Brockett, B. F. T., Prescott, C. E., & Grayston, S. J. (2012). Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biology and Biochemistry*, 44(1), 9–20.
- Brown, M. G., & Balkwill, D. L. (2009). Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microbial Ecology*, 57(3), 484–493.

- Burdett, V. (1996). Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *Journal of Bacteriology*, 178(11), 3246–3251.
- Cabrera, R., Ruiz, J., Sánchez-Céspedes, J., Goñi, P., Gómez-Lus, R., de Anta, M. T. J., *et al.* (2009). Characterization of the enzyme aac(3)-Id in a clinical isolate of *Salmonella enterica* serovar Haifa causing traveler's diarrhea. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(8), 453–456.
- Casin, I., Hanau-Berçot, B., Podglajen, I., Vahaboglu, H., & Collatz, E. (2003). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bla(PER-1)-carrying plasmid pSTII encodes an extended-spectrum aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of type Ib. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), 697–703.
- Castoe, T. A., Stephens, T., Noonan, B. P., & Calestani, C. (2007). A novel group of type I polyketide synthases (PKS) in animals and the complex phylogenomics of PKSs. *Gene*, 392(1–2), 47–58.
- Čermák, L., Kopecký, J., Novotná, J., Omelka, M., Parkhomenko, N., Plháčková, K., & Ságová-Marečková, M. (2008). Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. *Applied Soil Ecology*, 40(2), 348–358.
- Cetin, E. S., Gunes, H., Kaya, S., Aridogan, B. C., & Demirci, M. (2010). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43(6), 524–529.
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42(1), S25–S34.
- Coutinho, V. de L. S., Paiva, R. M., Reiter, K. C., De-Paris, F., Barth, A. L., Mombach, A. B., & Machado, P. (2010). Distribution of *erm* genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(6), 564–568.
- Cox, G., Ejim, L., Stogios, P. J., Koteva, K., Bordeleau, E., Evdokimova, E., *et al.* (2018). Plazomicin retains antibiotic activity against most aminoglycoside modifying enzymes. *ACS Infectious Diseases*, 4(6), 980–987.
- Crawford, D. L., Pometto III, A. L., & Crawford, R. L. (1983). Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), 898–904.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311(5759), 374–377.
- Das, P., Solanki, R., & Khanna, M. (2014). Isolation and screening of cellulolytic actinomycetes from diverse habitats. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 5(3), 438–451.
- Davies, J., Spiegelman, G. B., & Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 445–453.
- Dewick, P. M. (2009a). Aminosugars and aminoglycosides. In *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (3rd ed., pp. 498–508). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Dewick, P. M. (2009b). Polyketide synthases: generalities. In *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (3rd ed., pp. 66–68). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- De Wit, R., & Bouvier, T. (2006). 'Everything is everywhere, but, the environment selects?'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology*, 8(4), 755–758.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, 3(3), 30–37.

- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M., & Piepersberg, W. (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Research*, *15*(19), 8041–8056.
- Donadio, S., Staver, M. J., McAlpine, J. B., Swanson, S. J., & Katz, L. (1991). Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*, *252*(5006), 675–679.
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(1), 160–201.
- Drenovsky, R. E., Steenwerth, K. L., Jackson, L. E., & Scow, K. M. (2014). Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Global Ecology and Biogeography*, *19*(1), 27–39.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(15), 8817–8822.
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(3), 626–631.
- Fierer, N., Schimel, J. P., & Holden, P. A. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology & Biochemistry*, *35*(1), 167–176.
- Filipová, M., Bujdáková, H., Drahovská, H., Lisková, A., & Hanzen, J. (2006). Occurrence of aminoglycoside-modifying-enzyme genes *aac*(6′)-*aph*(2″), *aph*(3′), *ant*(4′) and *ant*(6) in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* resistant to high-level of gentamicin and amikacin. *Folia Microbiologica*, *51*(1), 57–61.
- Flatt, P. M., & Mahmud, T. (2007). Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. *Natural Product Reports*, *24*(2), 358–392.
- Ghai, R., McMahon, K. D., & Rodriguez-Valera, F. (2012). Breaking a paradigm: cosmopolitan and abundant freshwater actinobacteria are low GC. *Environmental Microbiology Reports*, *4*(1), 29–35.
- Goh, E.-B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M. G., & Davies, J. (2002). Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(26), 17025–17030.
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, *37*(1), 189–216.
- Goodfellow, M., Busarakam, K., Idris, H., Labeda, D. P., Nouioui, I., Brown, R., *et al.* (2017). *Streptomyces asenjonii* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soils and emended description of *Streptomyces viridosporus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *110*(9), 1133–1148.
- Goordial, J., Raymond-bouchard, I., Ronholm, J., Shapiro, N., Woyke, T., Whyte, L., & Bakermans, C. (2015). Improved-high-quality draft genome sequence of *Rhodococcus* sp. JG-3, a eurypsychrophilic Actinobacteria from Antarctic Dry Valley permafrost. *Standards in Genomic Sciences*, *10*(61), 1–6.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95–98.
- Heinzel, P. A., Werbitzky, O., Distler, J., & Piepersberg, W. (1988). A second streptomycin resistance gene from *Streptomyces griseus* codes for streptomycin-3″-phosphotransferase. Relationships between antibiotic and protein kinases. *Archives of Microbiology*, *150*(2), 184–192.
- Hertweck, C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, *48*(26), 4688–4716.

- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., *et al.* (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, *83*(22), 8604–8610.
- Hong, H., Sun, Y., Zhou, Y., Stephens, E., Samborskyy, M., & Leadlay, P. F. (2016). Evidence for an iterative module in chain elongation on the azalomycin polyketide synthase. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *12*(1), 2164–2172.
- Horaud, T., de Céspedes, G., & Trieu-Cuot, P. (1996). Chromosomal gentamicin resistance transposon Tn3706 in *Streptococcus agalactiae* B128. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *40*(5), 1085–1090.
- Hwang, B.-Y., Lee, H.-J., Yang, Y.-H., Joo, H.-S., & Kim, B.-G. (2004). Characterization and investigation of substrate specificity of the sugar aminotransferase WecE from *E. coli* K12. *Chemistry & Biology*, *11*(7), 915–925.
- Chan, Y. A., Podevels, A. M., Kevany, B. M., & Thomas, M. G. (2009). Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Natural Product Reports*, *26*(1), 90–114.
- Charlop-Powers, Z., Owen, J. G., Reddy, B. V. B., Ternei, M. A., & Brady, S. F. (2014). Chemical-biogeographic survey of secondary metabolism in soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(10), 3757–3762.
- Charlop-Powers, Z., Owen, J. G., Reddy, B. V. B., Ternei, M. A., Guimarães, D. O., de Frias, U. A., *et al.* (2015). Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. *ELIFE*, *4*, 1–10.
- Chen, J., Yu, Z., Michel, Frederick C., J., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(14), 4407–4416.
- Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, M., Ohta, T., & Ōmura, S. (1999). Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(17), 9509–9514.
- Ikeda, H., Shin-ya, K., & Omura, S. (2014). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *41*(2), 233–250.
- Jensen, L. B., Agersø, Y., & Sengeløv, G. (2002). Presence of *erm* genes among macrolide-resistant Gram-positive bacteria isolated from Danish farm soil. *Environment International*, *28*(6), 487–491.
- Jha, S., Modi, H. A., & Jha, C. K. (2016). Characterization of extracellular chitinase produced from *Streptomyces rubiginosus* isolated from rhizosphere of *Gossypium* sp. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(1), 1–12.
- Jiang, X., Ellabaan, M. M. H., Charusanti, P., Munck, C., Blin, K., Tong, Y., *et al.* (2017). Dissemination of antibiotic resistance genes from antibiotic producers to pathogens. *Nature Communications*, *8*, 1–7.
- Karimi, B., Terrat, S., Dequiedt, S., Saby, N. P. A., Horrigue, W., Lelièvre, M., *et al.* (2018). Biogeography of soil bacteria and archaea across France. *Science Advances*, *4*(7), 1–14.
- Kharel, M. K., Subba, B., Lee, H. C., Liou, K., Woo, J. S., & Sohng, J. K. (2003). An approach for cloning biosynthetic genes of 2-deoxystreptomycin-containing aminocyclitol antibiotics: isolation of a biosynthetic gene cluster of tobramycin from *Streptomyces tenebrarius*. *Biotechnology Letters*, *25*(24), 2041–2047.

- Knapp, C. W., McCluskey, S. M., Singh, B. K., Campbell, C. D., Hudson, G., & Graham, D. W. (2011). Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS One*, *6*(11), 1–6.
- Kobayashi, N., Alam, M., Nishimoto, Y., Urasawa, S., Uehara, N., & Watanabe, N. (2001). Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiology and Infection*, *126*(2), 197–204.
- Kudo, F., & Eguchi, T. (2009). Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, *62*(9), 471–481.
- Kudo, F., Tamegai, H., Fujiwara, T., Tagami, U., Hirayama, K., & Kakinuma, K. (1999). Molecular cloning of the gene for the key carbocycle-forming enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminocyclitol antibiotics and its comparison with dehydroquinase synthase. *The Journal of Antibiotics*, *52*(6), 559–571.
- Kudo, F., Yamamoto, Y., Yokoyama, K., Eguchi, T., & Kakinuma, K. (2005). Biosynthesis of 2-deoxystreptamine by three crucial enzymes in *Streptomyces fradiae* NBRC 12773. *The Journal of Antibiotics*, *58*(12), 766–774.
- L'Abée-Lund, T. M., & Sørum, H. (2000). Functional Tn5393-like transposon in the R plasmid pRAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(12), 5533–5535.
- Lambert, P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*(10), 1471–1485.
- Lane, C. E., Hulgán, D., O'Quinn, K., & Benton, M. G. (2015). CEMAsuite: open source degenerate PCR primer design. *Bioinformatics*, *31*(22), 3688–3690.
- Laskaris, P., Tolba, S., Calvo-Bado, L., & Wellington, L. (2010). Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. *Environmental Microbiology*, *12*(3), 783–796.
- Laskaris, P., Sekine, T., & Wellington, E. M. H. (2012). Diversity analysis of Streptomyces and associated phosphotransferase genes in soil. *PLoS One*, *7*(4), 1–9.
- Latorre, M., Revuelta, J., García-Junceda, E., & Bastida, A. (2016). 6-O-Nucleotidyltransferase: an aminoglycoside-modifying enzyme specific for streptomycin/streptidine. *MedChemComm*, *7*(1), 177–183.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(15), 5111–5120.
- Le, T.-H., Sivachidambaram, V., Yi, X., Li, X., & Zhou, Z. (2014). Quantification of polyketide synthase genes in tropical urban soils using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, *106*(1), 135–142.
- Ley, R. E., & Schmidt, S. K. (2002). Fungal and bacterial responses to phenolic compounds and amino acids in high altitude barren soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *34*(7), 989–995.
- Lipson, D. A., Schadt, C. W., & Schmidt, S. K. (2002). Changes in soil microbial community structure and function in an alpine dry meadow following spring snow melt. *Microbial Ecology*, *43*(3), 307–314.
- Ma, L., Guo, C., Lü, X., Yuan, S., & Wang, R. (2015). Soil moisture and land use are major determinants of soil microbial community composition and biomass at a regional scale in northeastern China. *Biogeosciences*, *12*(8), 2585–2596.
- Ma, S. M., & Tang, Y. (2007). Biochemical characterization of the minimal polyketide synthase domains in the lovastatin nonaketide synthase LovB. *The FEBS Journal*, *274*(11), 2854–2864.

- Malla, S., Niraula, N. P., Singh, B., Liou, K., & Sohng, J. K. (2010). Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peuceetius*. *Microbiological Research*, *165*(5), 427–435.
- Mariam, D. H., Mengistu, Y., Hoffner, S. E., & Andersson, D. I. (2004). Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(4), 1289–1294.
- Marmur, J., & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*, *5*(1), 109–118.
- Mazaika, E., & Homsy, J. (2014). Digital droplet PCR: CNV analysis and other applications. *Current Protocols in Human Genetics*, *82*, 7.24.1–24.13.
- Mazodier, P., Cossart, P., Giraud, E., & Gasser, F. (1985). Completion of the nucleotide sequence of the central region of TnS confirms the presence of three resistance genes. *Nucleic Acids Research*, *13*(1), 195–205.
- McCarthy, A. J., & Williams, S. T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene*, *115*(1–2), 189–192.
- Mehta, R., & Champney, W. S. (2002). 30S ribosomal subunit assembly is a target for inhibition by aminoglycosides in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(5), 1546–1549.
- Metsä-Ketelä, M., Halo, L., Munukka, E., Hakala, J., Mäntsälä, P., & Ylihonko, K. (2002). Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(9), 4472–4479.
- Miotke, L., Lau, B. T., Rumma, R. T., & Ji, H. P. (2014). High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Analytical Chemistry*, *86*(5), 2618–2624.
- Moffitt, M. C., & Neilan, B. A. (2001). On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. *FEMS Microbiology Letters*, *196*(2), 207–214.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2), 1–37.
- Murphy, E. (1985). Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, *162*(2), 633–640.
- Nagaya, A., Takeyama, S., & Tamegai, H. (2005). Identification of aminotransferase genes for biosynthesis of aminoglycoside antibiotics from soil DNA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *69*(7), 1389–1393.
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H., & Horinouchi, S. (1999). The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Molecular Microbiology*, *34*(1), 102–111.
- Ohnuki, T., Imanaka, T., & Aiba, S. (1985). Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an *str* gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance. *Journal of Bacteriology*, *164*(1), 85–94.
- Okamoto, S., Taguchi, T., Ochi, K., & Ichinose, K. (2009). Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the *act* gene cluster. *Chemistry & Biology*, *16*(2), 226–236.
- Oliveira, S. S., Murphy, E., Gamon, M. R., & Bastos, M. C. F. (1993). pRJ5: A naturally occurring *Staphylococcus aureus* plasmid expressing constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance contains a tandem duplication in the leader region of the *ermC* gene. *Journal of General Microbiology*, *139*(1), 1461–1467.

- Ounissi, H., Derlot, E., Carlier, C., & Courvalin, P. (1990). Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(11), 2164–2168.
- Palmer, E. L., Teviotdale, B. L., & Jones, A. L. (1997). A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 detected in *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4604–4607.
- Park, A. K., Kim, H., & Jin, H. J. (2010). Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, Erm and KsgA, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 309(2), 151–162.
- Pathom-Aree, W., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T., & Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10(3), 181–189.
- Pfeiffer, S., Pastar, M., Mitter, B., Lippert, K., Hackl, E., Lojan, P., *et al.* (2014). Improved group-specific primers based on the full SILVA 16S rRNA gene reference database. *Environmental Microbiology*, 16(8), 2389–2407.
- Pham, V. H. T., & Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology*, 30(9), 475–484.
- Piepersberg, W., Distler, J., Heinzl, P., & Perez-Gonzalez, J.-A. (1988). Antibiotic resistance by modification: Many resistance genes could be derived from cellular control genes in actinomycetes - a hypothesis. *Actinomycetologica*, 2(2), 83–98.
- Pietikäinen, J., Pettersson, M., & Bååth, E. (2005). Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1), 49–58.
- Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., & Emslie, K. R. (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry*, 84(2), 1003–1011.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171.
- Rather, P. N., Munayyer, H., Mann, P. A., Hare, R. S., Miller, G. H., & Shaw, K. J. (1992). Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Ib and IIa proteins. *Journal of Bacteriology*, 174(10), 3196–3203.
- Remrová, M., & Císlarová, M. (2010). Analysis of climate change effects on evapotranspiration in the watershed Uhlířská in the Jizera Mountains. *Soil and Water Research*, 5(1), 28–38.
- Riccio, M. L., Docquier, J.-D., Dell'Amico, E., Luzzaro, F., Amicosante, G., & Rossolini, G. M. (2003). Novel 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(5), 1746–1748.
- Ridley, C. P., Lee, H. Y., & Khosla, C. (2008). Evolution of polyketide synthases in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12), 4595–4600.
- Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M., & Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 6(9), 981–989.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., *et al.* (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12(1), 83–88.
- Roesch, L. F. W., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Km, A., Kent, A. D., *et al.* (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 1(4), 283–290.

- Rousk, J., Brookes, P. C., & Bååth, E. (2009). Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1589–1596.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., *et al.* (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4(10), 1340–1351.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., *et al.* (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146–167.
- Rutsaert, S., Bosman, K., Trypsteen, W., Nijhuis, M., & Vandekerckhove, L. (2018). Digital PCR as a tool to measure HIV persistence. *Retrovirology*, 15(1), 1–8.
- Ságová-Marečková, M., Čermák, L., Novotná, J., Plháčková, K., Forstová, J., & Kopecký, J. (2008). Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2902–2907.
- Ságová-Marečková, M., Omelka, M., Čermák, L., Kameník, Z., Olšovská, J., Hackl, E., *et al.* (2011). Microbial communities show parallels at sites with distinct litter and soil characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7560–7567.
- Ságová-Marečková, M., Čermák, L., Omelka, M., Kyselková, M., & Kopecký, J. (2015a). Bacterial diversity and abundance of a creek valley sites reflected soil pH and season. *Open Life Sciences*, 10(1), 61–70.
- Ságová-Marečková, M., Ulanová, D., Sanderová, P., Omelka, M., Kameník, Z., Olšovská, J., & Kopecký, J. (2015b). Phylogenetic relatedness determined between antibiotic resistance and 16S rRNA genes in actinobacteria. *BMC Microbiology*, 15(81), 1–13.
- Sakai, M., Matsuka, A., Komura, T., & Kanazawa, S. (2004). Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *Journal of Microbiological Methods*, 59(1), 81–89.
- Sarno, R., McGillivray, G., Sherratt, D. J., Actis, L. A., & Tolmasky, M. E. (2002). Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3422–3427.
- Semêdo, L. T. A. S., Linhares, A. A., Gomes, R. C., Manfio, G. P., Alviano, C. S., Linhares, L. F., & Coelho, R. R. R. (2001). Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. *Microbiological Research*, 155(4), 291–299.
- Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R., & Khan, A. U. (2008). Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of Biomedical Science*, 15(1), 5–14.
- Sharp, P. M., Cowe, E., Higgins, D. G., Shields, D. C., Wolfe, K. H., & Wright, F. (1988). Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Research*, 16(17), 8207–8211.
- Shaw, K. J., Hare, R. S., Sabatelli, F. J., Rizzo, M., Cramer, C. A., Naples, L., *et al.* (1991). Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(11), 2253–2261.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138–163.

- Shaw, P.-C., Liang, A. C.-T., Kam, K.-M., & Ling, J. M. (1996). Presence of *strA-strB* gene within a streptomycin-resistance operon in a clinical isolate of *Shigella flexneri*. *Pathology*, 28(4), 356–358.
- Singh, V. K., Govindarajan, R., Naik, S., & Kumar, A. (2000). The effect of hairpin structure efficiency on PCR amplification. *Molecular Biology Today*, 1(3), 67–69.
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., & Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology*, 7(3), 373–390.
- Spigaglia, P. (2016). Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 23–42.
- Sundin, G. W. (2002). Distinct recent lineages of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Current Microbiology*, 45(1), 63–69.
- Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., & Morley, A. A. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques*, 13(3), 444–449.
- Tamegai, H., Eguchi, T., & Kakinuma, K. (2002a). First identification of *Streptomyces* genes involved in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 55(11), 1016–1018.
- Tamegai, H., Nango, E., Kuwahara, M., Yamamoto, H., Ota, Y., Kuriki, H., *et al.* (2002b). Identification of L-glutamine: 2-deoxy-scyllo-inosose aminotransferase required for the biosynthesis of butirosin in *Bacillus circulans*. *The Journal of Antibiotics*, 55(8), 707–714.
- Tamegai, H., Kuki, T., Udagawa, Y., Aoki, R., Nagaya, A., & Tsukada, S. (2006). Exploration of genes that encode a carbocycle-forming enzyme involved in biosynthesis of aminoglycoside antibiotics from the environmental DNA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(7), 1711–1716.
- Taylor, S. C., Laperriere, G., & Germain, H. (2017). Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports*, 7(2409), 1–8.
- Thomas, W. D. J., & Archer, G. L. (1989). Mobility of gentamicin resistance genes from staphylococci isolated in the United States: identification of Tn4031, a gentamicin resistance transposon from *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(8), 1335–1341.
- Thungapathra, M., Amita, Sinha, K. K., Chaudhuri, S. R., Garg, P., Ramamurthy, T., *et al.* (2002). Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes *aac(6')-Ib*, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2948–2955.
- Tisdall, J. M. (1994). Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil*, 159(1), 115–121.
- Tolba, S., Egan, S., Kallifidas, D., & Wellington, E. M. H. (2002). Distribution of streptomycin resistance and biosynthesis genes in streptomycetes recovered from different soil sites. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), 269–276.
- Torsvik, V., Goksy, J., & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3), 782–787.
- Trieber, C. A., Burkhardt, N., Nierhaus, K. H., & Taylor, D. E. (1998). Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet(O): Tet(O) interaction with ribosomes is GTP-dependent. *Biological Chemistry*, 379(7), 847–855.
- Urbanová, M., Šnajdr, J., & Baldrian, P. (2015). Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 53–64.

- Uroz, S., Oger, P. M., Tisserand, E., Cébron, A., Turpault, M.-P., Buée, M., *et al.* (2016). Specific impacts of beech and Norway spruce on the structure and diversity of the rhizosphere and soil microbial communities. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
- Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 430–450.
- Van Elsas, J. D. (1992). Antibiotic resistance gene transfer in the environment: an overview. In E. M. H. Wellington & J. D. van Elsas (Eds.), *Genetic Interactions Among Microorganisms in the Natural Environment* (1st ed., pp. 17–39). Pergamon Press Ltd.
- Van Overbeek, L. S., Wellington, E. M. H., Egan, S., Smalla, K., Heuer, H., Collard, J.-M., *et al.* (2002). Prevalence of streptomycin-resistance genes in bacterial populations in European habitats. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), 277–288.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & Sinderen, D. van. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495–548.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), 9236–9241.
- Vögtli, M., & Hütter, R. (1987). Characterisation of the hydroxystreptomycin phosphotransferase gene (*sph*) of *Streptomyces glaucescens*: Nucleotide sequence and promoter analysis. *Molecular and General Genetics*, 208(1–2), 195–203.
- Wagg, C., Bender, S. F., Widmer, F., & van der Heijden, M. G. A. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5266–5270.
- Walsh, F., & Duffy, B. (2013). The culturable soil antibiotic resistome: a community of multi-drug resistant bacteria. *PLoS One*, 8(6), 1–11.
- Wang, N., Guo, X., Yan, Z., Wang, W., Chen, B., Feng Ge, & Ye, B. (2016). A comprehensive analysis on spread and distribution characteristic of antibiotic resistance genes in livestock farms of Southeastern China. *PLoS One*, 11(7), 1–14.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176(5), 386–390.
- Wawrik, B., Kerkhof, L., Zylstra, G. J., & Kukor, J. J. (2005). Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2232–2238.
- Wawrik, B., Kutliev, D., Abdivasievna, U. A., Kukor, J. J., Zylstra, G. J., & Kerkhof, L. (2007). Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2982–2989.
- Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3), 577–585.
- Wen, J.-T., Zhou, Y., Yang, L., & Xu, Y. (2014). Multidrug-resistant genes of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* strains. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3842–3849.
- Wiener, P., Egan, S., & Wellington, E. M. H. (1998). Evidence for transfer of antibiotic-resistance genes in soil populations of streptomycetes. *Molecular Ecology*, 7(9), 1205–1216.
- Woodford, N., Morrison, D., Cookson, B., & George, R. C. (1993). Comparison of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from different continents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(4), 681–684.

- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470.
- Wybenga-Groot, L. E., Draker, K., Wright, G. D., & Berghuis, A. M. (1999). Crystal structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. *Structure*, 7(5), 497–507.
- Yokoyama, K., Kudo, F., Kuwahara, M., Inomata, K., Tamegai, H., Eguchi, T., & Kakinuma, K. (2005). Stereochemical recognition of doubly functional aminotransferase in 2-deoxystreptamine biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 127(16), 5869–5874.
- Yoshioka, A. (1998). Use of randomisation in the Medical Research Council's clinical trial of streptomycin in pulmonary tuberculosis in the 1940s. *BMJ*, 317(7167), 1220–1223.
- Zaman, G. J. R., & Michiels, P. J. A. (2006). Targeting RNA with small molecule drugs. In P. A. McNamar (Ed.), *Trends in RNA Research* (pp. 1–21). Nova Science Publishers, Inc.
- Zenova, G. M., Manucharova, N. A., & Zvyagintsev, D. G. (2011). Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Eurasian Soil Science*, 44(4), 417–436.
- Zishiri, O. T., Mkize, N., & Mukaratirwa, S. (2016). Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 83(1), 1–11.
- Zonta, E., Garlan, F., Pécuchet, N., Perez-Toralla, K., Caen, O., Milbury, C., *et al.* (2016). Multiplex detection of rare mutations by picoliter droplet based digital PCR: sensitivity and specificity considerations. *PLoS One*, 11(7), 1–20.