

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Izolace a stanovení sekundárních metabolitů vybraných kmenů aktinomycet

Ondřej Vacek

Džbánov 2012

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: 4. Biologie

Izolace a stanovení sekundárních metabolitů vybraných kmenů aktinomycet

Autor: Ondřej Vacek

Škola: Gymnázium Aloise Jiráska, Litomyšl

Konzultant: Mgr. Zdeněk Kameník

Džbánov 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svoji práci vypracoval samostatně, použil jsem pouze podklady (literaturu, SW atd.) uvedené v přiloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Ve Džbánově dne 4.3.

podpis:

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval vedoucímu své stáže, která probíhala v rámci programu Otevřená věda II, Mgr. Zdeňku Kameníkovi za jeho čas a pomoc, kterou mi věnoval během práce v laboratoři. Děkuji mu i za cenné rady při psaní textu této práce. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Tereze Tylové za vytvoření příjemného pracovního prostředí v prostorách Mikrobiologického ústavu Akademie věd. Rád bych vyjádřil své díky paní učitelce Marii Könyüové za nabídku přihlášení do výše zmíněného programu.

Anotace

Tato práce se zaměřuje na izolaci a identifikaci biologicky aktivních látek, které jsou produkovány aktinomycetami. Tyto bakterie produkují téměř polovinu dosud známých antibiotických látek, a proto hledání biologicky aktivních látek mezi jejich sekundárními metabolity může znamenat zjištění dosud neznámé, potencionálně v praxi aplikovatelné, látky. Ke zkoumání byly vybrány aktinomycety, u jejichž sekundárních metabolitů se při separaci neosvědčily běžné metody extrakce. Pro úspěšnou izolaci bylo zvoleno širší spektrum extrakčních metod, stanovení biologicky aktivních látek proběhlo pomocí moderních analytických metod.

Klíčová slova: mikrobiologie, aktinomycety, sekundární metabolity, antibiotika, izolace
biologicky aktivních látek, stanovení biologicky aktivních látek

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Antibiotika	8
2.1.2 Producenti antibiotik	8
2.1.2.1 Aktinomycety	9
2.1.3 Klasifikace antibiotik	10
2.1.4 Mechanismus působení antimikrobiálních látek	10
2.1.4.1 Antibiotika působící proti syntéze buněčné stěny	11
2.1.4.2 Antibiotika způsobující inhibici nukleových kyselin	12
2.1.4.3 Antibiotika narušující funkce buněčných membrán	13
2.1.4.4 Antibiotika inhibující syntézu bílkovin a funkci ribozomů	13
2.1.4.5 Antibiotika působící v jiných zásahových místech	14
2.1.5 Rezistence na antimikrobiální látky	14
2.1.6 Vývoj nových antibiotik	15
2.2 Testy biologické aktivity	15
2.2.1 Diskový difúzní test	15
2.2.2 Mikroorganismy používané pro test biologické aktivity	16
2.3 Extrakce kultivačního média	17
2.3.1 Extrakce kapalina-kapalina	17
2.3.2 Extrakce na pevné fázi	18
2.4 Kapalinová chromatografie	19
2.5 Hmotnostní spektrometrie	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 Chemikálie	21
3.2 Kultivace aktinomycet	21
3.3 Testy biologické aktivity	22
3.4 Extrakce kultivačních médií	22
3.5 UHPLC analýza	23
3.6 Frakcionace extraktů	24
3.7 Hmotnostní spektrometrie	24
4 VÝSLEDKY	25
4.1 Testy biologické aktivity kultivačních médií aktinomycet	25

4.2 SPE a LLE extrakce	26
4.2.1 Testy biologické aktivity extraktů	26
4.3 UHPLC analýza a HPLC frakcionace	28
4.4 MS analýza biologicky aktivních látek	31
 5 ZÁVĚR	 33
 SEZNAM LITERATURY	 34

1 ÚVOD

Antibiotika jsou skupinou látek využívanou člověkem k léčbě infekčních onemocnění. Od objevu penicilinu ve 30. letech Alexandrem Flemingem došlo k vývoji mnoha nových antibiotických léčiv. Tato léčiva zefektivnila boj s infekčními chorobami jako tuberkulóza, tyfus, syfilis aj. Vzhledem k rezistenci mikroorganismů však klesá účinnost některých antibiotik, což umožňuje nárůst odolnosti patogenů na používané agens. Stará a často aplikovaná antibiotika je tak potřeba nahradit novými látkami.

Existuje několik možností vývoje nových antibiotik, mezi nimiž stále hraje důležitou roli hledání dosud neprozkoumaných látek s biologickou aktivitou mezi sekundárními metabolity organismů, nejčastěji bakterií. Velice zajímavou skupinou bakterií jsou aktinomycety, jejichž sekundární metabolity často prokazují inhibiční účinky. Antibiotika jako streptomycin, tetracyklin nebo vankomycin byla v minulosti izolována z prostředí aktinomycet, proto izolace bioaktivních látek produkovaných těmito typicky půdními bakteriemi může nabídnout zjištění nových antiinfektiv.

Tato práce se zaměřuje na izolaci sekundárních metabolitů z kultivačních médií vybraných druhů aktinomycet pomocí různých metod extrakce. Dalším cílem je potvrzení biologické aktivity sekundárním metabolitů a určení chemické struktury aktivní látky.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Antibiotika

Mnohé organismy mají schopnost produkce tzv. sekundárních metabolitů. Toto označení se používá pro látky, které organismus ke svému růstu ani reprodukci primárně nevyužívá, ale jsou nezbytné pro úspěšné přežití v podmínkách jeho přirozeného okolního prostředí¹. Sekundární metabolity, které prokazují antimikrobiální účinnost, označujeme jako antibiotika².

Pro svoji schopnost pozastavit růst mikroorganismů nebo mikroorganismy usmrtit si antibiotika našla uplatnění zejména v humánní a veterinární medicíně. Většina antibiotik jsou látky s molekulární hmotností nižší než 2000 g mol⁻¹. Chemická struktura těchto látek je různorodá a odpovídá jí i mechanismus působení daného antibiotika, spektrum nebo nežádoucí účinky³.

2.1.2 Producenti antibiotik

Antibiotika produkuje mnoho organismů, nejčastěji mikroorganismy jako bakterie, řasy, houby, lišejníky, ale také některé vyšší rostliny či živočichové. Jednotliví producenti antibiotik jsou uvedeny v Tab.1.

Největší podíl na produkci antibiotik mají bakterie. Z nich jsou to pak především aktinomycety, produkující téměř polovinu všech známých antibiotik (Kettnerová, 2010).

¹ KETTNEROVÁ, Eliška. Izolace a charakterizace biologicky aktivních látek. Praha, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Karlova. Dále uváděno (Kettnerová, 2010)

² Pozn.: V dnešní době jsou jako antibiotika často označovány i látky vyrobené synteticky, tedy chemoterapeutika.

³ VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, ISBN 80-868-5000-5. Dále uváděno (Votava, 2005)

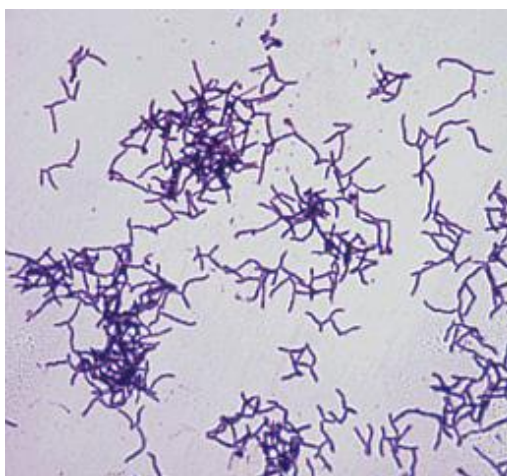
Tab. 1 Druhy producentů a počet produkovaných antibiotik (Kettnerová, 2010).

Producent	Počet produkovaných antibiotik
Bakterie (mimo aktinomycet)	1400
Aktinomycety	7900
Houby	2600
Lišejníky	150
Řasy	700
Vyšší rostliny	5000
Živočichové	1700

2.1.2.1 Aktinomycety

Jako aktinomycety se označují grampozitivní aerobní bakterie tvořící dlouhá větvená vlákna (hyfy), která jsou uskupena buď v mycelium, nebo se rozpadají v tyčinkovité či kulovité kulovité buňky (Obr. 1). K reprodukci slouží u některých druhů spory, některé rody tvoří sporangia, obsahující endospory.

Typickým životním prostředím pro aktinomycety je půda, které dodávají charakteristický plísňový pach. Některé druhy jsou pro člověka patogenní. Řada aktinomycet produkuje antibiotika účinná proti bakteriím houbám nebo virům⁴.



Obr.1 Mikroskopický snímek *Actinomyces israelii*, patogenní aktinomycety (převzato z ⁵).

⁴ ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, ISBN 80-200-1024-6. Dále uváděno (Šilhánková, 2002)

⁵Zdroj obrázku: www.human-healths.com

2.1.3 Klasifikace antibiotik

Antibiotika jsou obsáhlou skupinou látek a můžeme je dělit podle řady vlastností⁶. Níže jsou antibiotika rozdělena podle své biologické aktivity a uvnitř těchto skupin jsou dále dělena na základě chemické struktury (Votava, 2005):

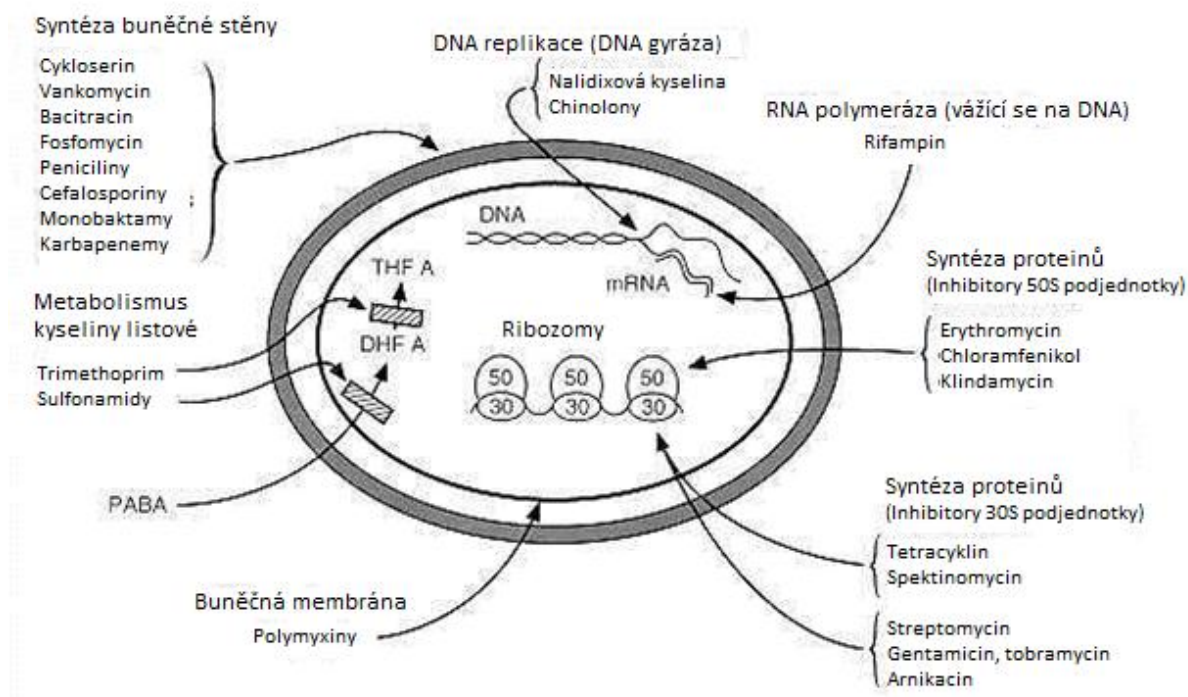
- a) Beta-laktamy
 - I. cefalosporiny (cefazafur, ceforanid)
 - II. peniciliny (benzylpenicilin, azidocilin)
 - III. monobaktamy (aztreonam)
 - IV. karbapenemy (meropenem)
- a) Tetracykliny (tetracyklin, doxycyklin)
- b) Aminoglykosidy (neomycin, gentamycin)
- c) Makrolidy (erythromycin, spiramycin)
- d) Linkosamidy (linkomycin, clindamycin)
- e) Amfenikoly (chloramfenikol)
- f) Polypeptidová antibiotika (colistin, polymyxin B)
- g) Glykopeptidová antibiotika (vankomycin)
- h) Ansamycinová antibiotika (rifampicin, rifabutin)
- i) Sulfonamidy a pyrimidiny (trimethoprim)
- j) Nitroimidazoly a nitrofurany (metronidazol, ornidazol)
- k) Chinolony (kyselina nalidixová, kyselina oxolinová)

2.1.4 Mechanismy působení antimikrobiálních látek

Antibiotika a chemoterapeutika mohou zasahovat v různých místech mikrobiální buňky a různými způsoby. Podle zásahových míst (Obr.2) lze také klasifikovat antibiotika do několika skupin. Hlavními cíli antibakteriálního účinku jsou (Votava, 2005):

⁶ Kromě chemické struktury je možné dělit antibiotika na základě biologického působení (antibakteriální, antivirální atd.), podle mechanismu účinku (viz kapitola 2.1.4) případně chemoterapeutika můžeme dělit podle způsobu syntézy (syntéza z jednoho základního stavebního bloku, syntéza z několika základních jednotek atd.) (Kettnerová, 2010).

- syntéza buněčné stěny
- syntéza nukleových kyselin
- funkce buněčné membrány
- syntéza bílkovin a funkce ribozomů
- jiná zásahová místa



Obr.2 Zásahová místa v buňce s příklady antibiotik účinných v daných oblastech. (Převzato z ⁷).

2.1.4.1 Antibiotika působící inhibicí syntézy buněčné stěny

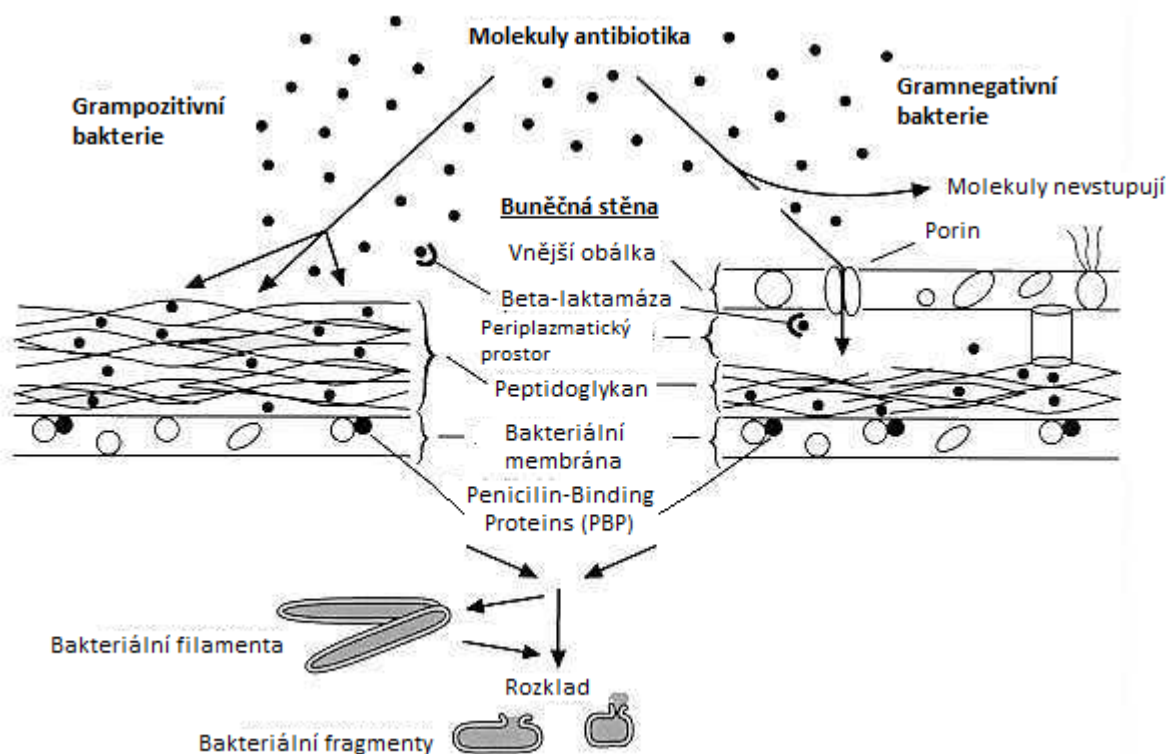
Buněčná stěna bakterií, především Gram-pozitivních, je tvořena peptidoglykanovou vrstvou (Obr. 3). Tato vrstva je nezbytná pro přežití bakterií v hypotonickém prostředí a její ztráta nebo poškození snižuje pevnost buňky a následnou smrt⁸.

Látky znemožňující syntézu buněčné stěny působí velmi účinně a selektivně (pouze na buňky bakterií). Příkladem je široká skupina, prakticky netoxických, beta-laktamových

⁷ Zdroj obrázku: BARON, Samuel. Medical microbiology [online]. 4th ed. Galveston, Tex., 1273 s. [cit. 2012-03-08]. ISBN 09-631-1721-1.

⁸ BARON, Samuel. Medical microbiology. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, 1273 s. ISBN 09-631-1721-1. Dále uváděno (Baron, 1996)

antibiotik (peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy), dále glykopeptidy (vankomycin) a některá antituberkulotika (isoniazid, ethambutol, cykloserin). Všechny tyto látky působí baktericidně (Votava, 2005, str. 237).



Obr. 3 Inhibice syntézy buněčné stěny je jednodušší u grampozitivních bakterií. Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu tvořenou i vnější cytoplazmatickou membránou, která znesnadňuje průnik antimikrobiální látky (převzato z: Baron, 1996).

2.1.4.2 Antibiotika způsobující inhibici syntézy nukleových kyselin

Antimikrobiální látky mohou zabraňovat syntéze nukleových kyselin na několika úrovních. Jsou schopné narušit syntézu nukleotidů, mohou zabránit expresi genů z DNA a mohou interferovat s polymerázami nezbytnými pro replikaci a transkripci DNA (Baron, 1996).

Inhibitory nukleových kyselin jsou pro lidské tělo obecně toxičtější než látky inhibující syntézu buněčné stěny. Replikaci DNA narušují chinolony, ovlivňující bakteriální

DNA-gyrasu⁹. Nitroimidazoly rozrušují již hotovou DNA a s transkripcí interferují ansamyciny (ryfampicin). Syntézu DNA kvasinek inhibuje flucytosin a na DNA dermatofytů působí griseofulvin (Votava, 2005, str. 237).

2.1.4.3 Antibiotika narušující funkce buněčných membrán

Biologické membrány jsou složeny zejména z lipidů, proteinů a lipoproteinů. Cytoplazmatická membrána zabraňuje volné difúzi vody, iontů a živin do buňky a funguje také jako transportní systém. Existuje velké množství látek způsobujících dezorganizaci membrán, zejména však polypeptidická antibiotika vykazují vysoce toxické účinky (Baron, 1996).

Nejznámější antibiotika této skupiny jsou polymyxin B a kolistin¹⁰. Buněčná membrána je též terčem antimykotik ze skupiny azolů (ketokonazol, flukonazol aj.) a polyenů (amfotericin B, nystatin) (Votava, 2005, str. 237).

2.1.4.4 Antibiotika inhibující syntézu bílkovin a funkci ribozomů

Funkci ribozomů inhibuje velké množství antimikrobiálních látek. Proteosyntézu potlačují aminoglykosidy (streptomycin, gentamycin, amikacin a jiné), které se nevratně vážou na menší (30S) jednotku bakteriálního ribozomu. Tímto způsobem buď znemožní rozběh proteosyntézy, nebo zapříčiní vznik nefunkčních bílkovin. Na stejné ribozomální jednotce účinkují také bakteriostatické tetracykliny. Bakteriostatický účinek mají i další inhibitory tvorby polypeptidů – chloramfenikol, makrolidy (např. erytromycin) a linkosamidy (např. linkomycin). (Votava, 2005, str. 237)

⁹ DNA gyráza je enzym zodpovědný za správný průběh replikace DNA

¹⁰ Tyto vysokomolekulární oktapeptidy inhibují Gram-negativní bakterie (mající na povrchu buňky záporně nabitou část lipidů), zvýší permeabilitu cytoplazmatické membrány, dojde k úniku nukleových kyselin a kationtů a destrukci buňky (Baron, 1996).

2.1.4.5 Antibiotika působící v jiných zásahových místech

Do této skupiny patří především antibiotika působící jako antimetabolity. Zásahovým místem je metabolismus kyseliny listové.

Sulfonamidy snižují rychlost syntézy kyseliny listové na základě kompetitivní inhibice s kyselinou *p*-aminobenzoovou. Trimethoprim se také uplatňuje při inhibici metabolismu kyseliny listové, ale v jiném místě metabolického řetězce. Proto i když obě látky jsou bakteriostatické, jejich kombinace, co-trimaxazol, působí bakteriocidně. (Votava, 2005, str. 237)

2.1.5 Rezistence na antimikrobiální látky

Primární rezistence vůči určité antimikrobiální látce je dána druhem organismu a jeho původní genetickou výbavou (Šilhánková, 2002). Typickým příkladem je nízká citlivost na beta-laktamová antibiotika u gramnegativních bakterií. Ty obsahují vnější polopropustnou membránu znemožňující průnik beta-laktamových antibiotik k zásahovému místu – buněčné stěně.

Při sekundární rezistenci se primárně citlivé organismy stávají rezistentními vůči určité antimikrobiální látce. Získaná rezistence vzniká buď vinou mutací ovlivňujících geny na chromozomu, nebo přenosem genů pro rezistenci na plazmidu nebo transpozonu (Votava, 2005, str. 241).

Rezistence patogenních mikroorganismů (především lékařsky významných bakteriálních kmenů) stále stoupá, zejména v důsledku častého používání antibiotických léčiv. Mezi lékařsky významné rezistentní patogenetické druhy patří methicillin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), penicillin-rezistentní *S. pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*¹¹. Hledání nových antibiotik v přirozeném prostředí je jednou z možností, jak tento vážný problém řešit.

¹¹ COATES, A R M a Y HU. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. British Journal of Pharmacology [online]. 2007, roč. 152, č. 8, s. 1147-1154 [cit. 2012-03-08]. ISSN 00071188. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707432. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0707432>. Dále pouze jako (Coates & Hu, 2007)

2.1.6 Vývoj nových antibiotik

V současné době existuje několik způsobů, které mohou vést k objevu nebo získání nových antibiotických látek, které by byly účinné i vůči rezistentním druhům mikroorganismů. Jednou z možností je zkoumání sekundárních metabolitů dosud netestovaných organismů¹². Často jsou to extremofilní organismy¹³, které dříve stály na okraji pozornosti vědců. V dnešní době jsou běžné metody založené na zásahu do genů kódujících produkci antibiotika. Tyto metody umožňují získat sekundární metabolity z dříve nekultivovatelných bakterií (Coates & Hu, 2007)⁵⁺ nebo tzv. kombinatoriální biosyntézu¹⁴. Dále se provádí chemická modifikace již známých antibiotik nebo se hledají nová zásahová místa v buňkách mikrobů.

2.2 Test biologické aktivity

Testy biologické aktivity zjišťují citlivost sledovaného mikroorganismu na určitou antimikrobiální látku. Různé druhy těchto testů prokazují kvalitativně nebo kvantitativně bakteriocidní a bakteriostatické účinky testovaných agens.

2.2.1 Diskový difúzní test

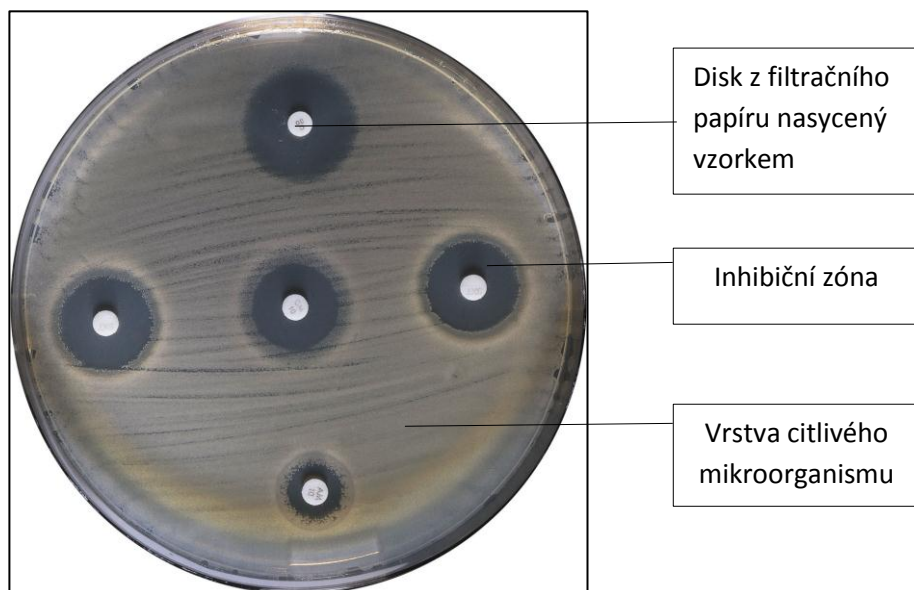
Diskový difúzní test slouží ke kvalitativnímu průkazu citlivosti. Provádí se na agarové půdě, na níž se masivně (tj. přelitím a následným odsátím přebytku) naočkuje vrstva inokula – citlivého mikroorganismu, nejčastěji G+ nebo G- bakterií (Obr.4). Na povrch agaru se umístí disky z filtračního papíru nasycené testovaným vzorkem a naočkované misky se poté

¹² Předpokládá se, že ve svrchní vrstvě půdy je na celé planetě 10^{25} - 10^{26} aktinomycet, ale jen 10^7 bylo v minulých padesáti letech zkoumáno z hlediska produkce antibiotik. Zdroj: SCHINDLER, Jiří. Ze života bakterií. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008, 143 s. ISBN 978-80-200-1666-9.

¹³ Příkladem biologicky aktivní látky produkované extremofilním organismem může být kyselina berkelová izolovaná ze slizovité mikromycety *Penicillium* žijící ve vodách s vysokým obsahem arsenu, kadmia a zinku. Zdroj: Berkelová kyselina, sekundární metabolit extremofilní mikromycety. In: PATOČKA, Jiří. Toxicology [online]. 9.2.2010 [cit. 2012-03-08]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=295>

¹⁴ VARKI, Ajit. Essentials of glycobiology [online]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2009, 784 s. [cit. 2012-03-08]. ISBN 9780879697709 (HARDCOVER : ALK. PAPER).

inkubují. Pokud je ve vzorku přítomná látka s biologickou aktivitou (v případě bakterií antibiotikum), na kterou není kmen rezistentní, vytvoří se během kultivace okolo disku inhibiční zóna. Tato zóna má určitý průměr, který je závislý na citlivosti bakterie na antibiotiku a na jeho koncentraci (Kettnerová, 2010).



Obr. 4 Petriho miska s agarovou půdou, na níž je naočkován citlivý mikroorganismus. Inhibiční zóny v okolí disku jsou výsledkem biologické aktivity vzorku nasyceného v terčíku. (Převzato z ¹⁵)

2.2.2 Mikroorganismy používané pro testy biologické aktivity

Účinek antibiotik na různé mikroorganismy je odlišný vzhledem k jejich různé buněčné stavbě, rozhodující vliv má především struktura buněčné stěny. Při využití bakterií jako citlivého organismu je vhodné použít jak grampozitivní (G+), tak gramnegativní (G-) bakterie, které se liší v organizaci buněčné stěny.

U grampozitivních bakterií je buněčná stěna stavěna poměrně jednoduše. Je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu a chybí zde vnější membrána a lipopolysacharidová vrstva. Při

¹⁵ Zdroj obrázku:

http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/CEA062801F63038AC12574B30025E35B?opendocument&LG=EN&

Gramově barvení dojde k navázání komplexu krystalové violeti s jodem na buněčnou stěnu a buňka se i po odbarvení jeví jako modrá¹⁶. Typickým zástupcem G+ bakterií je *Kocuria rhizophila* (Kettnerová, 2010).

Stavba buněčné stěny gramnegativních bakterií je složitější. Skládá se z vnější třívrstevné membrány obsahující fosfolipidy, lipopolysacharidy a proteiny a z vnitřní tenké a pevné peptidoglykanové vrstvy. Zevní membrána brání přístupu řadě molekul, mezi nimiž je i krystalová violet (Beveridge, 1990). Tyto bakterie tak při Gramově barvení nevykazují modrou barvu. Hojně používaná G- bakterie k testování biologické aktivity je *Escherichia coli* (Kettnerová, 2010).

2.3 Extrakce kultivačního média

Extrakce je separační proces, při kterém dochází k rozdělení látek do dvou vzájemně nemísitelných fází na základě svých chemických vlastností¹⁷. Tato metoda umožňuje oddělení biologicky aktivních látek z kultivačního média. Kultivační média jsou poměrně složité matrice. Proto se jejich separací omezí ucpávání chromatografické kolony i interference s látkami pocházející z matrice a zvýší se samotná citlivost analýzy (Kettnerová, 2010). Způsoby oddělení analytu od ostatních složek se dělí podle zúčastněných fází. Nejběžnějšími jsou extrakce kapaliny kapalinou (LLE, z angl. „Liquid-Liquid Extraction“) nebo v dnešní často používané technice extrakce na pevné fázi (SPE, z angl. „Solid Phase Extraction“) (Kettnerová, 2010).

2.3.1 Extrakce kapalina-kapalina

Metoda LLE je založena na distribuci analytů z kapalné matrice mezi molekuly jiné kapaliny mající odlišné chemické vlastnosti. Časté je použití polárního vodného vzorku a

¹⁶ BEVERIDGE, Terry J. Mechanism of Gram Variability in Select Bacteria. Journal of Bacteriology [online]. 1990, roč. 172, č. 3, s. 1609-1602 [cit. 2012-02-29]. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/172/3/1609.long>. Dále pouze jako (Beveridge, 1990)

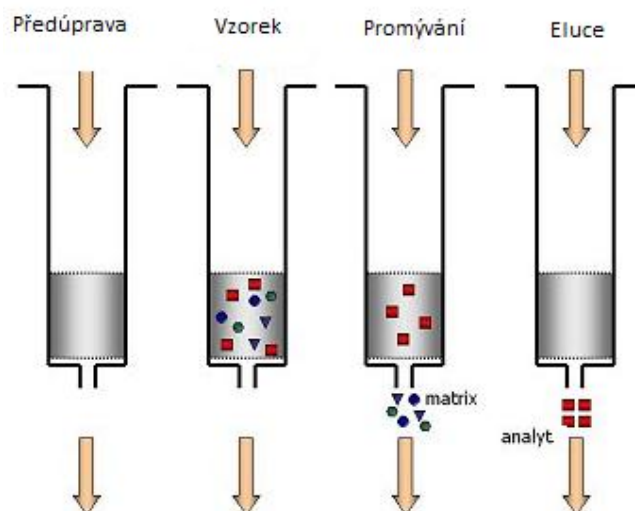
¹⁷ COUFAL, Pavel. UNIVERZITA KARLOVA. Separační metody: Extrakce. Praha, 2004. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>. Dále pouze jako (Coufal, 2004)

nepolárního, hydrofobního organického rozpouštědla. Požadované analyty se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Oddělení látek proběhne tím lépe, čím větší je rozdíl mezi jejich rozdělovacími koeficienty (Coufal, 2004).

2.3.2 Extrakce na pevné fázi

Při SPE extrakci dochází k selektivnímu zadržení analytu, pocházejícího z kapalně fáze, na tuhé fázi (sorbentu) (Obr.5). Sorbent musí interagovat s analytem silněji než analyt s kapalnou fází. Výhodami této metody oproti LLE je práce s menšími objemy vzorků, větší výtěžnost analytů, snadnější skladování vzorků na kolonkách a snížená spotřeba organických rozpouštědel. Lze se také vyhnout emulgování směsí a špatnému rozdělení fází. Současně také dochází k selektivnímu obohacení (prekoncentrace vzorku) (Coufal, 2004).

Existuje několik typů sorbentu na různé chemické bázi. Často se paralelně používá širší spektrum sorbentů tak, aby došlo k zachycení analytů různých chemických vlastností. Používají se fáze na bázi silikagelu, normální fáze a iontové výměnné fáze aj. Sorbent je uložen v kolonkách majících podobu trubiček z polypropylenu nebo skla (Kettnerová, 2010).



Obr.5 Schéma průběhu SPE extrakce. Během separace je nutné dodržet přesný pracovní postup, který se skládá z : 1. Předúprava kolonky (promývání sorbentu). 2. Dávkování vzorku. 3. Promývání

(vymytí zbytku matrice vzorku z kolonky). 4. Eluce (dochází k vymytí žádaných látek ze sorbentu). (Převzato z ¹⁸)

2.4 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační a analytickou metodou, která umožňuje zaznamenání jednotlivých složek sledovaného vzorku. Pracuje na principu rozdílné distribuce separovaných látek mezi dvě různé nemísitelné fáze. První (mobilní) fází je preparovaný vzorek usměrněně cestující přes molekuly sorbentu. Další fázi (stacionární) tvoří sorbent, na kterém se zachycují analyty z matrice. Podle mobilní fáze se chromatografické metody dělí na plynovou chromatografii, již lze analyzovat plynné vzorky a kapalinovou chromatografii (nejčastěji je využívána HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie), která je vhodná pro ionty, polární i nepolární látky, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární látky. Separace látek při HPLC probíhá v separační koloně. Zde distribuované analyty mají různou afinitu ke stacionární fázi a výsledkem toho jsou i po různý čas (retenční čas) zadržovány. Při průchodu detektorem je tento retenční čas i množství zaznamenáván v chromatogramu v podobě píků, jejichž velikost závisí na množství procházející látky.

Další nezbytnou součástí instrumentace jsou tedy detektory připojené na chromatografickou kolonu. Mezi nejběžnější patří UV detektor pro látky absorbující v UV oblasti

Na principu HPLC je založena i dokonalejší metoda UPLC (z angl. „Ultra Performance Liquid Chromatography) využívající menší částice sorbentu (1,7 μm). Výhody UPLC jsou možnost pracovat ve větším rozsahu lineárních rychlostí, vyšší účinnost kolony, zvýšení citlivosti a snížení mezí detekce a také zkrácení doby analýzy (Kettnerová, 2010, str. 24).

2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda založená na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem. Hmotnostní spektrometr separuje ionty podle jejich efektivní hmotnosti m/z a z výsledného hmotnostního spektra je poté možné

¹⁸ Zdroj obrázku:

<http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?sectionid=3&mytype=training&number=2&fsid=61>

určit relativní hmotnost atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty.

Hmotnostní spektrometr je složen z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a počítačové jednotky. Iontový zdroj slouží k ionizaci částic analyzované látky. Mezi nejčastěji používané způsoby ionizace patří ionizace elektronovým paprskem, desorpce laserem za nepřítomnosti matrice (MALDI, z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization), ionizace elektrosprejem aj. Hmotnostní analyzátory umožňují v čase nebo v prostoru separaci směsi iontů o různých hmotnostech. Rozlišují se například analyzátory magnetický, kvadrupólový, iontová past a průletový analyzátor (TOF – z angl. Time of Flight), kdy jsou ionty z iontového zdroje urychlovány napětím a stanovuje se doba průletu iontu letovou trubicí k detektoru. Detektory následně poskytují signál úměrný počtu dopadajících iontů.

Metody hmotnostní spektrometrie se využívá pro určení látek zastoupených ve vzorku nebo potvrzení jejich struktury. Ve spojení s chromatografickými metodami lze hmotnostní spektrometr využít jako detektor, a to především ke stopové analýze organických látek (Ketnerová, 2010, str. 25-26).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Acetonitril, LC/MS grade (99,95 %, Biosolve, Nizozemí).

Dichlormethan (99,90 %, Chromservis, ČR).

Ethylacetát p. a. (99,7 %, Lach-Ner, Česká republika).

Hexan (99,00 %, Merck, Německo).

Kyselina mravenčí (98,00 %, Lach-Ner, ČR).

Kyselina octová (99 %, Sigma-Aldrich, Německo).

Kyselina trifluoroctová (99,95 % ULC/MS grade, Biosolve, Nizozemí).

Methanol, LC/MS grade (99,95 %, Biosolve, Nizozemí).

Voda, HPLC grade, připravená pomocí reverzní osmózy na Direkt-Q 3 UV přístroji (Millipore, USA).

Hydroxid amonný, A. C. S. reagent (29 %, Sigma-Aldrich, Německo).

3.2 Kultivace aktinomycet

Ze sbírky mikroorganismů Mikrobiologického ústavu Akademie věd bylo vybráno 5 kmenů aktinomycet. Jednalo se o kmeny, u kterých byla prokázána produkce neznámých biologicky aktivních sekundárních metabolitů do kultivačního média (pozitivní test biologické aktivity vůči G+ *K. rhizophila* a G- *E. coli* bakteriím), avšak tyto látky se dosud nepodařilo extrahovat pomocí běžné metody extrakce na pevné fázi (SPE), a proto zatím nemohly být identifikovány.

Spory aktinomycet byly naočkovány do BG média (glukóza 4 g·l⁻¹, kvasniční extrakt 4 g·l⁻¹, sladový extrakt 10 g·l⁻¹, CaCO₃ 2 g·l⁻¹, pH 7,2; glukóza byla přidána po sterilizaci média). Inkubace první generace aktinomycet trvala 48 h, poté bylo 5 % kultury přeočkováno do stejného média a inkubováno na rotační třepačce po dobu 12 dní při 28 °C. Po kultivaci

byly buňky od kultivačního média odděleny odstředěním (4000 rpm, 20 °C, 15 min) a takto získaný supernatant byl použit pro další experimenty.

3.3 Testy biologické aktivity

Testy biologické aktivity sekundárních metabolitů sledovaných aktinomycet byly provedeny pomocí diskového difúzního testu (Kirby-Bauer test). Jako kultivační médium pro citlivé mikroorganismy byla použita agarová půda B1 (hovězí extrakt 10 g l⁻¹, pepton 10 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, agar 20 g l⁻¹, destilovaná H₂O, pH 7,2). Na agarovou půdu byla rozprostřena suspenze spor citlivého mikroorganismu a do takto připravené vrstvy byl umístěn vzorek testovaný na přítomnost bioaktivních látek. Mezi citlivé mikroorganismy použité pro testy biologické aktivity patřili *Escherichia coli* (G- bakterie) a *Kocuria rhizophila* (G+ bakterie). Citlivé kmeny byly spolu s nanesenými vzorky inkubovány při 37 °C po dobu 20 h. Výskyt biologicky aktivních látek byl potvrzen vytvořením inhibiční zóny v okolí vzorku.

V případě testů biologické aktivity kultivačních médií aktinomycet byly do vrstvy agarové půdy vytvořeny otvory o průměru 7 mm, do kterých byl napipetován vzorek příslušného kultivačního média aktinomycet (150 µl). Pokud byly testovány extrakty kultivačních médií aktinomycet nebo frakce extraktů, byly na vrstvu citlivých spor nanесeny disky z filtračního papíru nasycené těmito extrakty (20 µl) nebo frakcemi extraktů (15 µl).

3.4 Extrakce kultivačních médií

Z BG média byly extrahovány biologicky aktivní látky pomocí metod SPE a extrakce kapalina kapalinou (LLE). V případě SPE byl supernatant přečištěn a prekoncentrován třemi různými kolonkami – HLB (z angl. „hydrophilic lipophilic balanced sorbent“), MCX (z angl. „mixed-mode cation exchange sorbent“) a MAX (z angl. „mixed-mode anion exchange sorbent“). Postup při extrakci byl následující:

SPE, HLB kolonka:

- kondicionace: 3 ml methanolu
- ekvilibrace: 3 ml vody

- vzorek: 3 ml kultivačního média
- promytí: 3 ml vody
- eluce: 1 ml methanolu

SPE, MCX kolonka

- kondicionace: 3 ml methanolu
- ekvilibrace: 3 ml vody
- vzorek: 3 ml okyseleného kultivačního média (pH 3,4–3,6)
- promytí: 3 ml 2% HCOOH
- eluce (frakce MCX 1) : 1 ml methanolu
- eluce (frakce MCX 2) : 1 ml 5% NH₄OH v methanolu

SPE, MAX kolonka:

- kondicionace: 3 ml methanolu
- ekvilibrace: 3 ml vody
- vzorek: 3 ml alkalického kultivačního média (pH 8,5–8,9)
- promytí: 3 ml 5% NH₄OH
- eluce (frakce MAX 1) : 1 ml methanolu
- eluce (frakce MAX 2) : 1 ml 2% HCOOH v methanolu

Při LLE byly 3 ml kultivačního média aktinomycet smíchány se stejným objemem organického rozpouštědla. Byla použita celkem čtyři různá organická rozpouštědla: dichlormethan, trichlormethan, ethylacetát a hexan. Takto připravená směs byla protřepána (vortex, 5 min) a centrifugována (4000 rpm, 20°C, 10 min). Organické fáze byly odděleny, odpařeny dosucha na vakuové odparce a následně rekonstituovány ve 200 µl 50% methanolu. Výsledný extrakt byl tedy 15× prekoncentrován. Získané extrakty byly dále testovány na biologickou aktivitu, analyzovány pomocí UHPLC a případně dále frakcionovány pomocí HPLC.

3.5 UHPLC Analýza

Extrakty kultivačních médií byly analyzovány pomocí ultraúčinného kapalinového chromatografu Acquity UPLC[®] vybaveného PDA 2996 detekčním systémem (UV detektor diodového pole, DAD) s rozmezím vlnových délek 194–800 nm a LCT Premier XE

hmotnostním spektrometrem (MS) s analyzátozem doby letu (TOF, z angl. „time of flight“; Waters, USA). 5 μl extraktu bylo dávkováno na kolonu Acquity BEH C18 (BEH C18; 50 mm $\times$ 2,1 mm, 1,7 μm ; Waters, USA) a eluováno při průtokové rychlosti 0,4 ml min⁻¹ v módu lineárního gradientu (min/% organického modifikátoru): 0/5; 1,5/5; 15/95; 16/100; 17/100; 18/5. Jako mobilní fáze byly použity 0,1% roztok HCOOH v methanolu (organický modifikátor) a 0,1% roztok HCOOH v H₂O. Teplota kolony byla udržována při 40 °C. Data byla vyhodnocena programem MassLynx 4.0 software (Waters, USA). Podmínky MS detekce byly následující: napětí na kapiláře, simultánní měření při +2500 V a -2500 V; napětí na vstupu do analyzátoru, 40 V; teplota bloku iontového zdroje, 120 °C; teplota desolvatačního plynu – dusíku, 350 °C; průtok desolvatačního plynu, 800 L h⁻¹; průtok dusíku při vstupu do analyzátoru, 50 L h⁻¹. Hmotnostní spektrum ve W módu bylo měřeno v rozsahu hodnot 100–1000 *m/z*. Doba skenu byla 0,1 s, doba mezi skeny činila 0,01 s (při změně polarity, 0,3 s; pro referentní látku, 0,1 s). Jako referentní látka pro udržení přesné hmoty v průběhu měření byl použit leucin-enkefalin (2 ng μl^{-1} , 5 μl min⁻¹).

3.6 Frakcionace extraktů

Extrakty kultivačních médií byly rozděleny do jednotlivých frakcí pomocí HPLC (viz kapitola 2.5) s napojením na sběrač frakcí. HPLC analýzy byly provedeny na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu (Waters, USA) vybaveném UV detektorem Waters 486. Preparativní analýzy byly provedeny na koloně Luna C18. Data byla vyhodnocena programem Empower software (Waters, USA). K frakcionaci bylo celkem použito 20 μl vzorku smíchaného z extraktu MCX1 a MCX2, celkem bylo vytvořeno 60 frakcí během analýzy. Získané frakce byly odpařeny do sucha a rozpuštěny v 20 μl 50% methanolu. 15 μl bylo následně použito na test biologické aktivity, zbylých 5 μl bylo zředěno v 10 μl 50% methanolu a analyzováno pomocí UHPLC.

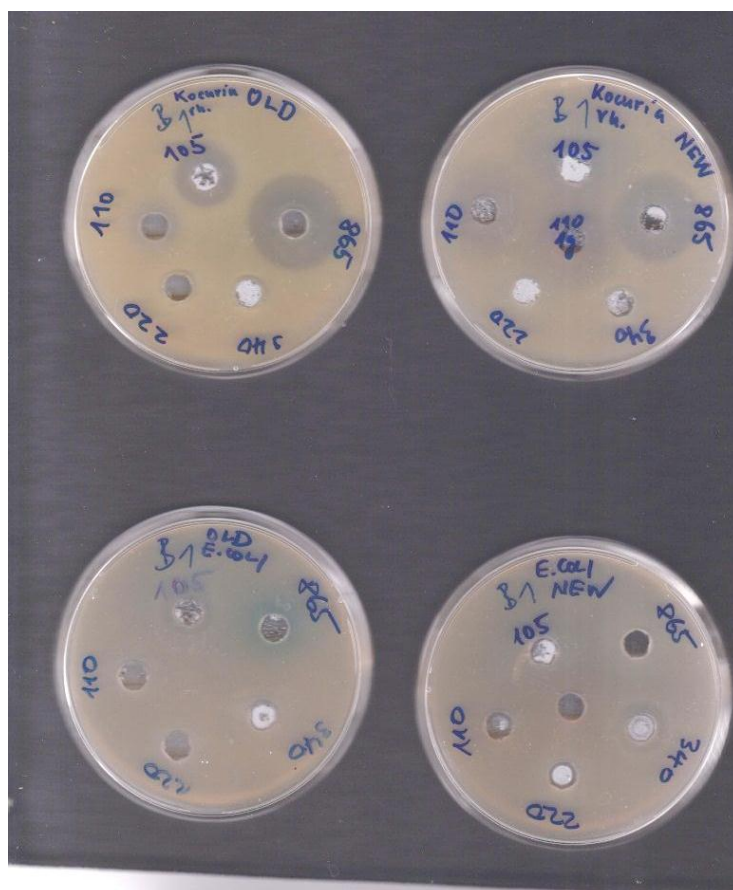
3.7 Hmotnostní spektrometrie

Frakce s biologickou aktivitou byly analyzovány pomocí Hmotnostní spektrometrie. Ionizace analytů byla provedena elektrosprejem. Jako hmotnostní analyzátor byl použit TOF. Z výsledných hmotnostních spekter byly určeny monoizotopické hmotnosti.

4. VÝSLEDKY

4.1 Testy biologické aktivity kultivačních médií aktinomycet

Testy biologické aktivity kultivačních médií aktinomycet vyšli pozitivní pro kmeny označené č. 105, 110, 340 a 846. Tyto aktinomycety produkovali látky schopné inhibovat růst citlivého mikroorganismu (*E. coli*, *K. rhizophilla*), což se prokázalo vytvořením inhibiční zóny v okolí nadávkovaného kultivačního média (Obr. 6). Dále byly podrobeny extrakci pozitivní vzorky takové, u nichž v předchozích experimentech provedených na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd ČR (MBÚ AV) nebyla úspěšně provedena běžná extrakce na pevné fázi (kmeny č. 110 a 340) (tab. 2).



Obr. 6 Výsledky testů biologické aktivity kultivačních médií aktinomycet. Petriho misky na levé straně pocházejí z experimentu již jednou provedeného na MBÚ AV (označení OLD). Petriho misky na pravé straně ukazují výsledek nového pokusu (označení NEW).

Tab. 2 Výsledky testu biologické aktivity kultivačních médií aktinomycet.

Pokus č.*	kmen	Test pro kultivační médium		Test pro SPE extrakt	
		<i>K. rhizophila</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>E. coli</i>
1.	220	1,0	0,0	0,0	0,0
2.		0,0	0,0		
1.	110	1,2	0,0	0,5	0,0
2.		1,6	0,0		
1.	340	0,0	1,1	0,0	0,0
2.		0,0	1,4		
1.	865	2,3	1,0	1,4	0,0
2.		2,4	0,0		
1.	105	1,4	1,3	0,0	0,0
2.		1,2	0,0		

*Pokus č. 1 je označení pro experiment provedený dříve na MBÚ AV. Pokus č. 2 je experiment provedený v této práci. K dalšímu sledování byly vybrány ty vzorky, které vykazovaly inhibiční zóny v obou případech a zároveň u nich nebyl získán extrakt s výraznou biologickou aktivitou během pokusu č. 1.

4.2 SPE a LLE extrakce

Při SPE a LLE extrakci došlo k vytvoření devíti extraktů pokaždé za jiných podmínek tak, aby izolace hledaných látek proběhla s co nejvyšší pravděpodobností.

4.2.1. Testy biologické aktivity extraktů kultivačních médií aktinomycet

SPE i LLE extrakty kultivačních médií prokazovaly biologickou aktivitu pouze u kmene č. 110. při působení na citlivou bakterii *Kocuria rhizophila* (Obr. 7). Nejvýraznější inhibiční zóna byla pozorovatelná u vzorku MCX1 a MCX2 (Tab. 3). Pro kmen č. 340 testovaný na citlivé bakterii *Escherichia coli* taktéž nebyla potvrzená biologická aktivita u žádného z extraktů.



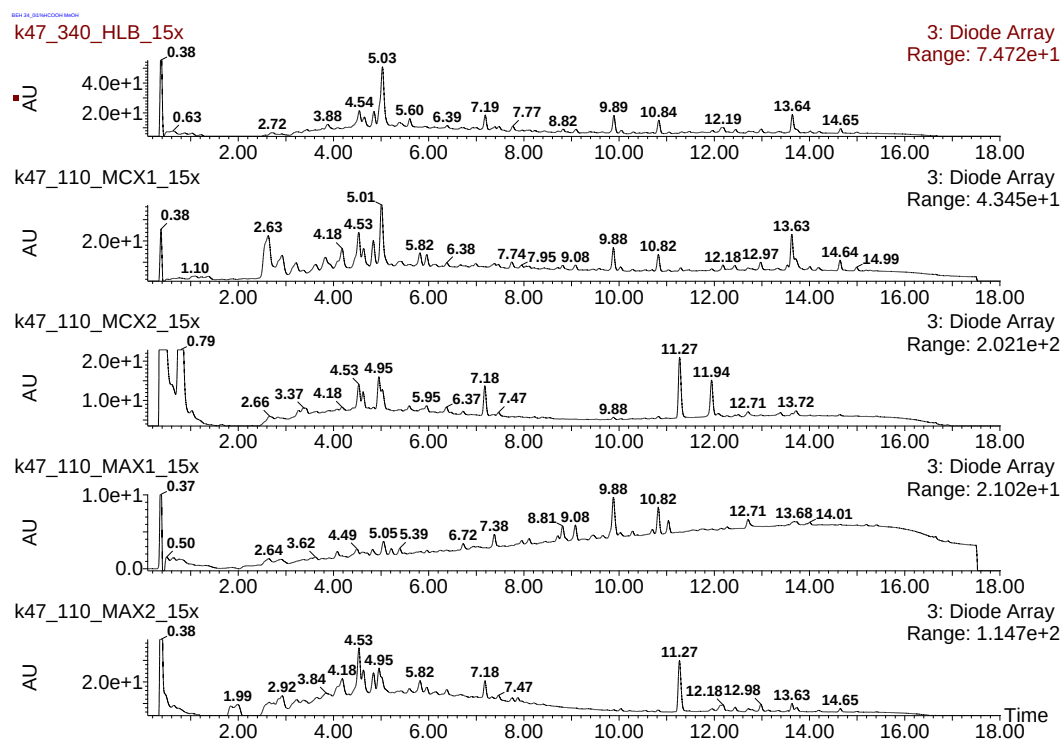
Obr.7 Výsledky testu biologické aktivity extraktů kultivačních médií aktinomycet. Inhibiční zóny jsou viditelné pouze u extraktů kmene č. 110.

Tab. 3 Výsledky testu biologické aktivity extraktů kultivačního média aktinomycety kmene č. 110. MCX1, MCX2, MAX1, MAX2 a HLB jsou označení pro různé kolony SPE metody. LLE metoda byla provedena se čtyřmi různými rozpouštědly: hexan (Hex), etylacetát (EtAc), dichlormethan (CH_2Cl_2) a trichlormethan (CHCl_3).

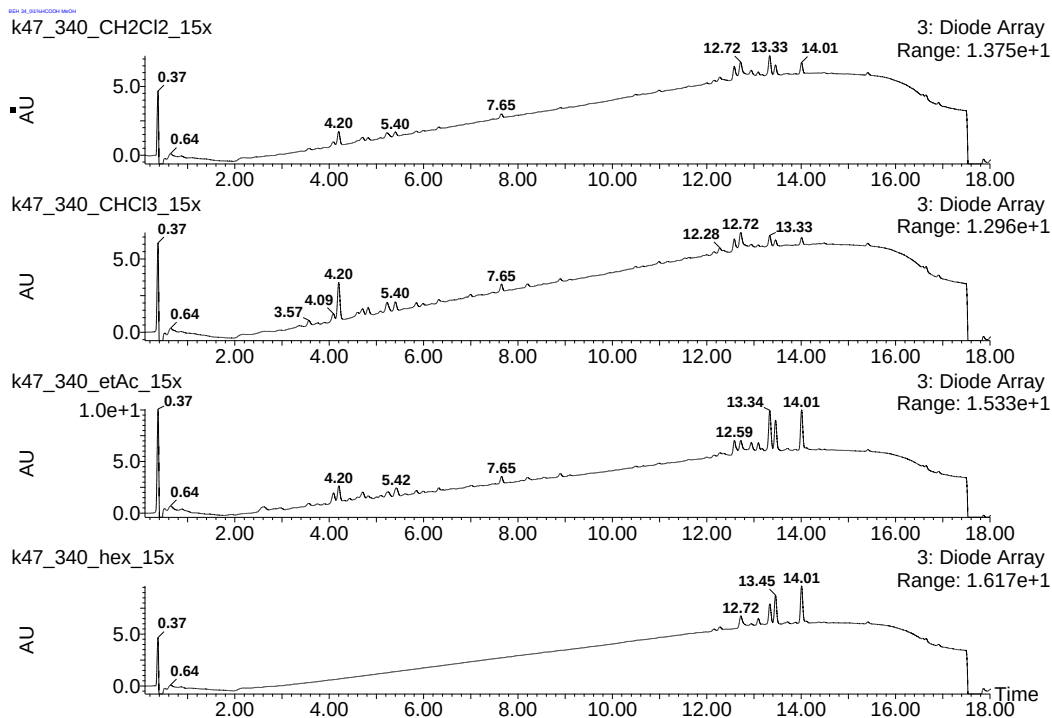
Extrakt	MCX1	MCX2	MAX1	MAX2	HLB	Hex	EtAc	CH_2Cl_2	CHCl_3
Průměr inhibiční zóny (cm)	0,9	0,9	0,7	0,8	0,6	0,9	0,9	0,5	0,5

4.3. UHPLC analýza a HPLC frakcionace

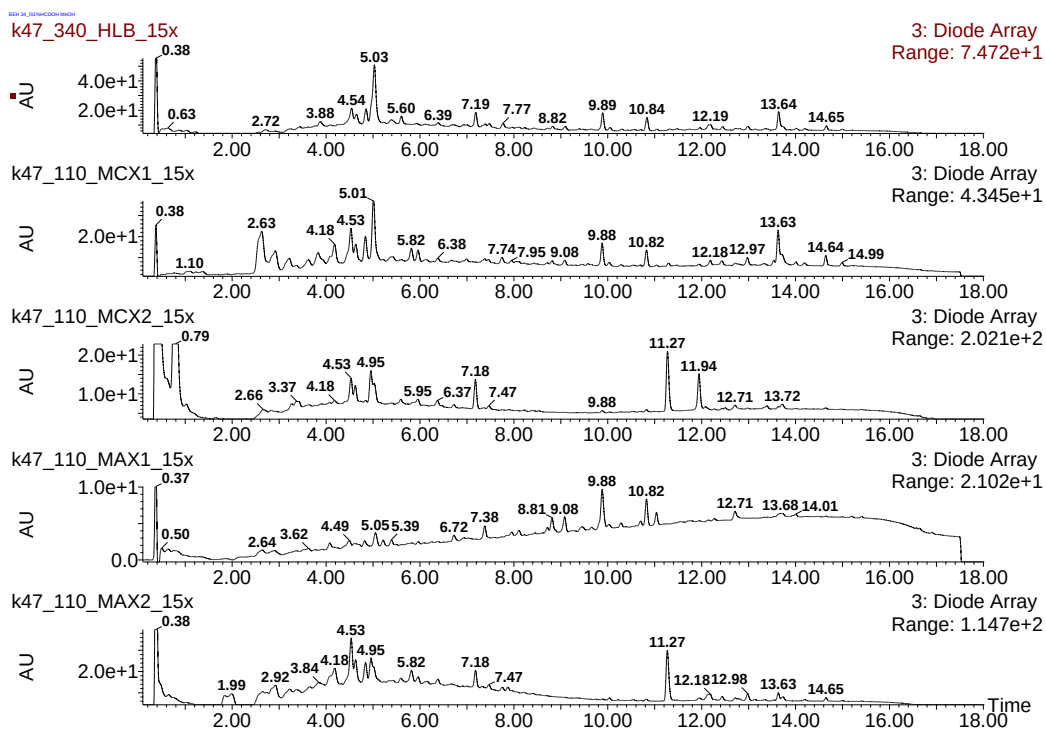
Paralelně s testem biologické aktivity extraktů kultivačních médií aktinomycet byla provedena UHPLC analýza těchto extraktů ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Z chromatogramů biologicky aktivních extraktů však nejde jednoznačně určit, který pík patří hledané látce (Obr. 8-11). Pro tyto účely byly extrakty MCX1 a MCX2 smíchány a přes HPLC sběrač frakcí rozděleny. Výsledkem bylo vytvoření celkem 60 frakcí. Jednotlivé frakce byly poté podrobeny testu biologické aktivity. Biologická aktivita byla zjištěna u vzorku č. 49. (Obr. 12)



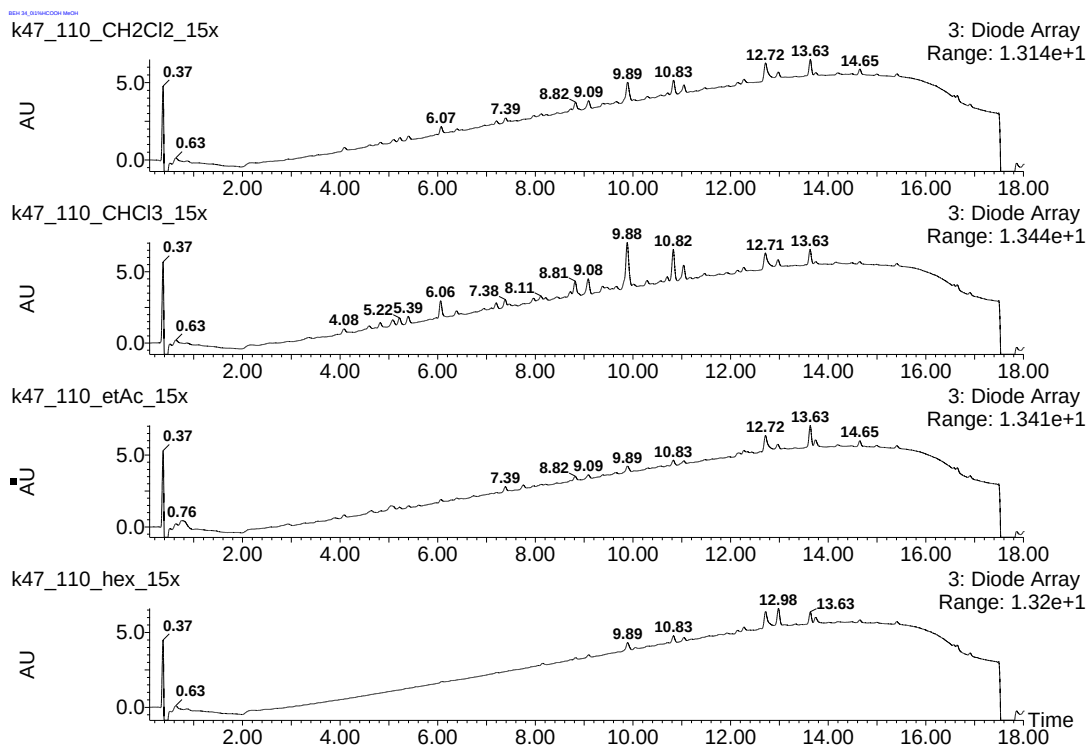
Obr. 8 Chromatogamy SPE extraktů kmene č. 340. Na všech chromatogramech v obrázcích 8-11 nelze jednoznačně určit který z peaků signalizuje biologicky aktivní látku.



Obr. 9 Chromatogram LLE extraktů kmene č. 340.



Obr 10 Chromatogram SPE extraktů kmene č. 110



Obr 11 Chromatogram LLE extraktů kmene č. 110



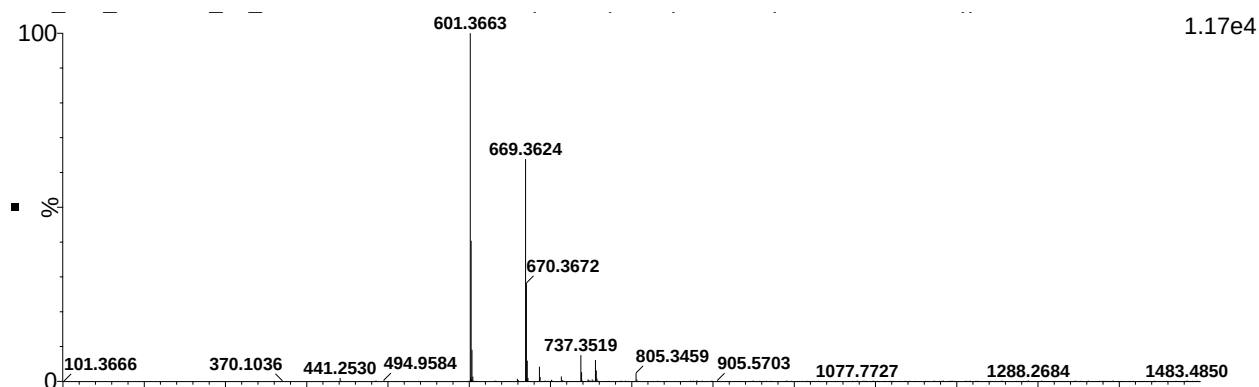
Obr. 12 Testy biologické aktivity frakcí extraktů biologicky aktivních médií aktinomycet. Extrakty MCX1 a MCX2 byly smíchány a rozděleny na 60 frakcí. Tyto frakce byly následně podrobeny Kirby-Bauer testu. Biologická aktivita je viditelná pouze u frakce s číslem 49.

4.4 MS analýza biologicky aktivních látek

Biologicky aktivní frakce č. 49 byla dále analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie. Na hmotnostním spektru vidíme (Obr. 13-14) , že v negativním módu byl detekován iont s relativní molekulovou hmotností (M_r) 601,3740 (M-H iont). V pozitivním módu byl zachycen iont s M_r 603,3752 (M+H iont), z čehož vyplývá, že ve frakci je přítomna látka s monoizotopickou M_r blízkou 602,37. V pozitivním módu byl také zjištěn iont o M_r 625,3752, což je patrně sodný adukt dané látky (M+Na iont).

Pomocí programu Reaxys¹⁹ bylo na základě určené M_r předpokládané bioaktivní látky navrženo její molekulové složení. Odpovídající si složení pro ionty M-H, M+H a M+Na při maximální relativní odchylce 15,0 PPM odpovídalo především pro navržený vzorec C₃₅H₅₄O₈.

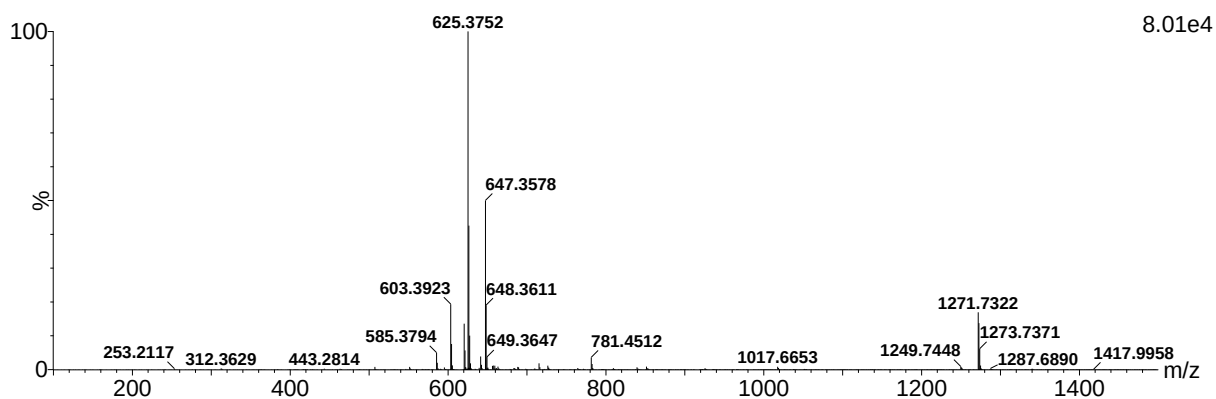
Takto predikované molekulové složení bylo dále vyhledáno v databázi ChemIDplus²⁰ k porovnání s již známými molekulami přírodního původu. Pro dané elementární složení bylo nalezeno více již izolovaných látek produkovaných mikroorganismy. Pouze jediná již známá látka o daném složení byla produkována streptomycetami (druhem aktinomycet) – tetronasin. (Obr.15).



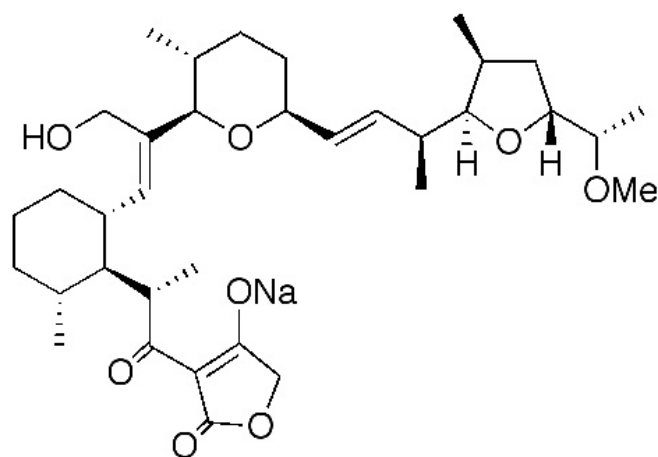
Obr. 13 Hmotnostní spektrogram biologicky aktivní frakce č.49. Na obrázku 8 jsou zobrazeny ionty v negativním módu. Pík s M_r 601,3663 je aniont M-H biologicky aktivní látky.

¹⁹ Program dostupný z <http://reaxys.com/info/>

²⁰ Databáze dostupná z: <http://chem.sis.nlm.nih.gov>



Obr. 14 Pozitivní mód hmotnostního spektra, kde pík s Mr 603,3923 je kationt M+H biologicky aktivní látky a peak s Mr 625,3752 je patrně sodný adukt biologicky aktivní látky.



Obr. 15 Strukturní vzorec tetronasinu – biologicky aktivní látky zjištěné v kultivačním médiu aktinomycety č. 110 (převzato z ²¹).

²¹ Zdroj obrázku:

http://www.chem.canterbury.ac.nz/researchgroup/antony_fairbanks_group/publications.shtml

5. ZÁVĚR

Úspěšně se povedlo ověřit biologickou aktivitu kultivačních médií aktinomycet č. 110 a 340 buď pomocí citlivé bakterie *Escherichia coli*, nebo pomocí *Kocuria rhizophila*. Dále byly extrahovány biologicky aktivní vzorky z médií. Účinné byly pouze všechny typy SPE a LLE extrakce vzorků kmene č. 110. Pro vzorky kmene 340 by bylo zřejmě nutné zvolit jiný typ separační metody.

Byla provedena UHPLC analýza extraktů, která prokázala velké množství látek obsažených v kultivačním médiu. Pro bližší charakterizaci látek s biologickou aktivitou bylo nezbytné celkový vzorek fragmentovat a až poté za pomoci hmotnostní spektrometrie určit chemická složení, která mohla být stanovena na základě relativní hmotnosti. Identita samotné látky byla objasněna až po porovnání možných struktur s databází již izolovaných látek. Tento sekundární metabolit byl již izolován z kultivačních médií streptomycet - jedná se o tetronasin. Nebyla tedy objevena žádná nová látka. Za zvážení však stojí další zkoumání sekundárních metabolitů aktinomycet kmene č. 340. Pokud běžné separační metody nebyly schopny úspěšně izolovat látky s potvrzenou biologickou aktivitou, mohlo by se jednat o dosud neznámé molekuly potencionálně aplikovatelné jako antibiotická léčiva.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 KETTNEROVÁ, Eliška. Izolace a charakterizace biologicky aktivních látek. Praha, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Karlova
- 2 VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, ISBN 80-868-5000-5
- 3 ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, ISBN 80-200-1024-6
- 4 BARON, Samuel. Medical microbiology. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, 1273 s. ISBN 09-631-1721-1
- 5 SCHINDLER, Jiří. Ze života bakterií. Vyd. 1. Praha: Academia, 2008, 143 s. ISBN 978-80-200-1666-9

Zdroje dostupné z internetu:

- 1 COATES, A R M a Y HU. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. British Journal of Pharmacology [online]. 2007, roč. 152, č. 8, s. 1147-1154 [cit. 2012-03-08]. ISSN 00071188. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707432
- 2 Berkelová kyselina, sekundární metabolit extremofilní mikromycety. In: PATOČKA, Jiří. Toxicology [online]. 9.2.2010 [cit. 2012-03-08]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=295>
- 3 VARKI, Ajit. Essentials of glycobiology [online]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2009, 784 s. [cit. 2012-03-08]. ISBN 9780879697709 (HARDCOVER : ALK. PAPER).
- 4 BEVERIDGE, Terry J. Mechanism of Gram Variability in Select Bacteria. Journal of Bacteriology [online]. 1990, roč. 172, č. 3, s. 1609-1602 [cit. 2012-02-29]. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/172/3/1609.long>.
- 5 COUFAL, Pavel. UNIVERZITA KARLOVA. Separační metody: Extrakce. Praha, 2004. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>.