



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# VYUŽITÍ TECHNIKY PCR PRO STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ V KOMERČNÍM PRODUKTU OSOBNÍ HYGIENY

UTILIZATION OF PCR TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN DAILY HYGIENE  
PRODUCT

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Yuliia Horobets

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

BRNO 2024

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1921/2023 Akademický rok: 2023/24  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Yuliia Horobets**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie  
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Smetana, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Využití techniky PCR pro stanovení přítomnosti probiotických bakterií v komerčním produktu osobní hygieny

### Zadání bakalářské práce:

- 1) literární rešerše na téma izolace DNA probiotických mikroorganismů
- 2) izolace DNA bakterií z hygienického výrobku
- 3) kvantifikace mikrobiální DNA
- 4) provedení PCR reakce
- 5) vizualizace DNA fragmentů na ELFO

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Yuliia Horobets  
studentka

-----  
Mgr. Jan Smetana, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Probiotické bakterie byly tradičně používány v potravinářském průmyslu, avšak v současnosti jsou také široce aplikovány k prevenci a léčbě různých onemocnění. Rostoucí počet důkazů o účinnosti bakterií rodu *Lactobacillus* v ústní dutině vedl k aplikaci probiotických kmenů tohoto rodu v ústních vodách a jiných produktech osobní hygieny. V rámci této bakalářské práce DNA byla izolována dvěma metodami, následně kvantifikovaná spektrofotometricky a amplifikována pomocí konvenční PCR. Výsledky polymerázové řetězové reakce byly detekovány prostřednictvím gelové elektroforézy. Přítomnost bakterií probiotických druhů *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus pentosus* byla ověřena.

## **ABSTRACT**

Probiotic bacteria have traditionally been used in the food industry, but their applications have now expanded to the prevention and treatment of various diseases. Increasing evidence supports the efficacy of bacteria of the genus *Lactobacillus* in the oral cavity has led to the application of probiotic strains of this genus in mouthwashes and other personal care products. In this bachelor thesis, DNA was isolated by two methods, then quantified spectrophotometrically and amplified via conventional PCR. The results of the polymerase chain reaction were detected by gel electrophoresis. The presence of probiotic bacteria species *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* was confirmed.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

probiotika, rod *Lactobacillus*, izolace DNA, PCR, ústní voda

## **KEYWORDS**

probiotics, genus *Lactobacillus*, DNA isolation, PCR, mouthwash

HOROBETS, Yuliia. Využití techniky PCR pro stanovení přítomnosti probiotických bakterií v komerčním produktu osobní hygieny [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156739>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jan Smetana.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat Mgr. Janu Smetanovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za jeho odborné vedení a čas věnovaný této práci, stejně jako za jeho cenné rady a podporu během celého procesu zpracování.



# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1 Probiotika.....	8
2.1.1 Historie.....	8
2.1.2 Mechanismus působení probiotik .....	8
2.1.3 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	9
2.1.4 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	9
2.1.5 Příznivé účinky probiotik.....	10
2.1.6 Bezpečnost probiotik .....	10
2.2 Prebiotika.....	11
2.2.1 Zdroje prebiotik .....	11
2.2.2 Mechanismus působení prebiotik .....	11
2.3 Synbiotika.....	12
2.3.1 Aplikace synbiotik .....	12
2.4 Postbiotika .....	13
2.4.1 Parametry pro inaktivaci .....	13
2.5 Dutina ústní.....	14
2.5.1 Slina a její funkce v dutině ústní .....	14
2.6 Orální mikrobiom .....	14
2.6.1 Základní složení orálního mikrobiomu .....	15
2.6.2 Vliv mikrobiomu ústní dutiny na vybraná onemocnění .....	15
2.6.3 Vliv probiotik na orální mikrobiom.....	16
2.7 Metody identifikace probiotických mikroorganismů .....	18
2.8 DNA.....	18
2.8.1 Izolace a purifikace DNA .....	18
2.8.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA .....	19
2.9 PCR.....	20
2.9.1 Varianty a modifikace PCR .....	20
2.9.2 Detekce produktů PCR .....	21
<b>3 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>22</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>23</b>
4.1 Použitý vzorek komerčního produktu osobní hygieny .....	23
4.2 Chemikálie a roztoky .....	23
4.2.1 Chemikálie .....	23

4.2.2	Roztoky .....	24
4.2.3	Komponenty pro PCR.....	25
4.3	Přístroje a pomůcky .....	25
4.4	Metody.....	26
4.4.1	Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk .....	26
4.4.2	Fenolová extrakce bakteriální DNA .....	26
4.4.3	Srážení DNA ethanolem .....	26
4.4.4	Izolace DNA pomocí komerční sady Omni Bacterial DNA Purification Kit.....	27
4.4.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA.....	27
4.4.6	Provedení PCR.....	28
4.4.7	Provedení gelové elektroforézy .....	29
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>31</b>
5.1	Izolace DNA z produktu osobní hygieny .....	31
5.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolovaných vzorků DNA.....	31
5.3	PCR pro doménu <i>Bacteria</i> .....	31
5.4	PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	32
5.5	PCR pro druh <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....	33
5.6	PCR pro druh <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	34
5.7	PCR pro druh <i>Lactobacillus pentosus</i> .....	35
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>37</b>
6.1	Izolace bakteriální DNA .....	37
6.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA .....	37
6.3	PCR pro doménu <i>Bacteria</i> .....	37
6.4	PCR pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	38
6.5	PCR pro druh <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....	38
6.6	PCR pro druh <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	38
6.7	PCR pro druh <i>Lactobacillus pentosus</i> .....	39
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>41</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>50</b>

# 1 ÚVOD

Zájem o probiotické mikroorganismy v posledních letech stále roste. Bakterie vykazující probiotické účinky se nyní hojně využívají v produktech osobní hygieny k prevenci onemocnění a udržování mikrobiomu v rovnováze. Mezi probiotika patří především bakterie rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které jsou schopné příznivě ovlivňovat zdraví člověka při použití v dostatečném množství. Na trhu se objevuje stále více výrobků pro dentální hygienu, obsahujících probiotické kultury v souvislosti s rostoucím počtem výzkumů, které spojují stav ústního mikrobiomu s řadou onemocnění, včetně zubního kazu, periodontitidy, rakoviny, srdečních chorob, pneumonie, Alzheimerovy choroby a dalších nemocí.

K detekci probiotických bakterií se používají fenotypové a genotypové metody. Fenotypové metody mají delší historii používání, ale genotypové metody umožňují rychleji a s vysokou přesností studovat vybraný mikroorganismus a analyzovat i nekultivovatelné bakterie. Mezi nepoužívanější metody patří polymerázová řetězová reakce a její modifikace. PCR umožňuje amplifikaci úseku DNA *in vitro* v důsledku opakujících se cyklů enzymové syntézy nových řetězců vybraných úseku analyzované DNA. K detekci produktů konvenční polymerázové řetězové reakce se nejčastěji používá gelová elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Probiotika

Probiotické mikroorganismy lze definovat jako živé mikroorganismy, které při dávkování v dostatečném množství, jsou schopné poskytovat zdravotní prospěch hostiteli [1]. Dříve se předpokládalo, že slovo „probiotikum“ se pochází z řeckých slov „προ“ a „βιοτος“, což znamená „pro život“, avšak předložka „προ“ se překládá do češtiny jako „před“, proto později bylo řešeno používat latinskou definici slova „pro“, což lze přeložit jako „pro“ nebo „o“ a řeckou definici „βιοτος“ [2].

#### 2.1.1 Historie

Lidé konzumovali potraviny obohacené o probiotika dávno předtím, než byly tyto mikroorganismy objeveny a studovány. Kvašené mléčné výrobky byly zobrazeny v egyptských hieroglyfech a fermentované jačí mléko tradičně používali tibetští kočovníci během dlouhých putování. V letech 1856 až 1864 francouzský mikrobiolog a chemik Louis Pasteur prokázal, že kažení potravin způsobují mikroorganismy [3,4]. Po tomto objevu se mnoho vědců začalo zabývat izolací bakterií z potravin. Kolem roku 1873 se anglickému lékaři a vědci Josephu Listerovi podařilo izolovat *Lactococcus lactis* z mléka. V roce 1889 francouzský pediatr Henry Tissier izoloval *Bifidobacterium bifidum* ze stolice kojenných dětí. Přibližně 10 let poté rakouský pediatr Ernst Moro izoloval a popsal *Lactobacillus acidophilus*. V roce 1907 bulharský lékař a mikrobiolog Stamen Gigov Grigorov izoloval *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* z bulharského jogurtu [3].

Studiem mikroorganismů v potravě se zabýval Ilja Mečnikov. Vědec, kterého zaujala dlouhověkost kavkazské populace a její častá konzumace kvašených mléčných výrobků, navrhl, že organismy produkující kyseliny ve fermentovaných mléčných výrobcích by mohly zabránit vzniku zánětu tlustého střeva a vést k prodloužení života konzumentů [5]. Nositel Nobelovy ceny ve své práci, publikované v 1909 roce, zmiňoval, že prospěšné bakterie, které dnes nazýváme probiotika, mohou být používány s cílem obnovení zdravé rovnováhy mikrobiomu [6]. V současnosti se nejčastěji jako probiotika používají bakterie z rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Některé druhy těchto rodů jsou přirozenými obyvateli trávicí soustavy člověka, kde inhibují růst patogenních bakterií a podporují trávení potravy [7]. Aby bylo možné určitý kmen bakterií označit za probiotický, měl by být schopný přežít v cílovém orgánu, mít antipatogenní účinky a být bezpečným. Cílovým orgánem může být střevní trakt, povrch kůže, ústní dutina a vagina [4].

#### 2.1.2 Mechanismus působení probiotik

Probiotika jsou schopná poskytovat zdravotní prospěch hostiteli díky kombinaci různých mechanismů působení. V některých případech, jako je produkce antimikrobiálních produktů, jsou tyto mechanismy řízeny interakcemi s rezidentní mikrobiotou. V jiných případech mohou přímo interagovat s buňkami hostitele. V důsledku sacharolytického metabolismu, při kterém vznikají organické kyseliny, a také díky produkci bakteriocinů probiotika mohou působit jako antagonisté vůči jiným mikroorganismům. Důležitou je také schopnost produkovat enzymy,

zejména  $\beta$ -galaktosidázu, která katalyzuje rozklad laktózy na stravitelnou glukózu a galaktózu, a proto dodávání probiotik má za následek klinický přínos pro osoby s intolerancí laktózy [8].

### **2.1.3 Rod *Bifidobacterium***

*Bifidobacterium* je rod grampozitivních, nesporulujících bakterií, které se přirozeně vyskytují v lidském gastrointestinálním traktu a vagině. Kolonizují střevo novorozenců během několika prvních dnů po narození a u kojených dětí představují až 95 % střevního mikrobiomu. Tyto bakterie jsou sacharolytické, což vysvětluje jejich vysoké množství ve střevech kojenců vzhledem k rozmanitosti oligosacharidů přítomných v lidském mléce. S přibývajícím věkem jejich podíl v lidském gastrointestinálním traktu klesá, ale zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou považováni za velmi důležité mikroorganismy, kteří podporují zdraví jedince během celého života [9].

### **2.1.4 Rod *Lactobacillus***

*Lactobacillus* je rod grampozitivních, fakultativně anaerobních, nesporulujících bakterií. Zástupci tohoto rodu jsou schopni metabolizovat monosacharidy glykolýzou a fosfoketolázovou cestou. Obligátně homofermentativní bakterie metabolizují hexózy Embden-Meyerhof-Parnasovou dráhou na pyruvát jako klíčový metabolický meziprodukt, výsledným produktem je pouze kyselina mléčná. Obligátně heterofermentativní bakterie metabolizují hexózy fosfoketolázovou dráhou na pyruvát a acetylfosfát jako klíčové meziprodukty, výsledkem je vznik kyseliny mléčné, oxidu uhličitého a ethanolu nebo acetátu. Některé homofermentativní bakterie při omezení glukózy, mohou metabolizovat jiné cukry, například galaktózu, za produkce kyseliny mléčné, ethanolu, kyseliny octové a kyseliny mravenčí. Pentózy metabolizují fosfoketolázovou dráhou. V důsledku své metabolické aktivity se bakterie rodu *Lactobacillus* nachází převážně v prostředí bohatém na sacharidy, včetně mléka, obilovin, rostlin, slizničních povrchů zvířat a lidí [10,11].

K březnu 2020 roku rod *Lactobacillus* zahrnoval 261 druhů. První taxonomie laktobacilů byla založena na fenotypových vlastnostech, včetně optimální teploty růstu, využití cukrů a produkce metabolitů, avšak v současné době pro stanovení hranic nových bakteriálních druhů byly zavedeny hodnoty průměrné nukleotidové identity (ANI) genů sdílených mezi dvěma bakteriálními genomy [12].

#### **2.1.4.1 *Lactobacillus rhamnosus***

*Lactobacillus rhamnosus* je fakultativně anaerobní grampozitivní bakterie, která se běžně vyskytuje v lidském gastrointestinálním traktu a vaginálním traktu. Tento druh byl izolován ze širokého spektra prostředí, včetně mléčných výrobků, fermentovaného masa, ryby, zeleniny, obilovin, odpadních vod [12,13]. Probiotické kmeny tohoto druhu vykazují antagonistický účinek na růst střevních patogenů *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Shigella sonnei*. Zástupci rodu *Lactobacillus rhamnosus* mohou mít určitý preventivní a terapeutický účinek na některá zánětlivá střevní onemocnění [14].

#### **2.1.4.2 *Lactobacillus pentosus***

*Lactobacillus pentosus* je fakultativně heterofermentativní bakterie mléčného kvašení, izolovaná z několika druhů sýrů vyráběných převážně tradičními postupy [15]. Tento druh

bakterií získal své jméno díky schopnosti metabolizovat nejen glukózu, ale také pentózy [16]. Zástupci tohoto dtuhu mají vysokou odolnost vůči kyselinám. *Lactobacillus pentosus* může inhibovat aktivitu ureázy a tím působit proti kolonizaci a patogenezí *Helicobacter pylori* – gramnegativní a mikroaerofilní bakterie, která se vyskytuje přibližně u 50 % světové populace a je spojena s rozvojem gastrointestinálních onemocnění [17].

#### **2.1.4.3 *Lactobacillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* je průmyslově významná bakterie mléčného kvašení, která se vyskytuje ve fermentovaných potravinách, pekařském kvasu, olivách, fermentované zelenině, fermentovaných uzeninách, sýrech, víně a silážích. Řada kmenů tohoto druhu bakterií má probiotické vlastnosti. *Lactobacillus plantarum* patří mezi fakultativně heterofermentativní bakterie [18]. *Lactobacillus plantarum* se používá k regulaci střevní mikrobioty, působí antimikrobiálně proti patogenním bakteriím a reguluje střevní pH [19]. Některé kmeny *Lactobacillus plantarum* jsou schopny produkovat karotenoidy, což jsou barevné tetraaterpenoidy s antioxidačními vlastnostmi [20].

#### **2.1.4.4 *Lactobacillus delbrueckii***

*Lactobacillus delbrueckii* je homofermentativní bakterie mléčného kvašení, která produkuje kyselinu D-mléčnou s vysokou optickou čistotou [21]. *Lactobacillus delbrueckii* zabraňuje nadměrnému množení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Je to rozsáhlá čeleď gramnegativních bakterií zahrnující velké množství patogenů, jako jsou *Salmonella*, *Shigella* a patogenní kmeny *Escherichia coli* [22]. Bakterie druhu *Lactobacillus delbrueckii* jsou užitečné při léčbě onemocnění, jako je kolitida, obezita a úplavice cukrová [23].

#### **2.1.5 Příznivé účinky probiotik**

Probiotika se obvykle používají k normalizaci nerovnováhy mikrobiomu, zlepšení funkce střevní bariéry a ke kompetitivnímu vyloučení patogenních mikroorganismů. Některé kmeny mohou mít specifitější účinky, jako je syntéza bioaktivních látek nebo regulace imunitního systému. Probiotika jsou prokazatelně účinná při léčbě nekrotizující enterokolitidy, ekzému a laktózové intolerance. Probiotika by mohla potenciálně snížit rizika infekcí dýchacích cest, sepse, pooperačních infekcí, syndromu dráždivého tračníku, ulcerózní kolitidy, koliky a spojených s užíváním antibiotik průjmů [24]. Kromě pozitivního vlivu na fyzické zdraví, některé druhy probiotických bakterií, jako je *Lactobacillus helveticus* a *Bifidobacterium longum*, mohou snižovat symptomy deprese a úzkosti, čímž pozitivně ovlivňují i psychické zdraví [25].

#### **2.1.6 Bezpečnost probiotik**

Řada probiotik má dlouhou zdokumentovanou historii bezpečného používání, avšak množství bakterií, které nazýváme probiotickými, se neustále zvětšuje, a proto je nutné ověřovat jejich zdravotní nezávadnost. Při hodnocení bezpečnosti je třeba zaprvé zjistit, zda je probiotický kmen virulentní nebo toxinogenní. Například některé kmeny rodu *Lactobacillus* jsou schopné tvořit biofilm, a proto mohou mít patogenní potenciál a nejsou vhodné pro použití v potravinách, doplňcích stravy a produktech osobní hygieny. Zadruhé je nutné zjistit, zda tento typ bakterií může přenášet geny antimikrobiální rezistence na patogenní bakterie. Bakterie rodu

*Lactobacillus* jsou rezistentní vůči vankomycinu, nicméně u lidí nebyl nikdy pozorován žádný klinický důkaz přenosu antimikrobiální rezistence. Dalším potenciálním nebezpečím, které probiotika představují, je schopnost ovlivňovat funkce léků prostřednictvím enzymů, avšak v současné době nejsou k dispozici výzkumy, provedené *in vivo*, které by to potvrdily. Přítomnost takových enzymů v probioticích a důkaz funkčnosti *in vitro* nedokazuje, že by se tato rizika vyskytovala u hostiteli. Veškerá tato rizika jsou akutní [24,26,27].

K možným dlouhodobým rizikům patří dlouhodobá kolonizace. To znamená, že akutně podaný mikroorganismus je u hostitele detekovatelný ještě týdny nebo měsíce po ukončení podávání. Mezi potenciální dopady patří změna složení mikrobiomu a invazivní infekce. Avšak tato rizika lze eliminovat: znalost profilu citlivosti konkrétního probiotika na antibiotika poskytuje strategii pro snížení počtu probiotických bakterií a snižuje tak riziko dlouhodobé kolonizace [27].

## **2.2 Prebiotika**

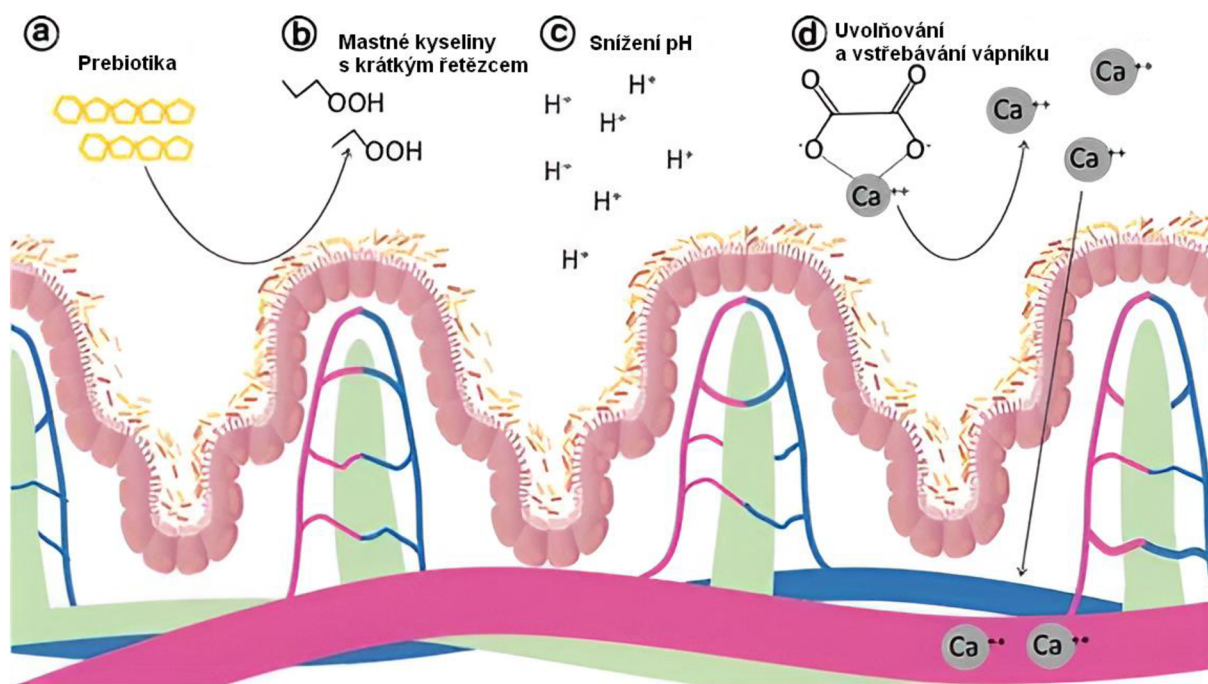
Vědci Glenn Gibson a Marcel Roberfroid v roce 1995 poprvé zavedli a popsali pojem „Prebiotikum“. Prebiotikum definovali jako nestravitelnou složku potravy, která selektivně stimuluje růst a aktivitu omezeného počtu bakterií v tlustém střevě, čímž zlepšuje zdraví hostitele [28]. Aby byla látka považována za prebiotikum, je nezbytné, aby vyhovovala následujícím kritériím: musí být schopná dosáhnout tlustého střeva a být fermentovatelná bakteriemi, které se tam nacházejí. Je nezbytné, aby fermentace konkrétní prebiotické látky probíhala za účasti omezeného počtu druhů prospěšných mikroorganismů a tím přinášela zdravotní prospěch hostiteli [29].

### **2.2.1 Zdroje prebiotik**

Prebiotické účinky mohou mít sacharidy, zejména fruktany inulinového typu, galaktooligosacharidy a části vlákniny, například polyfenoly. Fruktany tvoří nejrozmanitější komerčně dostupnou kategorii prebiotik, která zahrnuje nestravitelné polymery fruktózy a pozitivně ovlivňuje vstřebávání vápníku. Tyto sloučeniny se vyskytují v potravinách rostlinného původu, včetně kořene čekanky, artyčoku, pšenice, cibule, chřestu, agáve a banánu. Galaktooligosacharidy se průmyslově vyrábí enzymatickou hydrolýzou glykosidické vazby obsažené v laktóze. Zdrojem polyfenolů je nerozpustná ve vodě kakaová frakce, u níž bylo na střevním modelu prokázáno, že výrazně zvyšuje počet bakterií rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* [8,30].

### **2.2.2 Mechanismus působení prebiotik**

Jednou z nejdůležitějších funkcí prebiotik je zlepšení vstřebávání vápníku. Fermentace prebiotik sacharolytickými mikroby vede k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, a v důsledku ke snížení střevního pH. Předpokládá se, že větší kyselost v tlustém střevě zabraňuje interakci vápníku s negativně nabitými metabolity, jako je například šťavelan. Šťavelan vápenatý se z potravy téměř nevstřebává, a proto uvolnění vápníku z těchto molekul zvyšuje dostupnost minerálu pro vstřebávání a následnou mineralizaci kostí. Tento mechanismus je vizualizován na Obrázku 1 [30,31].



Obrázek 1: Mechanismus vlivu prebiotik na vstřebávání vápníku, upraveno podle [30]

## 2.3 Synbiotika

Synbiotikum je směs obsahující živé mikroorganismy a selektivně využívaný substrát, která přináší hostiteli zdravotní prospěch. Dříve synbiotika byla jednoduše definována jako kombinace probiotik a prebiotik a vyžadovalo se, aby každá z těchto složek samostatně poskytovala zdravotní výhody. Podle současné definice, pokud směs poskytuje zdravotní prospěch, i když jedná ze složek směsi není sama o sobě účinná, lze směs považovat za synbiotikum [31,32].

Existují dva typy synbiotik: synergická a komplementární. Synergická synbiotika představují kombinaci probiotik s takovým prebiotikem, který je mikroorganismem využíván selektivně, což má za následek zmenšení růstu nežádoucích a podporu růstu prospěšných mikroorganismů. Komplementární synbiotika se skládají z kombinace probiotika s nezávisle působícím prebiotikem [32].

### 2.3.1 Aplikace synbiotik

Synbiotika jsou široce používány k léčbě a prevenci onemocnění způsobených dysbalancí střevního mikrobiomu. Studie naznačují, že synbiotika jsou schopná inhibovat škodlivé bakterie kompetitivním vyloučením a podporovat rovnováhu mikrobiomu udržováním optimální hodnoty pH, produkcí důležitých metabolitů a podporou obnovy střevní slizniční bariéry. Existují důkazy, že příjem synbiotik pozitivně ovlivňuje zdravotní stav pacientů s chronickým onemocněním ledvin, průjmem a metabolickým syndromem. Příznivé účinky synbiotik byly také rozsáhle studovány u drůbeže a vodních živočichů. Od roku 2012 je zvýšena tendence aplikace synbiotik v akvakultuře, protože mají příznivý dopad na růst, přírůstek hmotnosti a imunostimulační účinky u vodních organismů [32,33].



## 2.4 Postbiotika

Postbiotikum je přípravek z inaktivovaných mikrobiálních buněk a/nebo jejich složek, který poskytuje hostiteli zdravotní prospěch. Jelikož postbiotika jsou neživé mikroorganismy, které ztratily schopnost reprodukce a replikace DNA, při jejich používání neexistují rizika genetických mutací nebo dlouhodobé kolonizace. Použití neživých postbiotik může být bezpečnější alternativou zejména pro imunodeficitní pacienty a kojence, protože při používání živých kmenů u některých skupin pacientů se mohou objevit rizika mikrobiální translokace a infekce. Nicméně k potvrzení bezpečnosti a účinnosti probiotik je třeba provést další studie na lidech [31,34,35].

Místo působení postbiotik není omezeno pouze na střevo. Postbiotika mohou být aplikována také v ústní dutině, vagině nebo na kůži. Velké množství existujících postbiotik zahrnuje neživé kmeny patřící k čeledi *Lactobacillaceae* nebo rodu *Bifidobacterium*. Avšak postbiotikum nemusí být odvozeno z probiotika, aby jeho inaktivovaná verze byla považována za postbiotikum. Mezi hlavními výhodami postbiotik patří to, že inaktivované mikrobiální buňky si mohou udržet stabilitu během průmyslového procesu a skladování, díky čemuž mají větší aplikační potenciál než probiotika, protože během zpracování je možné kontrolovat přesné množství postbiotik ve výrobcích. Mezi potenciálními riziky postbiotik patří uvolňování toxických metabolitů nebo substrátů z již mrtvých buněk [31,34].

Předpokládané příznivé účinky probiotik zahrnují: modulaci rezidentní mikrobioty, posílení funkcí epitelální bariéry, modulaci lokálních a systémových imunitních reakcí a modulaci systémových metabolických reakcí. Složky postbiotik, včetně exopolysacharidů, teichoových kyselin, lipoteichoových kyselin a různých metabolitů, mají příznivé účinky na zdraví střeva, zejména prostřednictvím inhibice patogenů, posílení funkce střevní bariéry a mechanismů imunoregulace. Postbiotika také mohou modulovat mikrobiotu nepřímo, například tím, že mají ve svém složení kyselinu mléčnou, která může být metabolizována některými členy mikrobioty, což vede ke vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem a butyrátu, které mají prospěšnou funkci. Postbiotika mohou také soutěžit s rezidentními mikroorganismy o adhezivní místa, pokud postbiotika poskytují adheziny, které zůstávají po zpracování neporušené [31,35].

### 2.4.1 Parametry pro inaktivaci

Technologie mikrobiální inaktivace je nezbytným procesem přípravy postbiotik, proto je důležitý správný výběr inaktivační technologie a kontrola změn bioaktivity bakterií při různých inaktivačních procesech. K inaktivaci mikroorganismů, které budou použity jako postbiotika se používají různé technologie, například aplikace extrémních teplot, působení vysokého tlaku a doba vystavení kyslíku pro striktně anaerobní mikroorganismy. Při aplikaci šetrnějších metod usmrcování buněk v konečném produktu stále může být přítomno malé množství životaschopných buněk. Na druhou stranu extrémní inaktivační podmínky určené k dosažení úplné inaktivace by zároveň mohly negativně ovlivnit nutriční, fyzikální nebo senzorycké vlastnosti produktu. Současná studie prokázala, že mírná teplota zahřívání (pod 100 °C) nemá významný vliv na antioxidační a protizánětlivou aktivitu některých druhů postbiotik, ale nadměrná teplota zahřívání (121 °C) významně snižuje antioxidační aktivitu postbiotik [31,36].

## 2.5 Dutina ústní

Anatomie dutiny ústní zahrnuje rty, gingivobukální sliznici, horní a dolní alveolární hřebeny, zuby, dolní čelist, jazyk (přední dvě třetiny) a tvrdé patro [37]. Ústní dutina poskytuje vhodnou teplotu, vlhkost a živiny, jako je cukr v potravě, proteiny slin a gingivální krevikulární tekutina, což jsou ideální faktory pro růst a množení bakterií, plísní, virů, archeí a prvoků. Zuby, gingivální sulcus, připojená gingiva, jazyk, rty a jiné části dutiny ústní jsou perfektním povrchem pro kolonizaci bakterií. Zuby jsou navíc jediným přirozeným povrchem v lidském těle, který se neobnovuje jako kůže nebo jiné tkáně v těle, a proto zuby jsou vhodným prostředím pro rozsáhlou tvorbu biofilmu a kolonizaci mikroorganismů. To platí i pro syntetické materiály, jako jsou zubní náhrady, výplně, fixní protetika, zubní protézy a implantáty [38].

### 2.5.1 Slina a její funkce v dutině ústní

Sliny jsou důležitou součástí ústní dutiny. Sliny produkují tři páry hlavních slinných žláz (příušní, podčelistní a podjazyková). Každý den člověk spolkne přibližně 1,5 litru slin spolu s miliony ústních mikrobů. Sliny obsahují širokou škálu proteinů, které jsou pro tuto tekutinu jedinečné a které mají biologické funkce zvláště důležité pro zdraví ústní dutiny. Mnohé z těchto proteinů obsahují vysoké množství prolinu, až 40 %. Sliny usnadňují odstraňování částic potravin z ústní dutiny a zásobují bakterie živinami pro jejich růst a metabolické procesy prostřednictvím enzymatického rozkladu škrobu z potravy a bakteriálního metabolismu složek slin, především glykoproteinů. Slinné muciny mají schopnost vázat mikroorganismy, čímž brání jejich adhezenci a kolonizaci [38,39,40].

## 2.6 Orální mikrobiom

V ústní dutině se nachází více než 700 druhů mikroorganismů: bakterie, archea, houby, prvoci a také viry. Každý druh hraje svou specifickou roli a silně interaguje s ostatními druhy a hostitelem. Tato komplexní mikrobiota kolonizuje zuby, protetické povrchy a slizniční povrchy. Sliny také obsahují obrovské množství orálních bakterií a slinná mikrobiota je stabilnější než mikrobiota zubního plaku. Ústní mikrobiom lze rozdělit na základní mikrobiom a variabilní mikrobiom. Základní mikrobiom je podobný u všech jedinců. Variabilní mikrobiom se u jednotlivých jedinců liší v závislosti na jedinečném životním stylu a fenotypových a genotypových vlastnostech [41,42].

Špatný životní styl, kouření, pití alkoholu, konzumace pálivých potravin a příjem antibiotik mohou vést k narušení rovnováhy orální mikrobioty hostitele. To může způsobit řadu infekčních onemocnění ústní dutiny, včetně zubního kazu, apikální periodontitidy a řady jiných parodontálních onemocnění. Kromě toho, stále více důkazů potvrzuje souvislost mezi ústním mikrobiomem a systémovými onemocněními člověka. Ústní mikrobiota je také spojena onemocněními trávicího traktu, rakovinou, kardiovaskulárními chorobami, Alzheimerovou chorobou, cukrovkou, revmatoidní artritidou a předčasným porodem. Ústní mikrobiota je proto považována za potenciální biomarker lidských onemocnění [41,43].

### 2.6.1 Základní složení orálního mikrobiomu

Mezi hlavní rody s největším zastoupením v ústní dutině patří: *Streptococcus*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Neisseria* a *Fusobacterium*. V ústní dutině se nachází 11 prostředí, přirozených pro různé mikroorganismy: tvrdé patro, hřbet jazyka, sliny, patrová mandle, krk, bukální sliznice, keratinizovaná gingiva, supragingivální a subgingivální plak, zubní protézy a rty. V Tabulce 1 jsou uvedeny dominantní mikroorganismy pro jednotlivé části dutiny ústní [41].

Tabulka 1: Zastoupení dominantních mikroorganismů v ústní dutině [41]

Část ústní dutiny	Dominantní mikroorganismus
Tvrdé patro	<i>Streptococcus</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Lactobacillales</i>
Hřbet jazyka	<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Actinomyces</i>
Sliny	<i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Pasteurellaceae</i>
Patrová mandle	<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Fusobacterium</i>
Krk	<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillales</i>
Bukální sliznice	<i>Streptococcus</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Gemella</i>
Keratinizovaná gingiva	<i>Streptococcus</i> , <i>Pasteurellaceae</i>
Supragingivální plak	<i>Streptococcus</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Neisseriaceae</i>
Subgingivální plak	<i>Streptococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Corynebacterium</i>
Zubní protézy	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus</i>
Rty	<i>Streptococcus</i> , <i>Candida albicans</i>

### 2.6.2 Vliv mikrobiomu ústní dutiny na vybraná onemocnění

Komplexní rovnováha mezi druhy, které v ústní dutině žijí, je zodpovědná za udržení zdravého stavu dutiny ústní a celkového zdraví jedince. Potenciálně nebezpeční bakterie, především kariogenní a parodontopatické, mohou vyskytovat i u zdravého člověka v důsledku přenosu prostřednictvím slin od blízkých partnerů, ale jejich hladiny by měly být extrémně nízké ve srovnání s prospěšnými nebo zdravotně nezávažnými bakteriemi. Při onemocnění dochází ke zvýšení počtu a podílu potenciálně nebezpečných mikroorganismů a k dysbióze. To může být důsledkem fyziologických změn (k tomu patří věk, hormonální změny během puberty a těhotenství) nebo modifikovatelných faktorů (špatná ústní hygiena, kouření, nevhodné stravy a užívání antibiotik) [44].

#### 2.6.2.1 Zubní kaz

Zubní kaz je lokální destrukce tvrdých zubních tkání: skloviny a dentinu. Toto je důsledkem fermentace sacharidů na organické kyseliny, které snižují pH dutiny ústní, což vede k demineralizaci povrchu zubů. Následkem je dysbióza, vyvolaná zmenšením počtu bakterií, které netolerují kyselé pH. Rovnovážný stav orální mikrobioty zajišťuje neutralizace vzniklých kyselin prostřednictvím katabolismu slinných proteinů a glykoproteinů. Během dne biofilm prochází několika cykly pH, což vede ke konstantní remineralizaci a demineralizaci skloviny. Avšak v případě, že existuje příliš mnoho rizikových faktorů (např. nedostatečný čas na neutralizaci pH v důsledku zvýšeného počtu kyselinotvorných bakterií, nízké množství

fluoridů, vápníku a fosfátů), demineralizace převáží nad remineralizací a vede ke ztrátě minerálů a narušení zubní skloviny [44,45].

#### **2.6.2.2 Rakovina**

Orální mikrobiota je těsně spojená se vznikem rakoviny. Pacienti trpící periodontitidou mají 2–5krát vyšší riziko onemocnění rakovinou než zdraví jedinci. Bylo prokázáno, že některé druhy ústních bakterií, zejména *Porphyromonas gingivalis* a *Fusobacterium nucleatum*, mají karcinogenní potenciál několika různými mechanismy. Mohou inhibovat apoptózu, aktivovat buněčnou proliferaci, vyvolávat chronický zánět a přímo produkovat karcinogeny [46].

Karcinom jícnu je šestou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu na světě. Nejnovější studie ukázala, že bakterie v ústní dutině mohou zvyšovat riziko vzniku rakoviny jícnu. *Porphyromonas gingivalis* byl nalezen v 61 % nádorových tkání, ve 12 % přilehlých tkání a v 0 % normální sliznice jícnu. Rakovina slinivky břišní je čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu. Ústní patogeny, zejména *Porphyromonas gingivalis* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, byly spojeny s vysokým rizikem rakoviny slinivky břišní. Mikrobiální buňky se z biofilmu uvolňují přes epitel a šíří se systémově krevním oběhem. Některé z bakterií izolovaných z pankreatických tkání byly členy orálního mikrobiomu. *Porphyromonas gingivalis* má schopnost uniknout odpovědi hostitele, narušit vrozenou imunitu a podpořit přeměnu ze symbiotického stavu na dysbiotický [41].

#### **2.6.2.3 Srdeční choroby**

Studie prokázala, že existuje souvislost mezi bakteriálními onemocněními dutiny ústní (např. parodontálními onemocněními) a ischemickou chorobou srdeční. Přítomnost *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* v subgingiválním plaku téměř dvojnásobně zvyšuje riziko vzniku stabilních forem ischemické choroby srdeční. Do skupiny potenciálně nebezpečných bakterií patří také *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* [41].

#### **2.6.2.4 Pneumonie**

Bakterie z dutiny, které pronikají do plic, jsou vylučovány prostřednictvím řasinek a kašle. Nejčastěji ve zdravých plicích jsou přítomny bakterie rodů *Streptococcus*, *Prevotella* a *Veillonella*, avšak počet mikroorganismů na určitou jednotku plochy v plicích je tisíckrát menší než hustota mikroorganismů v ústní dutině. Kvůli nedodržování ústní hygieny se v ústní dutině snadno kolonizují patogeny včetně *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Vdechnutím by se tyto bakterie mohly dostat do dolních cest dýchacích, čímž by se zvýšilo riziko pneumonie [41].

### **2.6.3 Vliv probiotik na orální mikrobiom**

V současné době probiotika jsou běžně používána k prevenci chorob, způsobených poruchami rovnováhy orálního mikrobiomu, jako jsou zubní kaz, periodontitidy, zánět dásní a rakovina dutiny ústní. Probiotika působí tak, že kontrolují tvorbu plaku a zabráňují narušení mikrobiální rovnováhy. Existuje několik mechanismů interakce probiotických bakterií s patogenními bakteriemi v ústní dutině: přímá interakce, kompetitivní vyloučení a nepřímé působení. Přímá interakce zahrnuje inhibice adheze a kolonizace patogenů, zabránění tvorby biofilmu.

Kompetitivní vyloučení především znamená, že probiotické druhy budou soutěžit o živiny s patogeny. Nepřímé působení zahrnuje modulace systémové imunitní funkce [41,47].

### **2.6.3.1 Vliv probiotik na zubní káz**

Bakterie *Streptococcus mutans* se podílí na vzniku zubního kazu u hostitele. Při pravidelném užívání probiotik obsahujících *Lactobacillus fermentum* dochází k podstatnému snížení počtu *Streptococcus mutans*, to následně může přispět k prevenci zubního kazu. Bylo prokázáno, že *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus reuteri* jsou schopné inhibovat tvorbu biofilmu *Streptococcus mutans*. *Lactococcus lactis* se dokázal účinně začlenit do ústního mikrobiomu a inhibovat růst *Streptococcus sobrinus* – dalšího původce zubního kazu [47,48]. Tato zjištění mohou pomoci řešit problém zubního kazu u dětí v předškolním věku. Studie, které se zúčastnilo 261 dětí ve věku od dvou do tří let, ukázala, že mléko obohacené bakteriemi *Lactobacillus rhamnosus* významně snižuje riziko vzniku zubního kazu [49].

### **2.6.3.2 Vliv probiotik na periodontitidu**

Dysbióza orálního mikrobiomu může vést ke zvýšení počtu kariogenních bakterií, což může vest nejen k primárnímu a sekundárnímu kázu, ale také bez včasné léčby může způsobit zánět podpůrných tkání zubů, vedoucí k periodontitidě. Periodontitida je celosvětově druhou příčinou ztráty zubů. Příčinou choroby je neléčený zánět dásní související s hromaděním bakteriálního plaku. To může vést k ireverzibilní ztrátě parodontálního úponu a resorpci kosti. Mezi faktory, které zvyšují riziko periodontitidy, patří: úplavice cukrová, snížení počtu leukocytů, kouření a užívání drog. Studie potvrzují efektivitu aplikaci *Lactobacillus reuteri* spolu s nechirurgickou parodontální terapií jako prevence periodontitidy v souvislosti s významným snížením patogenních bakterií [50,51].

### **2.6.3.3 Vliv probiotik na halitózu**

Halitóza neboli nepříjemný zápach z úst je problém, který trápí velkou část dospělé populace. Převážná většina příčin zápachu z úst se týká ústní dutiny, přičemž převažujícími faktory jsou gingivitida, periodontitida a povlak na jazyku. Zápach z úst je uváděn jako varovný příznak periodontitidy. Existuje dostatek důkazů, které naznačují, že parodontální onemocnění zvyšuje závažnost zápachu z úst a produkci těkavých sirných sloučenin. Nicméně se i u části parodontálně zdravých jedinců vyskytuje halitóza [52,53].

V roce 2016 bylo publikováno studium, jehož cílem bylo testování účinnosti aplikace *Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus salivarius* ve formě ústní vody a subgingiválního podání u pacientů s chronickou periodontitidou a halitózou. *Lactobacillus reuteri* produkuje reuterin (3-hydroxypropanal), což je antimikrobiální látka schopná inhibičně působit na řadu bakterií, včetně *Porphyromonas gingivalis*, která je hlavní příčinou chronického onemocnění dásní. Jedná se o randomizovanou, placebem kontrolovanou studii zahrnující 32 systémově zdravých pacientů s chronickou periodontitidou. Testovaná skupina dostávala subgingivální podání probiotik a používala probiotickou ústní vodu, a kontrolní skupina dostávala subgingivální podání placebo a placebo ústní vody po dobu 15 dnů. U obou skupin došlo k významnému zlepšení parametrů halitózy hodnocených pomocí organoleptického skóre. Testovaná skupina

vykázala statisticky významné zlepšení ve srovnání se skupinou, používající placebo. Zlepšení může být způsobeno snížením počtu bakterií, jako jsou *Porphyromonas gingivalis* a *Tannerella forsythia*, což jsou hlavní organismy podílející se na produkci těkavých sírných sloučenin. Probiotika použitá ve formě ústní vody mohla účinně potlačit množení patogenních bakterií z úst a přispět k lepším výsledkům u testované skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou [52].

## 2.7 Metody identifikace probiotických mikroorganismů

Historicky se k identifikaci bakterií používaly fenotypové metody. Taxonomie se po mnoho desetiletí do značné míry opírala o viditelné vlastnosti mikroorganismů, typ fermentace cukrů a alkoholů, pozorování růstu kolonií na různých médiích a za různých hodnot pH, využití zdrojů uhlíku, enzymový profil. Důležitou metodou identifikace mikroorganismů bylo barvení podle Grama. Přestože fenotypové metody přispívají k lepšímu pochopení metabolismu sacharidů, bílkovin a lipidů, na základě pouze těchto údajů je těžké rozhodnout o taxonomické klasifikaci na úrovni druhu či poddruhu probiotických mikroorganismů. Například pro bakterie rodu *Bifidobacterium* schopnost fermentovat určité sacharidy je charakteristická spíše pro kmen než pro druh, a proto je přesná identifikace druhů pouze na základě metabolismu cukrů velmi komplikovaná. Nicméně většina těchto technik poskytuje cenné informace o testovaných vzorcích a může být úspěšně aplikována v mikrobiologických laboratořích [54,55].

Genotypové metody umožňují identifikaci velkého množství dříve neznámých taxonů a charakterizaci nekultivovatelných bakterií. Kromě toho široké používání a dostupnost molekulárních metod pro genotypizaci bakterií vedlo k vysoce výkonné analýze, přesnějším výsledkům a rychlejšímu času zpracování. Tyto metody sahají od relativně jednoduchých přístupů založených na amplifikaci DNA, jako je PCR, až po složitější metody založené na sekvencování genů [55].

## 2.8 DNA

25 dubna 1953 roku James Watson a Francis Crick publikovali ve svém článku model struktury DNA. Ve své publikaci vědci popsali strukturu DNA jako dva polynukleotidové řetězce, z nichž každý je stočen kolem stejné osy. Oba řetězce se šroubují vpravo a jsou antiparalelní. Vědci zjistili, že se k sobě mohou vázat pouze určité páry bází. Těmito páry jsou: adenin s thyminem a guanin s cytosinem. Báze jsou orientovány dovnitř a spojeny mezi sebou vodíkovými vazbami, přičemž adenin s thyminem spojují dvě vodíkové vazby, a guanin s cytosinem – tři. Kromě vodíkových vazeb, stabilitu DNA ve vodných roztocích zajišťují hydrofobní a hydrofilní interakce, jelikož mezi páry bází nad sebou uplatňují hydrofobní interakce, a cukr-fosfátová kostra je hydrofilní. Popis struktury molekuly deoxyribonukleové kyseliny vedl k lepšímu pochopení její funkcí a taky se stal základem pro pochopení toho, jak ji lze izolovat a analyzovat [56,57,58].

### 2.8.1 Izolace a purifikace DNA

Předcházejícím krokem většiny metod analýzy DNA je izolace a oddělení od ostatních buněčných složek, které mohou rušit další stanovení. Volba izolační metody především závisí na požadované koncentraci a čistotě DNA. Úspěšná purifikace nukleových kyselin obecně vyžaduje čtyři důležité kroky: účinné narušení buněk, denuraci nukleoproteinových

komplexů, inaktivaci nukleáz a zabránění kontaminaci. Cílová nukleová kyselina by neměla obsahovat kontaminanty včetně bílkovin, sacharidů, lipidů nebo jiných nukleových kyselin. Koncentrace a čistota izolované DNA bude ovlivňovat výsledky navazujících experimentů [59,60].

### **2.8.1.1 Lyze bakteriálních buněk**

Cílem lyze buněk je narušení buněčné stěny a uvolnění vnitřního obsahu buněk. Stěny bakteriálních buněk se obvykle rozruší enzymaticky. Bakteriolytické enzymy vyvolávají lyze bakteriálních buněk v důsledku štěpení peptidoglykanu – základní strukturální složky buněčné stěny. Nejpoužívanějším enzymem při enzymatickém štěpení buněčné stěny je lysozym. Lysozym je stabilizován čtyřmi disulfidovými vazbami mezi osmi cysteinovými zbytky svého polypeptidového řetězce. Lysozym hydrolyzuje glykosidickou vazbu mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-acetylglukosaminem v peptidoglykanu. U grampozitivních bakterií vrstva peptidoglykanu silná, proto lysozym efektivněji lyzuje grampozitivní bakterie [59,61].

### **2.8.1.2 Metody izolace DNA**

Klasickým a nejpoužívanějším způsobem izolace DNA je izolační protokol, založený na fenol-chloroformové extrakci. Tato metoda efektivně odstraňuje proteiny a nepolární buněčné složky z lyzátů. Obvykle se používá fenol a směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1 pro dosažení úplné inaktivace RNázy a snižování pěnění mezi fázemi. Tyto organické látky jsou nemísitelné s vodou, a proto po přidání do vodného prostředí, obsahujícího buněčný lyzát, vzniká dvoufázová emulze. Tato emulze se po centrifugaci rozdělí na dvě fáze: horní vodní fázi obsahující DNA a spodní organickou fázi tvořenou organickými rozpouštědly a hydrofobními buněčnými složkami. Na fázovém rozhraní mezi těmito fázemi bude vrstva vysrážených denaturovaných proteinů. K odstranění zbytků fenolu z vodné fáze je nutné následně přidat chloroform. Dále se DNA vysráží 100% ethanolem za snížené teploty a za přítomnosti 3M roztoku octanu sodného. Roztok se odstředí a přebytečná sůl se propláchne 70% ethanolem. Po odstranění ethanolu se DNA rozpustí v pufru, obsahujícím EDTA – inhibitor aktivity nukleáz. Tato metoda je efektivní a dostupná, ale má své nevýhody: je časově náročná, zahrnuje použití nebezpečných organických rozpouštědel a vyžaduje přenos vzorků mezi více zkumavkami, což zvyšuje riziko chyby nebo kontaminace [59,62,63].

Kromě fenol-chloroformové extrakce existují i další metody izolace, které závisí na typu DNA nebo vzorku. Například alkalická denaturace se používá k oddělení plazmidů od chromozomové DNA. Při zvýšení pH na hodnotu kolem 12 dochází k přerušení vodíkových vazeb, oddělení lineárních řetězců a denuraci chromozomové DNA, která je v buněčných lyzatech přítomna v podobě lineárních fragmentů. Plazmidová DNA neztrácí své nadšroubovicé uspořádání během lyze, a proto po snížení pH její původní struktura se obnoví a zůstane v roztoku, ze kterého zbytky chromozomové DNA jsou odstraněny centrifugací [59].

### **2.8.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA**

Kvantifikace přesného množství DNA ve vzorku je velmi důležitá pro celou řadu aplikací v molekulární biologii. Standardní metodou kvantifikace nukleových kyselin je UV spektrofotometrie. Princip této metody spočívá v tom, že molekula DNA se skládá

z nukleových kyselin, obsahujících konjugované dvojně vazby ve svých purinových a pyrimidinových bázích, které mají absorpční maximum při 260 nm. Intenzita absorbance při této vlnové délce je úměrná koncentraci nukleové kyseliny. Díky těmto fyzikálním vlastnostem lze stanovit koncentraci nukleové kyseliny ve vzorku. Pro získání údajů o čistotě vzorku je nutné analyzovat poměry absorbance při 260/280 nm a 260/230 nm. DNA, která má poměr  $A_{260}/A_{280}$  v rozmezí 1,7–2,0 je považována za vyhovující, nicméně čistá DNA má poměr 1,8. Nižší hodnota může být způsobena kontaminací bílkoviny nebo fenolem, a vyšší hodnota – přítomností RNA ve vzorku. Pro poměr  $A_{260}/A_{230}$  platí, že hodnota vyšší než 1,5 znamená, že DNA má vyhovující kvalitu [64,65].

## 2.9 PCR

V roce 1985 americký biochemik Kary Banks Mullis představil koncept polymerázové řetězové reakce (PCR) jako účinnou metodu amplifikaci definovaného úseku DNA *in vitro*. Vývoj PCR znamenal významný krok vpřed v molekulární biologii a od té doby PCR se stala základní metodou umožňující řadu výzkumných a diagnostických aplikací. Princip PCR je založen na opakujících se cyklech enzymové syntézy nových řetězců vybraných úseku analyzované DNA. Syntéza probíhá ve směru 5'→3'. PCR je nezbytnou dvojicí sekvenčně specifických oligonukleotidů – primerů. Primery mají podobnou teplotu tání (zpravidla v rozmezí 55–65 °C), nejsou vzájemně komplementární a každý z nich se obvykle skládá z cca 18–24 nukleotidů. Kromě primerů pro PCR jsou nutné: cílová DNA, která slouží jako templát pro reakci, termostabilní DNA polymeráza, izolovaná z termofilních mikroorganismů, směs čtyř deoxyribonukleotidů, PCR voda a vhodný pufr, obsahující hořčičnaté ionty. PCR se provádí v termocykleru a začíná se z úplné počáteční denaturace DNA při 94–97 °C po dobu 2–5 min. Po úplné denaturaci následují tři hlavní kroky: denaturace dvouřetězových molekul DNA při 92–95 °C, připojení primerů při 50–65 °C a syntéza nových řetězců DNA-polymerázou při 65–75 °C. Tyto kroky se opakují 30–40 cyklů. Výsledkem je až miliarda kopií vybraného úseku cílové DNA. Pro úspěšné provedení PCR je nutné optimalizovat podmínky reakce, jako jsou teplotní režim a doba trvání jednotlivých kroků, počet cyklů a koncentrace jednotlivých složek směsi [59,66,67].

### 2.9.1 Varianty a modifikace PCR

Od roku 1985 byl standardní postup polymerázové řetězové reakce mnohokrát modifikován v závislosti na různých aplikacích. Úpravy PCR umožňují dosažení specifických experimentálních cílů, jako je zvýšená výtěžnost, zlepšená specifita nebo rychlejší analýza. Nejvýznamnější modifikací polymerázové reakce byla PCR v reálném čase, která umožňuje kvantitativní stanovení produktu PCR v průběhu amplifikace. Důležitou z hlediska snížení rizika vzniku nesespecifických produktů je PCR s horkým startem. Kromě toho široce používanými jsou zpětná PCR (RT-PCR) a mnohonásobná PCR. RT-PCR umožňuje amplifikaci RNA, převedením jí na cDNA zpětnou transkriptázou. Mnohonásobná PCR se používá k amplifikaci více cílových úseků DNA v jedné PCR, což umožňuje jejich současnou analýzu [59,68].



### **2.9.1.1 Kvantitativní PCR v reálném čase**

Přelomovým krokem v oblasti polymerázové řetězové reakce bylo zavedení konceptu monitorování amplifikace DNA v reálném čase pomocí sledování fluorescence. Během průběhu qPCR v reálném čase fluorescence se měří po každém cyklu a intenzita fluorescenčního signálu odráží aktuální množství amplikonů ve vzorku v daném čase. V počátečních cyklech je fluorescence příliš nízká na to, aby ji bylo detekovat. Bod, kdy intenzita fluorescence vzroste nad detekovatelnou úroveň se nazývá  $C_T$  bod. Tato hodnota udává, kolik cyklů bylo potřeba k detekci skutečného signálu ze vzorků a umožňuje stanovit absolutní množství cílové DNA ve vzorku podle kalibrační křivky, sestavené ze sériově řaděných standardních vzorků, přičemž čím vyšší bude množství původního templátu, tím nižší bude hodnota  $C_T$  a tím větší bude počet cílové sekvence [59,69].

Hlavní výhody qPCR spočívají v tom, že tato metoda umožňuje rychlou a vysoce kvalitní detekci a kvantifikaci cílových sekvencí DNA. Současné provedení amplifikace a vizualizace nově vytvořených amplikonů DNA je mnohem rychlejší než provedení konvenční PCR, po které následují detekční techniky. Kromě toho je qPCR bezpečnější z hlediska eliminace křížové kontaminace, protože po amplifikaci není nutná další manipulace se vzorky [59,69].

### **2.9.1.2 PCR s horkým startem**

PCR s horkým startem může výrazně zlepšit specifčnost, citlivost a výtěžnost PCR. Nespecifická amplifikace a tvorba dimerů primerů během PCR jsou stále nejzávažnějšími problémy, pokud je reakční směs připravena při pokojové teplotě, protože *Taq* polymeráza je aktivní a primery mohou hybridizovat nespecificky. Obecně existují tři techniky pro provádění PCR s horkým startem. První spočívá v zadržení jedné z klíčových složek, jako jsou dNTP, primery,  $Mg^{2+}$  nebo DNA polymeráza, dokud reakční směs nedosáhne požadované zvýšené teploty. Druhou technikou je dočasné zablokování aktivity DNA polymerázy pomocí chemických modifikací nebo použitím protilátek. Třetím přístupem je použití chemicky modifikovaných oligonukleotidových primerů a dNTP [70,71].

## **2.9.2 Detekce produktů PCR**

Nejpoužívanější metodou detekce produktů PCR je gelová elektroforéza. Elektroforéza v agarózovém či polyakrylamidovém gelu je poměrně jednoduchá metoda, která se běžně používá k hodnocení úspěšnosti PCR reakce. Principem elektromigračních technik je separace v důsledku pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Záporně nabitě fosfátové skupiny jsou příčinou, proč nukleové kyseliny pohybují v elektrickém poli směrem k anodě. Fragmenty nukleových kyselin jsou odděleny podle své délky, přičemž menší fragmenty migrují rychleji. Přidáním barviva nebo interkalačního činidla, jako je ethidium bromid, lze tyto fragmenty vizualizovat pod ultrafialovým světlem. K určení velikosti fragmentu DNA se používají velikostní standarty. Volba koncentrace a typu gelu je závislá na velikosti analyzovaných fragmentů [59,72].

Elektroforéza v agarózovém gelu je nejúčinnějším způsobem separace fragmentů DNA velikostí od 100 bp do 25 kb. Agaróza je lineární polysacharid, izolovaný z mořských řas rodů *Gelidium* a *Gracilaria*. Při zahřívání se polymery agarózy vytvářejí síťovou matici v důsledku nekovalentních interakcí. Rychlost migrace molekuly DNA gelem je ovlivněna především velikostí molekuly DNA, koncentrací agarózového gelu a použitým napětím. [59,73].

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na téma izolace DNA probiotických mikroorganismů.

V experimentální části bylo provedeno izolace DNA ze vzorku ústní vody Biorepair Plus. Izolace byla provedena fenolovou extrakcí a pomocí komerčního kitu. Spektrofotometricky bylo stanoveno čistotu a koncentraci mikrobiální DNA. Přítomnost uvedených výrobcem probiotických druhů rodu *Lactobacillus* byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce s následnou vizualizací fragmentu DNA pomocí gelové elektroforézy v agarózovém gelu.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použitý vzorek komerčního produktu osobní hygieny

*Biorepair Plus ústní voda s probiotiky*

#### **Složení:**

Voda, Sorbitol, Zinek PCA, Xylitol, Celulózová guma, Polysorbát 20, Hydroxyapatit zinku, Aroma, *Lactobacillus* lyzát (*Lactobacillus Rhamnosus* LR06; *Lactobacillus Pentosus* LPS01; *Lactobacillus Plantarum* LP01; *Lactobacillus Delbrueckii* LDD01), Lactoferrin, Laurylsulfát sodný, Natriumbenzoát, Tromethamine, Benzylalkohol, Fenoxxyethanol, Sacharin sodný, Lauroyl sarkosinát sodný, Methyl cocoyl taurát sodný, Limonen.

#### **Sliby výrobce:**

Zklidnění reakce po chirurgických zákrocích, prevence tvorby a hromadění plaku



### 4.2 Chemikálie a roztoky

#### 4.2.1 Chemikálie

- BB pufr (OMNI International, Kennesaw, USA)
- CBH pufr (OMNI International, Kennesaw, USA)
- Chloroform-isoamylalkohol (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, Česká republika)
- DNA standard 50 bp (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Německo)
- DLB pufr (OMNI International, Kennesaw, USA)
- Dodecylsírán sodný (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
- DW pufr (OMNI International, Kennesaw, USA)
- EB pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- Ethanol (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina – EDTA (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
- Fenol (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
- Hydroxid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- LD Green (Elisabeth Pharmacon, Brno, Česká republika)
- Lysozym (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
- Octan sodný (Lachema, Brno, Česká republika)
- PCR agaróza (Top-Bio, Vestec, Česká republika)
- Proteáza (Bacterial DNA Kit, OMNI INTERNATIONAL, USA)
- Proteináza K (OMNI International, Kennesaw, USA)
- PS Green (Elisabeth Pharmacon, Brno, Česká republika)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-HCl (Serva, Heidelberg, SRN)

## 4.2.2 Roztoky

### 4.2.2.1 Roztoky pro přípravu hrubých lysátů bakteriálních buněk

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

186,1 g pevného EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na 8,0 přidáním pevného hydroxidu sodného. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 000 ml. Následně byla provedena sterilace 20 min při teplotě 121 °C.

- 20% SDS (pH 7,0)

20 g pevného dodecylsulfátu sodného bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody za stálého míchání a zahřátí na teplotu 68 °C. Přidáním koncentrované kyseliny chlorovodíkové hodnota pH byla upravena na 7,0. Po úpravě hodnoty pH roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml.

- 1 M Tris-HCl (pH 7,8)

121,1 g pevného tris(hydroxymethyl)aminomethanu bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové na 7,8. Roztok byl doplněn na objem 1 000 ml. Následně byla provedena sterilace 20 min při teplotě 121 °C.

- Lyzační roztok A

K 1 ml 0,5 M zásobního roztoku EDTA bylo přidáno 10 ml 0,1 M Tris-HCl. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml.

- Lyzační roztok B

K lyzačnímu roztoku A bylo přidáno lysozym tak, aby výsledná koncentrace lysozymu v roztoku byla 3 mg/ml.

### 4.2.2.2 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA

- Octan sodný (3 M)

40,81 g trihydrátu octanu sodného bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

- TE pufr

K 0,2 ml 0,5 M zásobního roztoku EDTA bylo přidáno 1 ml 1 M Tris-HCl a objem doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

### 4.2.2.3 Roztoky pro provedení agarózové elektroforézy

- 0,5x TBE pufr

Bylo smícháno 54 g Tris-báze a 27,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Poté směs bylo rozpouštěno v 600 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 20 ml 0,5 M zásobního roztoku EDTA. Výsledný roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 000 ml. Před použitím byl roztok 10x zředěn destilovanou vodou.

- Agarózový gel

Pro provedení gelové elektroforézy bylo přidáno odpovídající množství agarózy tak, aby po rozpouštění v 100 ml TBE pufru vznikly roztoky o koncentracích: 1,2% pro doménu *Bacteria*, 2% pro *Rod Lactobacillus* a 1,6% pro *Lactobacillus Delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*.

#### 4.2.3 Komponenty pro PCR

- PCR Ultra H<sub>2</sub>O (Top-Bio, Vestec, Česká republika)
- Pozitivní kontrola *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190 (Česká sbírka mikroorganismů, Brno, Česká republika)
- Pozitivní kontrola *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 118 (Sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora, Praha, Česká republika)
- Pozitivní kontrola *Lactobacillus plantarum* CCDM 183 (Sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora, Praha, Česká republika)
- Pozitivní kontrola *Lactobacillus pentosus* CCM 4619 (Česká sbírka mikroorganismů, Brno, Česká republika)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, Vestec, Česká republika)
- Specifické primery pro doménu *Bacteria* (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- Specifické primery pro rod *Lactobacillus* (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- Specifické primery pro druh *Lactobacillus plantarum* (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- Specifické primery pro druh *Lactobacillus pentosus* (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- Specifické primery pro druh *Lactobacillus delbrueckii* (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)

#### 4.3 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga MiniSpin plus 14 500 ot/min (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Detekční systém na dokumentaci gelů (Azure biosystems C200, Dublin, Irsko)
- Eppendorfovy zkušavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exsikátor typ N 86 KN.18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN)
- Laboratorní sklo a pomůcky
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikropipety Finnpiette (Thermo Scientific, USA)
- Mikrovlnná trouba (Proline, Praha, Česká republika)
- Nanodrop 2000c UV-VIS spektrofotometr (Thermo Scientific, USA)
- Omni DNA Mini kolony (Bacterial DNA Purification Kit, Omni international, USA)
- Sběrné zkušavky (2 ml) (Bacterial DNA Purification Kit, Omni international, USA)
- Termocykler (BIOER, Chang-čou, Čína)
- Termo-Shaker (TS-100C BioSan, Riga, Lotyšsko)

- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)

## 4.4 Metody

### 4.4.1 Příprava hrubého lyzátu bakteriálních buněk

- Do čtyř Eppendorfových zkumavek (1,5 ml) bylo napipetováno po 1 ml vzorku ústní vody „Biorepair Plus“.
- Vzorky byly centrifugovány 5 minut při 14 500 ot/min.
- Poté supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal okapat.
- K sedimentu bylo přidáno 100 µl lyzačního roztoku A, suspenze byla promíchána. Následně bylo přidáno 900 µl lyzačního roztoku A a suspenze byla opět promíchána.
- Suspenze byla 5 minut centrifugována při 14 500 ot/min.
- Poté supernatant byl odstraněn a sediment se nechal okapat na připravené buničině.
- K sedimentu bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku B a vzorky byly promíchány.
- Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě.
- Následně bylo přidáno 12,5 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K a vše bylo promícháno.
- Nakonec vzorky byly inkubovány při 55 °C do příštího dne.

### 4.4.2 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- Po inkubaci do čtyř nových Eppendorfových zkumavek byl odpipetován supernatant.
- Do každé zkumavky bylo přidáno odpovídající množství fenolu podle objemu supernatantu v dané zkumavce.
- Roztoky byly promíchány po dobu 4 minuty kývavým pohybem.
- Vzorky byly centrifugovány 5 minut při 14 500 ot/min.
- Horní vodní fáze s DNA byla odebrána do čistých Eppendorfových zkumavek.
- Kroky 2 až 5 byly opakovány dvakrát pro vzorky 2.3 a 2.4 s cílem zvýšit jejich čistotu.
- Všechny vzorky byly doplněny TE pufrem na objem 500 µl.
- Následně bylo přidáno 700 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1).
- Roztoky byly opět 4 minuty promíchávány kývavým pohybem.
- Poté vzorky byly centrifugovány při 14 500 ot/min po dobu 5 minut.
- Horní vodní fáze s DNA byla odebrána do čistých Eppendorfových zkumavek.
- Pro vzorky 2.3 a 2.4 byly kroky 8 až 11 opakovány.
- Vodní fáze s DNA ve každé zkumavce byla doplněna na 400 µl TE pufrem.

### 4.4.3 Srážení DNA ethanolem

- Ke vzorkům bylo přidáno 20 µl 3 M octanu sodného a vše bylo promícháno.
- Poté byl přidán 1 ml 96% ethanolu vychlazeného na -20 °C a obsah zkumavek byl promíchán.
- Vzorky byly na 30 minut umístěny do mrazáku.
- Následně vzorky byly centrifugovány při 14 500 ot/min po dobu 15 minut.
- Supernatant byl jedním otočením zkumavek opatrně slit a sediment se nechal okapat.

- Zkumavky se sedimentem byly ponechány na 15 minut v exikátoru k dokonalému vysušení.
- DNA byla rozpuštěna ve 60  $\mu$ l TE pufru a vzorky byly uchovány při 4 °C v lednici.

#### **4.4.4 Izolace DNA pomocí komerční sady Omni Bacterial DNA Purification Kit**

- Do dvou Eppendorfových zkumavek (1,5 ml) bylo napipetováno 0,5 ml vzorku ústní vody „Biorepair Plus“ a 1 ml lyzačního roztoku B.
- Zkumavky byly inkubovány 10 min při teplotě 37 °C.
- Následně bylo přidáno 25  $\mu$ l roztoku proteázy a 100  $\mu$ l DLB pufru. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu.
- Vzorky byly inkubovány při 55 °C po dobu 60 minut.
- Následně byl obsah zkumavek centrifugován po dobu 2 minut při 10 000 ot/min.
- Do nových Eppendorfových zkumavek byl odpipetován supernatant.
- K supernatantu bylo přidáno 200  $\mu$ l BB pufru a obsah zkumavek byl důkladně promíchán na vortexu.
- Vzorky byly ponechány k inkubaci při 65 °C po dobu 10 minut.
- Následně ke vzorkům bylo přidáno 220  $\mu$ l ethanolu a vše bylo promícháno na vortexu po dobu 20 sekund.
- Veškerý obsah zkumavek včetně sraženin byl přenesen z 1,5 ml Eppendorfových zkumavek na mini kolonky, vložené do 2 ml sběrných zkumavek.
- Vzorky byly centrifugovány 60 sekund při 10 000 ot/min.
- Mini kolonky byly vloženy do nových 2 ml sběrných zkumavek.
- Na mini kolonky bylo pipetováno po 500  $\mu$ l CBH pufru.
- Směs byla centrifugována 60 sekund při 10 000 ot/min.
- Mini kolonka znova byla vložena do nové 2 ml sběrné zkumavky.
- Na kolonky bylo pipetováno 700  $\mu$ l DW pufru.
- Kolonky byly centrifugovány 60 sekund při 10 000 ot/min.
- Filtrát byl odstraněn a kolonky byly vloženy do prázdných sběrných zkumavek.
- Následně byla znova provedena centrifugace při 10 000 ot/min 2 minuty
- Mini kolonky byly vloženy do nových sběrných zkumavek.
- Na kolonky bylo napipetováno po 100  $\mu$ l předehřátého na 65 °C EB pufru.
- Vzorky byly inkubovány při teplotě 65 °C 5 minut.
- Poté byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 10 000 ot/min.

#### **4.4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA**

- 2  $\mu$ l roztoku blanku bylo pipetováno na dolní podstavec. U vzorků DNA izolovaných fenolovou extrakcí jako blank byl použit TE pufr. U vzorků izolovaných pomocí komerční izolační sady Omni Bacterial DNA Purification Kit měření bylo provedeno oproti EB pufru.
- Po blankování na přístroj byly nanášeny vzorky v objemu 2  $\mu$ l. Před měřením každého vzorku oba podstavce byly očištěny novým laboratorním ubrouskem.

- Poté byla změřena absorbance pro vlnové délky 230 nm (minimum absorbance pro DNA), 260 nm (maximum absorbance pro DNA) a 280 nm (maximum absorbance pro proteiny).
- Z absorbance při vlnové délce 260 nm byla určena koncentrace DNA ve vzorku a z poměru absorbancí 260/280 byla stanovena čistota izolované DNA

#### 4.4.6 Provedení PCR

- Všechny potřebné komponenty byly rozmrazeny a promíchány.
- Následně byla připravena směs pro PCR o celkovém objemu 25  $\mu$ l. Pořadí a objemy komponent pro PCR jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Komponenty pro přípravu PCR směsi

Pořadí	Komponenta	Objem ( $\mu$ l)
1.	voda pro PCR	9,5
2.	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3.	primer 1 (10 $\mu$ mol/ $\mu$ l)	1,0
4.	primer 2 (10 $\mu$ mol/ $\mu$ l)	1,0
5.	matrice DNA	1,0

- Pro jednotlivé specifické PCR byly použity vhodné specifické primery, uvedené v Tabulce 3.

Tabulka 3: Použité primery pro specifické PCR

Primer	Sekvence primeru (5'– 3')	Velikost produktů PCR (bp)	Reference
<b>Doména <i>Bacteria</i></b>			
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	[74]
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
<b>Rod <i>Lactobacillus</i></b>			
F_allact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92	[74]
R_allact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT		
<b><i>Lactobacillus delbrueckii</i></b>			
Delbrueckii-F	CAT GTG CAG ACA TGC TAT CCT T	192	[75]
Delbrueckii-R	CTC TGA AGT GCC ATG TCT CAG T		
<b><i>Lactobacillus plantarum</i></b>			
Plantarum-F	GCT GGC AAT GCC ATC GTG CT	147	[75]
Plantarum-R	TCT CAA CGG TTG CTG TAT CG		
<b><i>Lactobacillus pentosus</i></b>			
PentF	CAG TGG CGC GGT TGA TAT C	218	[76]
PentR	TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC		

- Jako matrice DNA byly použity 4 vzorky izolovaných pomocí fenolové extrakce a 2 vzorky izolovaných pomocí komerčního kitu.
- U negativní kontroly matrice DNA byla nahrazená PCR vodou.



- Pozitivní kontrola byla připravena v závislosti na druhu identifikace. Matrice DNA byla nahrazena stejným objemem DNA o koncentraci 10 ng/μl izolované ze sbírkových kmenů, uvedených v Tabulce 4 (izoláty byly získány od Mgr. Jan Smetana Ph.D.).
- Reakční směs byla promíchána a zkumavky byly vloženy do termocykleru.
- V termocykleru byly nastaveny teplotní programy uvedené v Tabulce 5 podle použitých primerů

Tabulka 4: Použité pozitivní kontroly

Primer	Pozitivní kontrola
F_eub	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CCDM 118
R_eub	
F_allact	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 183
R_allact	
Delbrueckii-F	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CCM 7190
Delbrueckii-R	
Plantarum-F	<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 183
Plantarum-R	
Pentosus-F	<i>Lactobacillus pentosus</i> CCM 4619
Pentosus-R	

Tabulka 5: Teplotní programy pro specifické PCR

Prodloužená denaturace DNA v prvním cyklu	Denaturace DNA	Připojení primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizovaná DNA
<b>Doména <i>Bacteria</i></b>				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	30 cyklů			
<b>Rod <i>Lactobacillus</i></b>				
95 °C/5 min	94 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	30 cyklů			
<b><i>Lactobacillus delbrueckii</i></b>				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	35			
<b><i>Lactobacillus plantarum</i></b>				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	62 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	30 cyklů			
<b><i>Lactobacillus pentosus</i></b>				
94 °C/ 5 min	94 °C/1 min	56,8 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/10 min
	40 cyklů			

#### 4.4.7 Provedení gelové elektroforézy

- Agarózový gel byl připraven ze směsi agarózy a 100 ml 0,5x TBE pufru. Navážka agarózy pro doménu *Bacteria* byla 1,2 g; pro *Rod Lactobacillus* – 2 g; pro druhy *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus pentosus* – 1,6 g;
- Směs byla několikrát postupně zahřívána v mikrovlnné troubě k varu a občas promíchána pro dokonalé rozpuštění.

- Po vychladnutí na 60 °C bylo do suspenze bylo přidáno 4 µl barviva PS Green a všechno bylo promícháno.
- Suspenze byla nalita do elektroforetické vany s hřebínkem a ponechána k zatuhnutí na 1 hodinu.
- Po zatuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek.
- Ke zkumavce obsahující vzorek bylo přidáno barvivo LD Green v poměru 5:1.
- Obsah zkumavky byl lehce promíchán.
- Do vzniklých komůrek bylo nanášeno po 15 µl DNA získané fenolovou extrakcí a extrakcí komerčním kitem smíchaných s 5 µl LD Greenu. Stejným způsobem byla nanesena pozitivní a negativní kontroly.
- Gel byl umístěn ve správné orientaci do elektroforetické vany a následně byl přelit roztokem 0,5x TBE pufru přibližně 1 cm nad okraj gelu.
- Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 70 V po dobu 1,5 hodiny.
- Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut a vložen do detekčního zařízení Azure biosystems C200 a byl vyhodnocen pod UV zářením při vlnové délce 302 nm.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Izolace DNA z produktu osobní hygieny

Ze vzorku ústní vody Biorepair Plus bylo připraveno 4 hrubých lyzátů buněk podle kapitoly 4.4.1. Ze všech čtyř lyzátů bylo následně izolováno DNA fenolovou extrakcí podle postupu, uvedeného v kapitole 4.4.2. K izolaci DNA pomocí komerční sady Omni Bacterial DNA Purification Kit bylo použito přímo vzorek analyzované ústní vody a celý postup je popsán v kapitole 4.4.4.

### 5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolovaných vzorků DNA

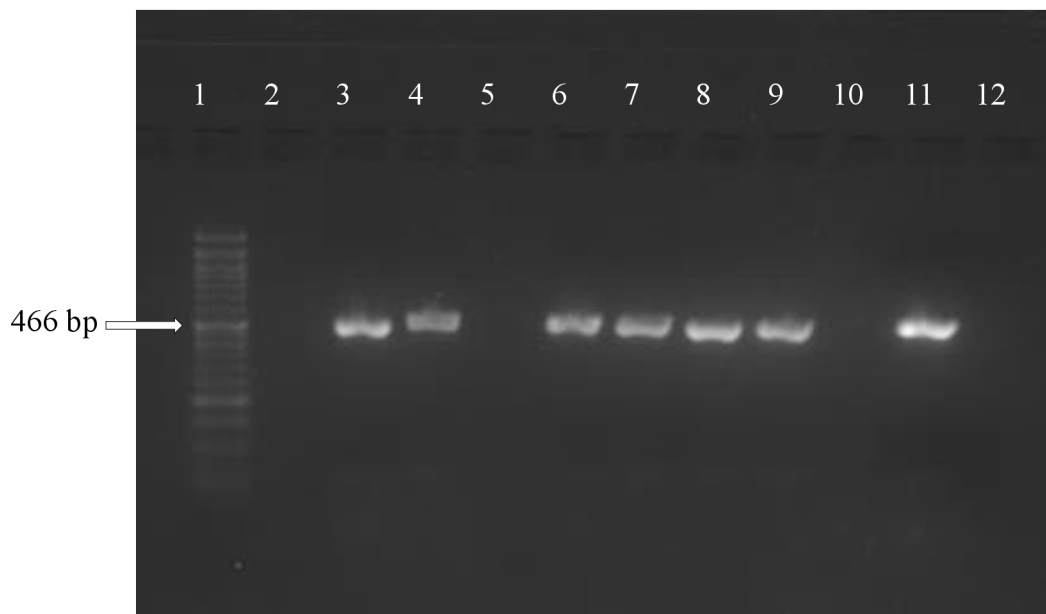
Koncentrace a čistota izolované DNA byly stanoveny spektrofotometricky prostřednictvím spektrofotometru NanoDrop 2000c podle postupu 4.4.5. Výsledky stanovení jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Spektrofotometrické stanovení DNA

Vzorek	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	c (ng·μl <sup>-1</sup> )
1.1	1,81	0,33	15,5
1.2	1,99	0,54	22,4
2.1	1,49	1,03	111,4
2.2	1,46	1,33	99,0
2.3	1,73	0,84	12,5
2.4	1,55	0,72	46,0

### 5.3 PCR pro doménu *Bacteria*

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.6 byla provedena PCR pro doménu *Bacteria*. Jako primery byly použity F\_eub a R\_eub s velikostí amplikonů 466 bp. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 3. Jako pozitivní kontrolu bylo použito *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 118. Teplotní program je uveden v Tabulce 5. Následně bylo provedeno gelovou elektroforézu v 1,2% agarózovém gelu. Detekované produkty jsou znázorněny na Obrázku 2 a jsou popsány v Tabulce 7.



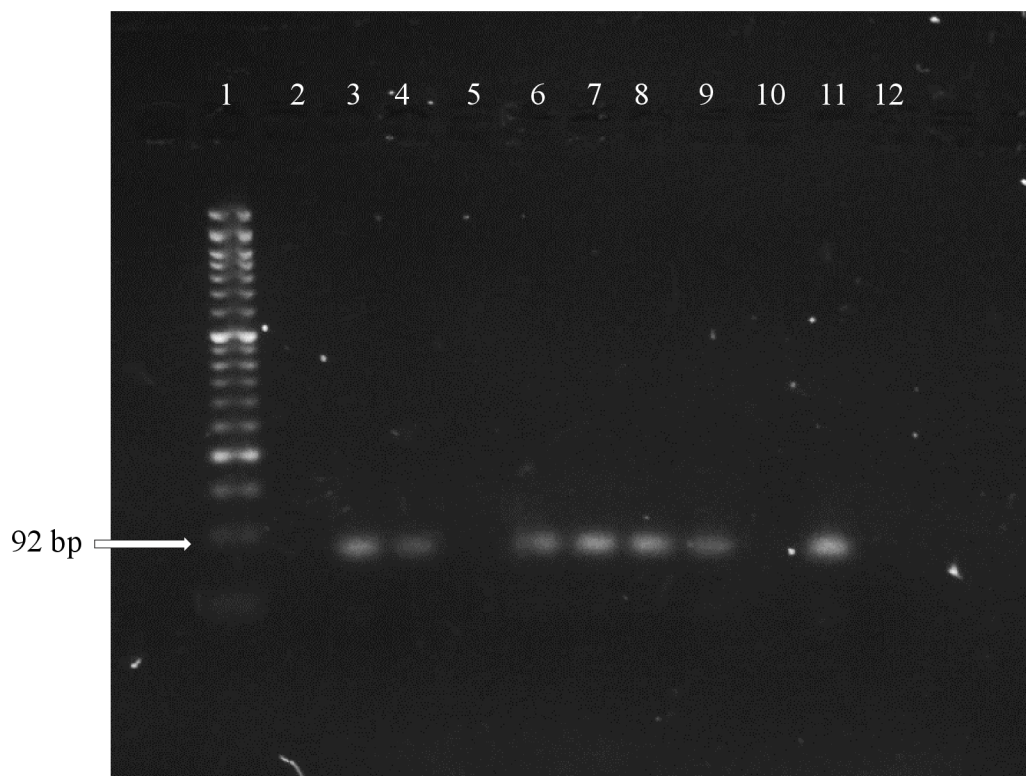
Obrázek 2: Gelová elektroforéza produktů PCR pro doménu Bacteria

Tabulka 7: Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy pro doménu Bacteria

Běh	Název	Značka	Detekce
1	DNA standard 50 bp	S	
2			
3	DNA izolovaná komerčním kitem	1.1	++
4		1.2	+
5			
6	DNA izolovaná fenolovou extrakcí	2.1	+
7		2.2	+
8		2.3	+
9		2.4	+
10			
11	Pozitivní kontrola	Pk	++
12	Negativní kontrola	Nk	-

#### 5.4 PCR pro rod *Lactobacillus*

Po detekci PCR produktů pomocí gelové elektroforézy pro doménu *Bacteria* bylo provedeno PCR pro rod *Lactobacillus*. Postup bylo uvedeno v kapitole 4.4.6. Jako primery byly použity F\_allact a R\_allact (sekvence jsou uvedeny v Tabulce 3) s velikostí produktů 92 bp. Jako pozitivní kontrolu bylo použito DNA kmenu *Lactobacillus plantarum* CCDM 183. Termocykler byl nastaven dle programu uvedeného v Tabulce 5. Po amplifikaci bylo provedeno detekci pomocí gelové elektroforézy v 2% agarózovém gelu. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 3 a popsány v Tabulce 8.



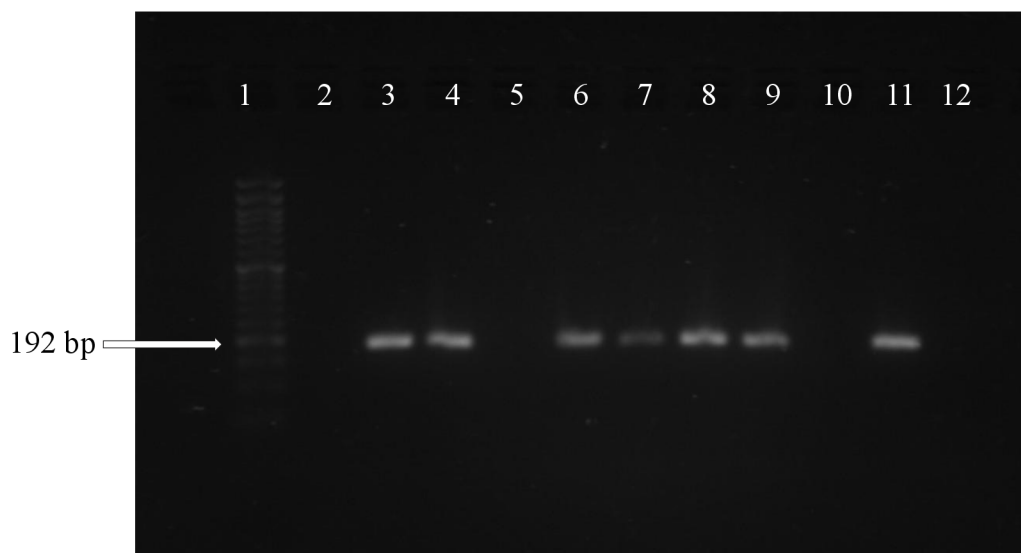
Obrázek 3: Gelová elektroforéza produktů PCR pro rod *Lactobacillus*

Tabulka 8: Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy pro rod *Lactobacillus*

Běh	Název	Značka	Detekce
1	DNA standard 50 bp	S	
2			
3	DNA izolovaná komerčním kitem	1.1	++
4		1.2	+
5			
6	DNA izolovaná fenolovou extrakcí	2.1	+
7		2.2	++
8		2.3	++
9		2.4	+
10			
11	Pozitivní kontrola	Pk	++
12	Negativní kontrola	Nk	-

### 5.5 PCR pro druh *Lactobacillus delbrueckii*

Po ověření přítomnosti bakterií rodu *Lactobacillus* bylo provedeno druhově specifickou polymerázovou řetězovou reakcí pro druh *Lactobacillus delbrueckii*. Sekvence použitých primerů (Delbrueckii-F a Delbrueckii-R) jsou uvedeny v Tabulce 3. Velikost produktů je 192 bp. Jako pozitivní kontrolu bylo použito *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190. Teploty, doby trvání a počet cyklů jsou uvedeny v Tabulce 5. Po provedení PCR výsledky byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy v 1,6% agarózovém gelu. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 4 a popsány v Tabulce 9.



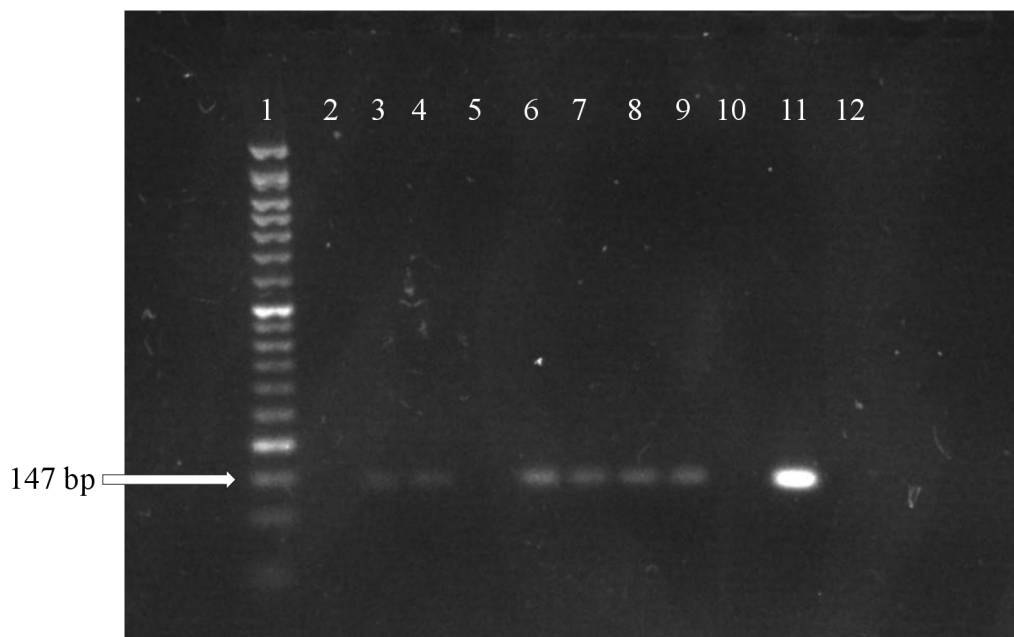
Obrázek 4: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Lactobacillus delbrueckii*

Tabulka 9: Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy pro *Lactobacillus delbrueckii*

Běh	Název	Značka	Detekce
1	DNA standard 50 bp	S	
2			
3	DNA izolovaná komerčním kitem	1.1	++
4		1.2	++
5			
6	DNA izolovaná fenolovou extrakcí	2.1	++
7		2.2	+
8		2.3	++
9		2.4	++
10			
11	Pozitivní kontrola	Pk	++
12	Negativní kontrola	Nk	-

### 5.6 PCR pro druh *Lactobacillus plantarum*

Přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus plantarum* ve vzorku ústní vody Biorepair Plus byla ověřena pomocí amplifikace a následné detekce produktů. PCR byla provedena za využitím specifických primerů Plantarum-F a Plantarum-R s očekávanou velikostí produktů 147 bp. Jako pozitivní kontrolu bylo použito *Lactobacillus plantarum* CCDM 183. Teplotní program PCR je uveden v Tabulce 5. Detekce byla provedena pomocí gelové elektroforézy v 1,6% agarózovém gelu. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 5 a popsány v Tabulce 10.



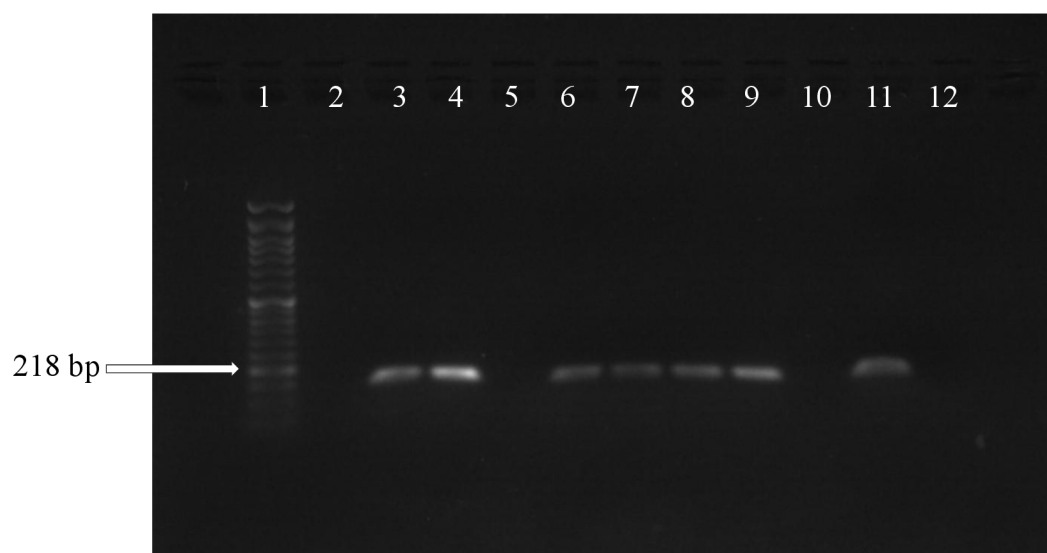
Obrázek 5: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Lactobacillus plantarum*

Tabulka 10: Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy pro *Lactobacillus plantarum*

Běh	Název	Značka	Detekce
1	DNA standard 50 bp	S	
2			
3	DNA izolovaná komerčním kitem	1.1	+
4		1.2	+
5			
6	DNA izolovaná fenolovou extrakcí	2.1	+
7		2.2	+
8		2.3	+
9		2.4	+
10			
11	Pozitivní kontrola	Pk	++
12	Negativní kontrola	Nk	-

### 5.7 PCR pro druh *Lactobacillus pentosus*

PCR pro ověření přítomnosti bakterií druhu *Lactobacillus pentosus* byla provedena pomocí primerů PentF a PentR, jejichž sekvence jsou uvedeny v Tabulce 3. Očekávaná velikost produktů je 218 bp. PCR byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.6 a teplotního programu uvedeného v Tabulce 5. Jako pozitivní kontrolu bylo použito *Lactobacillus pentosus* CCM 4619. Po amplifikaci následovala agarózová gelová elektroforéza v 1,6% gelu. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 6 a popis je uveden v Tabulce 11.



Obrázek 6: Gelová elektroforéza produktů PCR pro druh *Lactobacillus pentosus*

Tabulka 11: Detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy pro *Lactobacillus pentosus*

Běh	Název	Značka	Detekce
1	DNA standard 50 bp	S	
2			
3	DNA izolovaná komerčním kitem	1.1	+
4	Pozitivní kontrola	Pk	++
5			
6	DNA izolovaná fenolovou extrakcí	2.1	+
7		2.2	+
8		2.3	+
9		2.4	+
10			
11	DNA izolovaná komerčním kitem	1.2	+
12	Negativní kontrola	Nk	-



## 6 DISKUZE

### 6.1 Izolace bakteriální DNA

Ze vzorku ústní vody Biorepair Plus bylo připraveno hrubé lyzáty, ze kterých následně byla izolovaná DNA fenolovou extrakcí. Vzorky označené jako 2.3 a 2.4 byly promyty fenolem a chloroform-isoamylalkoholem dvakrát, s účelem zvýšení jejich čistoty. Jinak postup izolace byl stejný jako u vzorků 2.1 a 2.2. Poté bylo provedeno sražení ethanolem. Po izolaci DNA byla rozpuštěna v TE pufru.

Paralelně bylo provedeno izolace DNA pomocí komerční izolační sady Omni Bacterial DNA Purification Kit. K izolaci bylo použito přímo vzorek ústní vody, což výrazně zkrátilo čas potřebný k provedení protokolu. Po izolaci DNA byla rozpuštěna v EB pufru a uchována v lednici. Pro minimalizaci vlivu náhodných chyb na hodnocení účinnosti izolačních metod, byly pro každý protokol připraveny dva vzorky stejným způsobem.

### 6.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA

K posouzení úspěšnosti izolační metody pro konkrétní vzorek je nutné provést kvantifikaci a vyhodnotit čistotu DNA. K tomu byl použit přístroj Nanodrop 2000c s příslušným softwarem. Bylo porovnáno koncentraci a čistotu DNA, izolované fenolovou extrakcí a pomocí OMNI Bacterial DNA Purification Kitu. Z Tabulky 6 je vidět, že vzorky 1.1 a 1.2, izolované pomocí komerční sady, mají poměr  $A_{260/280}$  v rozmezí 1,81–1,99, z čeho lze posoudit, že ve vzorku nejsou přítomné proteiny. Nicméně poměry  $A_{260/230}$  byly pod optimálními hodnotami, což může naznačovat přítomnost EDTA, která byla využita během izolace [65,77]. Koncentrace DNA izolované pomocí komerční sady se pohybovaly v rozmezí 15,5–22,4 ng· $\mu\text{l}^{-1}$ , což je několikanásobně nižší, než u vzorků 2.1 a 2.2, které byly extrahovány dle standardního protokolu fenolové extrakce.

Vzorky 2.1 a 2.2, izolované fenolovou extrakcí dle standardního postupu, mají poměr  $A_{260/280}$  v rozmezí 1,46–1,49, což může naznačovat kontaminaci proteiny nebo fenolem. Vzorky 2.3 a 2.4, u kterých extrakce fenolem a chloroform-isoamylalkoholem byly opakovány dvakrát, vykazují mnohem lepší hodnoty poměru  $A_{260/280}$ , které se pohybují v rozmezí 1,55–1,73. Je vidět, že DNA je znečištěná proteiny nebo fenolem, ale vzorek 2.3 lze považovat za vyhovující. Nevýhodou metody s dvakrát opakovanými extrakcemi oproti standardnímu protokolu je významný pokles koncentrace DNA z 99,0–111,4 ng· $\mu\text{l}^{-1}$  na 12,5–46,0 ng· $\mu\text{l}^{-1}$ . Hodnoty poměrů  $A_{260/230}$  u všech čtyř vzorků izolovaných fenolovou extrakcí se pohybují v rozmezí 0,72–1,33. Menší hodnota poměru  $A_{260/230}$  může naznačovat přítomnost EDTA a fenolu [65,77].

### 6.3 PCR pro doménu *Bacteria*

PCR pro doménu *Bacteria* byla provedena jako první krok analýzy přítomnosti probiotických bakterií uvedených výrobcem ve složení produktu osobní hygieny. K amplifikaci DNA byly použity primery F\_Eub a R\_Eub o velikosti produktů 466 bp. Detekce ampikonů byla provedena pomocí gelové elektroforézy. Vzhledem k velikosti produktů PCR bylo rozhodnuto použít 1,2% agarózový gel. Výsledky byly vizualizovány při vlnové délce 302 nm pomocí detekčního systému Azure biosystems C200. Jak je vidět z Obrázku 2, přítomnost bakteriální

DNA byla ověřena ve všech vzorcích. Velikost produktů byla stanovena srovnáním s DNA standardem, obsahujícím fragmenty v rozmezí 50–1500 bp. Velikost produktů byla 466 bp, což odpovídá velikosti pozitivní kontroly, která byla přepravená z kmenu *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 118. K ověření, zda během pracovního postupu PCR nedošlo k nějaké formě kontaminace, se používá negativní kontrola, připravená z komponentů pro PCR, do kterých se místo templátu DNA přidává PCR voda. Z Obrázku 2 je vidět, že k detekci produktu na místě nanášení negativní kontroly nedošlo, což znamená že nebyla provedena žádná amplifikace a komponenty pro PCR nejsou kontaminované cizími DNA [78].

#### **6.4 PCR pro rod *Lactobacillus***

Vzorek ústní vody Biorepair Plus obsahuje pouze zástupce rodu *Lactobacillus*, a proto po ověření přítomnosti ve všech zkoumaných vzorcích bakteriální DNA bylo provedeno polymerázovou řetězovou reakci pro rod *Lactobacillus* s využitím primerů F\_allact a R\_allact. Po provedení agaróзовé gelové elektroforézy v 2% gelu, výsledky byly vizualizovány při 302 nm. Z Obrázku 3 je vidět, že přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* byla potvrzená ve všech vzorcích. Velikost produktů amplifikace byla 92 bp, jak u vzorků izolovaných pomocí kitu a fenolovou extrakcí, tak i u pozitivní kontroly. Jako pozitivní kontrolu bylo použito kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 183. U negativní kontroly k amplifikaci nedošlo.

#### **6.5 PCR pro druh *Lactobacillus delbrueckii***

K důkazu přítomnosti bakterií druhu *Lactobacillus delbrueckii* byly použity primery Delbrueckii-F a Delbrueckii-R. Po amplifikaci fragmenty DNA byly detekovány pomocí gelové elektroforézy v 1,6% agaróзовém gelu s následnou vizualizací při 302 nm. Z obrázku 4 je vidět, že ve všech vzorcích jsou přítomné amplikony o velikosti 192 bp, což znamená že ve všech vzorcích jsou přítomné bakterie druhu *Lactobacillus delbrueckii*. Na agaróзовém gelu lze pozorovat rozdílné intenzity detekce amplikonů. Nejslabší intenzitu má vzorek 2.2 izolovaný fenolovou extrakcí bez opakovaného promytí fenolem a chloroformem. Tento vzorek má hodnotu poměru  $A_{260/280}$  1,46, což je nejnižší hodnota ze všech vzorků. To znamená, že pravděpodobně PCR byla ovlivněna přítomností proteinů. Vzorek ústní vody ve svém složení obsahuje laktoferin, který může inhibovat aktivitu *Taq* polymerázy a ovlivňovat průběh PCR [79,80]. Jiné vzorky vykazují detekci podobnou pozitivní kontrole, která byla připravená s použitím *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190, jako matrice DNA. Negativní kontrola nevykazuje žádnou detekci, což nasvědčuje, že nedošlo k amplifikaci.

#### **6.6 PCR pro druh *Lactobacillus plantarum***

Druhově specifickou PCR pro druh *Lactobacillus plantarum* bylo provedeno za využitím primerů Plantarum-F a Plantarum-R s očekávanou velikostí produktů 147 bp. Detekce produktů byla provedená pomocí 1,6% agaróзовé gelové elektroforézy. Přítomnost bakterií druhu *Lactobacillus plantarum* byla potvrzená jak ve vzorcích izolovaných pomocí komerčního kitu, tak i ve vzorcích izolovaných fenolovou extrakcí, což je znázorněno na Obrázku 5. Detekované produkty mají stejnou velikost, jak i pozitivní kontrola, která byla připravená z *Lactobacillus plantarum* CCDM 183. Velikost produktů odpovídá očekávané velikosti 147 bp. Negativní kontrola nebyla na gelu detekovaná.

## **6.7 PCR pro druh *Lactobacillus pentosus***

PCR pro druh *Lactobacillus pentosus* byla provedena se specifickými primery PentF a PentR s velikostí produktů 218 bp. K ověření přítomnosti bakterií tohoto druhu bylo provedeno gelovou elektroforézou v 1,6% gelu s následnou vizualizací pomocí přístroje Azure biosystems C200. Z Obrázku 6 je vidět, že přítomnost zástupců druhu *Lactobacillus pentosus* byla potvrzená jak ve vzorcích izolovaných pomocí kitu, tak i ve vzorcích izolovaných fenolovou extrakcí. U negativní kontroly k amplifikaci nedošlo.

## 7 ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce se zaměřuje na definici probiotických bakterií, jejich mechanismy působení a bezpečnost. Významná část práce se věnuje orálnímu mikrobiomu, jeho vlivu na zdraví jedinců a vlivu probiotik na ústní dutinu. V práci byly také popsány metody identifikace probiotických mikroorganismů, způsoby izolace a kvantifikace DNA, princip polymerázové řetězové reakce, její modifikace a detekce výsledných produktů pomocí gelové elektroforézy.

V experimentální části bylo provedeno ověření přítomnosti probiotických bakterií ve složení ústní vody značky Biorepair Plus. DNA byla izolovaná dvěma metodami: fenolovou extrakcí a izolací pomocí komerční sady Omni Bacterial DNA Purification Kit. Vzorky, izolované standardním postupem extrakce DNA organickými rozpouštědly, měly nejvyšší hodnoty koncentrace a nejlepší hodnoty poměru absorbance při 260 nm k absorbanci při 230 nm. Nicméně hodnoty poměrů  $A_{260/280}$  naznačovaly silnou kontaminaci proteiny ve srovnání s jinými vzorky. Standardní postup byl upraven tak, že extrakce fenolem a chloroformem byly provedeny dvakrát. Modifikací postupu bylo možné dosáhnout lepšího poměru  $A_{260/280}$ , avšak došlo k několikanásobnému poklesu koncentrace DNA. Vzorky izolované pomocí komerční sady měly nejlepší hodnoty poměru  $A_{260/280}$ , které naznačují, že vzorky nebyly kontaminovány proteiny, ale měly nejnižší hodnoty poměru  $A_{260/230}$ , z čeho lze předpokládat, že vzorky byly kontaminovány EDTA. Průměrná koncentrace DNA ve vzorcích izolovaných kitem byla nejnižší ze všech metod.

Izolované vzorky DNA byly použity jako matrice pro specifické PCR k detekci mikroorganismů domény *Bacteria*, rodu *Lactobacillus* a deklarovaných výrobcem druhů *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*. Po amplifikaci byla provedena detekce produktů pomocí gelové elektroforézy s následnou vizualizací při 302 nm. Z elektroforeogramů vyplývá, že vzorek ústní vody Biorepair Plus obsahuje bakterie deklarovaných výrobcem druhů *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] REID, Gregor; SANDERS, M. E.; GASKINS, H. Rex; GIBSON, Glenn R.; MERCENIER, Annick et al. New Scientific Paradigms for Probiotics and Prebiotics. Online. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2003, roč. 37, č. 2, s. 105-118. ISSN 0192-0790. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/00004836-200308000-00004>. [cit. 2024-05-18].
- [2] HAMILTON-MILLER, J. M. T.; GIBSON, G. R. a BRUCK, W. Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. Online. *British Journal of Nutrition*. 2003, roč. 90, č. 4, s. 845-845. ISSN 0007-1145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1079/BJN2003954>. [cit. 2024-05-18].
- [3] IDREES, Maryam; IMRAN, Muhammad; ATIQ, Naima; ZAHRA, Rabaab; ABID, Rameesha et al. Probiotics, their action modality and the use of multi-omics in metamorphosis of commensal microbiota into target-based probiotics. Online. *Frontiers in Nutrition*. 2022, roč. 9. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.959941>. [cit. 2024-05-18].
- [4] MCFARLAND, L. V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. Online. *Clinical Infectious Diseases*. 2015, roč. 60, č. 2, s. 85-90. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/cid/civ054>. [cit. 2024-05-18].
- [5] KUMAR BAJAJ, Bijender; J.J. CLAES, Ingmar a LEBEER, Sarah. FUNCTIONAL MECHANISMS OF PROBIOTICS. Online. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 2015, roč. 4, č. 4, s. 321-327. ISSN 1338-5178. Dostupné z: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.4.321-327>. [cit. 2024-05-18].
- [6] MOWAT, Allan McI. Historical Perspective: Metchnikoff and the intestinal microbiome. Online. *Journal of Leukocyte Biology*. 2021, roč. 109, č. 3, s. 513-517. ISSN 0741-5400. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/JLB.4RI0920-599>. [cit. 2024-05-18].
- [7] BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G.; LANGELLA, Philippe; BRITTON, Robert Allen a CANI, Patrice D. Use of Traditional and Genetically Modified Probiotics in Human Health: What Does the Future Hold? Online. *Microbiology Spectrum*. 2017, roč. 5, č. 5. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0016-2016>. [cit. 2024-05-18].
- [8] SANDERS, Mary Ellen; MERENSTEIN, Daniel J.; REID, Gregor; GIBSON, Glenn R. a RASTALL, Robert A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. Online. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2019, roč. 16, č. 10, s. 605-616. ISSN 1759-5045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>. [cit. 2024-05-18].
- [9] ŠRŮTKOVÁ, Dagmar; ŠPANOVA, Alena; ŠPANO, Miroslav; DRÁB, Vladimír; SCHWARZER, Martin et al. Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. Online. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, roč. 87, č. 1, s. 10-16. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.014>. [cit. 2024-05-18].

- [10] GOH, Yong Jun a KLAENHAMMER, Todd R. Genetic Mechanisms of Prebiotic Oligosaccharide Metabolism in Probiotic Microbes. Online. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2015, roč. 6, č. 1, s. 137-156. ISSN 1941-1413. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015706>. [cit. 2024-05-18].
- [11] HOFVENDAHL, Karin a HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. Online. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, roč. 26, č. 2-4, s. 87-107. ISSN 01410229. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6). [cit. 2024-05-18].
- [12] ZHENG, Jinshui; WITTOUCK, Stijn; SALVETTI, Elisa; FRANZ, Charles M.A.P.; HARRIS, Hugh M.B. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. Online. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020, roč. 70, č. 4, s. 2782-2858. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>. [cit. 2024-05-19].
- [13] ALBARILLO, Fritzie S; SHAH, Ushma; JOYCE, Cara a SLADE, David. *Lactobacillus rhamnosus* infection: A single-center 4-year descriptive analysis. Online. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2020, roč. 12, č. 3, s. 119-123. ISSN 0974-777X. Dostupné z: [https://doi.org/10.4103/jgid.jgid\\_112\\_19](https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_112_19). [cit. 2024-05-19].
- [14] TUO, Yanfeng; ZHANG, Weiqin; ZHANG, Lanwei; AI, Lianzhong; ZHANG, Yingchun et al. Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. Online. *Anaerobe*. 2013, roč. 21, s. 22-27. ISSN 10759964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.007>. [cit. 2024-05-19].
- [15] CIBIK, R. a CHAPOT-CHARTIER, M.-P. Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. Online. *Letters in Applied Microbiology*. 2004, roč. 38, č. 6, s. 459-463. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01516.x>. [cit. 2024-05-19].
- [16] LOBEDA, Katherine; JIN, Qing; WU, Jian; ZHANG, Wencai a HUANG, Haibo. Lactic acid production from food waste hydrolysate by *Lactobacillus pentosus*: Focus on nitrogen supplementation, initial sugar concentration, pH, and fed-batch fermentation. Online. *Journal of Food Science*. 2022, roč. 87, č. 7, s. 3071-3083. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16205>. [cit. 2024-05-19].
- [17] THUY, Tran Thi Dieu; KUO, Pei-Yun; LIN, Sha-Ma a KAO, Cheng-Yen. Anti-*Helicobacter pylori* activity of potential probiotic *Lactiplantibacillus pentosus* SLC13. Online. *BMC Microbiology*. 2022, roč. 22, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02701-z>. [cit. 2024-05-19].
- [18] PARENTE, Eugenio; CIOCIA, Felicia; RICCIARDI, Annamaria; ZOTTA, Teresa; FELIS, Giovanna E. et al. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, roč. 144, č. 2, s. 270-279. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.005>. [cit. 2024-05-19].

- [19] DE DEUS, Cassandra; EDUARDO DE SOUZA BRENER, Carlos; MARQUES DA SILVA, Thaiane; SOMACAL, Simara; QUEIROZ ZEPKA, Leila et al. Co-encapsulation of *Lactobacillus plantarum* and bioactive compounds extracted from red beet stem (*Beta vulgaris* L.) by spray dryer. Online. *Food Research International*. 2023, roč. 167, č. 112607. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112607>. [cit. 2024-05-19].
- [20] KIM, Mibang; JUNG, Dong-Hyun; SEO, Dong-Ho; CHUNG, Won-Hyong a SEO, Myung-Ji. Genome analysis of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* KCCP11226 reveals a well-conserved C30 carotenoid biosynthetic pathway. Online. *3 Biotech*. 2020, roč. 10, č. 4. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2149-y>. [cit. 2024-05-19].
- [21] DE LA TORRE, I.; LADERO, M. a SANTOS, V. E. Production of d-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, roč. 102, č. 24, s. 10511-10521. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9432-4>. [cit. 2024-05-19].
- [22] CANNON, Abigail R; SHIM, Esther H; KUPRYS, Paulius V a CHOUDHRY, Mashkoor A. IL-22 and *Lactobacillus delbrueckii* mitigate alcohol-induced exacerbation of DSS-induced colitis. Online. *Journal of Leukocyte Biology*. 2022, roč. 112, č. 6, s. 1471-1484. ISSN 0741-5400. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/JLB.4A0122-068R>. [cit. 2024-05-19].
- [23] ARCHER, A.C.; KURREY, N.K. a HALAMI, P.M. In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2018, roč. 125, č. 1, s. 243-256. ISSN 13645072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.13757>. [cit. 2024-05-19].
- [24] VAN DEN NIEUWBOER, M. a CLAASSEN, E. Dealing with the remaining controversies of probiotic safety. Online. *Beneficial Microbes*. 2019, roč. 10, č. 6, s. 605-616. ISSN 1876-2883. Dostupné z: <https://doi.org/10.3920/BM2018.0159>. [cit. 2024-05-19].
- [25] MOHAJERI, M. Hasan; BRUMMER, Robert J. M.; RASTALL, Robert A.; WEERSMA, Rinse K.; HARMSSEN, Hermie J. M. et al. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. Online. *European Journal of Nutrition*. 2018, roč. 57, č. S1, s. 1-14. ISSN 1436-6207. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4>. [cit. 2024-05-19].
- [26] ROE, Amy L.; BOYTE, Marie-Eve; ELKINS, Chris A.; GOLDMAN, Virginia S.; HEIMBACH, James et al. Considerations for determining safety of probiotics: A USP perspective. Online. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2022, roč. 136, č. 105266. ISSN 02732300. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105266>. [cit. 2024-05-19].
- [27] MERENSTEIN, Daniel; POT, Bruno; LEYER, Gregory; OUWEHAND, Arthur C.; PREIDIS, Geoffrey A. et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. Online. *Gut Microbes*. 2023, roč. 15, č. 1. ISSN 1949-0976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034>. [cit. 2024-05-19].



- [28] HUTKINS, Robert W; KRUMBECK, Janina A; BINDELS, Laure B; CANI, Patrice D; FAHEY, George et al. Prebiotics: why definitions matter. Online. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, roč. 37, s. 1-7. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.001>. [cit. 2024-05-19].
- [29] ZENG, Meijun; VAN PIJKEREN, Jan-Peter a PAN, Xuejun. Gluco-oligosaccharides as potential prebiotics: Synthesis, purification, structural characterization, and evaluation of prebiotic effect. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2023, roč. 22, č. 4, s. 2611-2651. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13156>. [cit. 2024-05-19].
- [30] WHISNER, Corrie M. a CASTILLO, Luisa F. Prebiotics, Bone and Mineral Metabolism. Online. *Calcified Tissue International*. 2018, roč. 102, č. 4, s. 443-479. ISSN 0171-967X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0339-3>. [cit. 2024-05-19].
- [31] SALMINEN, Seppo; COLLADO, Maria Carmen; ENDO, Akihito; HILL, Colin; LEBEER, Sarah et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. Online. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021, roč. 18, č. 9, s. 649-667. ISSN 1759-5045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>. [cit. 2024-05-19].
- [32] NGUYEN, Thi-Tho; NGUYEN, Phu-Tho; PHAM, Minh-Nhut; RAZAFINDRALAMBO, Hary; HOANG, Quoc-Khanh et al. Synbiotics: a New Route of Self-production and Applications to Human and Animal Health. Online. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2022, roč. 14, č. 5, s. 980-993. ISSN 1867-1306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09960-2>. [cit. 2024-05-19].
- [33] CAVALCANTE, Raissa Bertoncello; TELLI, Guilherme Silveira; TACHIBANA, Leonardo; DIAS, Danielle de Carla; OSHIRO, Eliana et al. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. Online. *Aquaculture Reports*. 2020, roč. 17. ISSN 23525134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100343>. [cit. 2024-05-19].
- [34] MA, Linxi; TU, Huaijun a CHEN, Tingtao. Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. Online. *Nutrients*. 2023, roč. 15, č. 2. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu15020291>. [cit. 2024-05-19].
- [35] ZHONG, Yifan; WANG, Shanshan; DI, Hanqiu; DENG, Zhaoxi; LIU, Jianxin et al. Gut health benefit and application of postbiotics in animal production. Online. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2022, roč. 13, č. 1. ISSN 2049-1891. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00688-1>. [cit. 2024-05-19].
- [36] SUN, Zhe; ZHAO, Zhi; FANG, Bing; HUNG, Weilian; GAO, Haina et al. Effect of Thermal Inactivation on Antioxidant, Anti-Inflammatory Activities and Chemical Profile of Postbiotics. Online. *Foods*. 2023, roč. 12, č. 19. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods12193579>. [cit. 2024-05-19].
- [37] LAINE, Fred J. a SMOKER, Wendy R.K. Oral cavity: Anatomy and pathology. Online. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 1995, roč. 16, č. 6, s. 527-545. ISSN 08872171. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0887-2171\(06\)80024-7](https://doi.org/10.1016/S0887-2171(06)80024-7). [cit. 2024-05-19].



- [38] LYNGE PEDERSEN, Anne Marie a BELSTRØM, Daniel. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. Online. *Journal of Dentistry*. 2019, roč. 80, s. 3-12. ISSN 03005712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.010>. [cit. 2024-05-19].
- [39] SCHMIDT, Thomas SB; HAYWARD, Matthew R; COELHO, Luis P; LI, Simone S; COSTEA, Paul I et al. Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. Online. *ELife*. 2019, roč. 8, č. e42693. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7554/eLife.42693>. [cit. 2024-05-19].
- [40] DODDS, Michael W.J.; JOHNSON, Dorteia A. a YEH, Chih-Ko. Health benefits of saliva: a review. Online. *Journal of Dentistry*. 2005, roč. 33, č. 3, s. 223-233. ISSN 03005712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.009>. [cit. 2024-05-19].
- [41] JIA, G.; ZHI, A.; LAI, P. F. H.; WANG, G.; XIA, Y. et al. The oral microbiota – a mechanistic role for systemic diseases. Online. *British Dental Journal*. 2018, roč. 224, č. 6, s. 447-455. ISSN 0007-0610. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.217>. [cit. 2024-05-19].
- [42] TAN, Xiujun; WANG, Yizhong a GONG, Ting. The interplay between oral microbiota, gut microbiota and systematic diseases. Online. *Journal of Oral Microbiology*. 2023, roč. 15, č. 1. ISSN 2000-2297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2213112>. [cit. 2024-05-19].
- [43] PENG, Xian; CHENG, Lei; YOU, Yong; TANG, Chengwei; REN, Biao et al. Oral microbiota in human systematic diseases. Online. *International Journal of Oral Science*. 2022, roč. 14, č. 1. ISSN 1674-2818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00163-7>. [cit. 2024-05-19].
- [44] KILIAN, M.; CHAPPLE, I. L. C.; HANNIG, M.; MARSH, P. D.; MEURIC, V. et al. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. Online. *British Dental Journal*. 2016, roč. 221, č. 10, s. 657-666. ISSN 0007-0610. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>. [cit. 2024-05-19].
- [45] PERES, Marco A; MACPHERSON, Lorna M D; WEYANT, Robert J; DALY, Blánaid; VENTURELLI, Renato et al. Oral diseases: a global public health challenge. Online. *The Lancet*. 2019, roč. 394, č. 10194, s. 249-260. ISSN 01406736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8). [cit. 2024-05-19].
- [46] TUOMINEN, Heidi a RAUTAVA, Jaana. Oral Microbiota and Cancer Development. Online. *Pathobiology*. 2021, roč. 88, č. 2, s. 116-126. ISSN 1015-2008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000510979>. [cit. 2024-05-19].
- [47] MISHRA, Sumita; RATH, Shakti a MOHANTY, Neeta. Probiotics—A complete oral healthcare package. Online. *Journal of Integrative Medicine*. 2020, roč. 18, č. 6, s. 462-469. ISSN 20954964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.08.005>. [cit. 2024-05-19].
- [48] ROSSONI, Rodnei Dennis; VELLOSO, Marisol dos Santos; DE BARROS, Patrícia Pimentel; DE ALVARENGA, Janaina Araújo; SANTOS, Jéssica Diane dos et al. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. Online. *Microbial Pathogenesis*. 2018, roč. 123, s. 361-

367. ISSN 08824010. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.032>. [cit. 2024-05-19].
- [49] RODRÍGUEZ, G.; RUIZ, B.; FALEIROS, S.; VISTOSO, A.; MARRÓ, M.L. et al. Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children. Online. *Journal of Dental Research*. 2016, roč. 95, č. 4, s. 402-407. ISSN 0022-0345. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0022034515623935>. [cit. 2024-05-19].
- [50] BUTERA, Andrea; GALLO, Simone; PASCADOPOLI, Maurizio; MAIORANI, Carolina; MILONE, Antonella et al. Paraprobiotics in Non-Surgical Periodontal Therapy: Clinical and Microbiological Aspects in a 6-Month Follow-Up Domiciliary Protocol for Oral Hygiene. Online. *Microorganisms*. 2022, roč. 10, č. 2. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020337>. [cit. 2024-05-19].
- [51] BUTERA, Andrea; GALLO, Simone; MAIORANI, Carolina; MOLINO, Domenico; CHIESA, Alessandro et al. Probiotic Alternative to Chlorhexidine in Periodontal Therapy: Evaluation of Clinical and Microbiological Parameters. Online. *Microorganisms*. 2021, roč. 9, č. 1. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010069>. [cit. 2024-05-19].
- [52] PENALA, Soumya; KALAKONDA, Butchibabu; PATHAKOTA, KrishnajaneyaReddy; JAYAKUMAR, Avula; KOPPOLU, Pradeep et al. Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial. Online. *Journal of Research in Pharmacy Practice*. 2016, roč. 5, č. 2, s. 56-93. ISSN 2279-042X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/2279-042X.179568>. [cit. 2024-05-19].
- [53] TALARICO, T L a DOBROGOSZ, W J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. Online. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989, roč. 33, č. 5, s. 674-679. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.33.5.674>. [cit. 2024-05-19].
- [54] SIDARENKA, A. V.; NOVIK, G. I. a AKIMOV, V. N. Application of molecular methods to classification and identification of bacteria of the genus *Bifidobacterium*. Online. *Microbiology*. 2008, roč. 77, č. 3, s. 251-260. ISSN 0026-2617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S0026261708030016>. [cit. 2024-05-19].
- [55] FRANCO-DUARTE, Ricardo; ČERNÁKOVÁ, Lucia; KADAM, Snehal; S. KAUSHIK, Karishma; SALEHI, Bahare et al. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. Online. *Microorganisms*. 2019, roč. 7, č. 5. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>. [cit. 2024-05-19].
- [56] WATSON, J. D. a CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953, roč. 171, č. 4356, s. 737-738. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- [57] TRAVERS, Andrew a MUSKHELISHVILI, Georgi. DNA structure and function. Online. *The FEBS Journal*. 2015, roč. 282, č. 12, s. 2279-2295. ISSN 1742-464X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/febs.13307>. [cit. 2024-05-19].

- [58] XIAO, Fan; CHEN, Zhe; WEI, Zixiang a TIAN, Leilei. Hydrophobic Interaction: A Promising Driving Force for the Biomedical Applications of Nucleic Acids. Online. *Advanced Science*. 2020, roč. 7, č. 16. ISSN 2198-3844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/advs.202001048>. [cit. 2024-05-19].
- [59] ŠMARDA, Jan; DOŠKAŘ, Jiří; PANTUČEK, Roman; RŮŽIČKOVÁ, Vladislava a KOPTÍKOVÁ, Jana. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [60] TAN, Siun Chee a YIAP, Beow Chin. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. Online. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, roč. 2009, č. 574398 s. 1-10. ISSN 1110-7243. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2009/574398>. [cit. 2024-05-19].
- [61] WU, Tiantian; JIANG, Qingqing; WU, Dan; HU, Yaqin; CHEN, Shiguo et al. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. Online. *Food Chemistry*. 2019, roč. 274, s. 698-709. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.017>. [cit. 2024-05-19].
- [62] SHEN, Chang-Hui. Extraction and purification of nucleic acids. Online. In: *Diagnostic Molecular Biology*. 2. Elsevier, 2023, s. 157-180. ISBN 9780323917889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91788-9.00001-6>. [cit. 2024-05-19].
- [63] HEGDE, Rajat; HEGDE, Smita; JOSHI, Pooja; GAI, Prabhanjan P.; KULKARNI, Suyamindra S. et al. Rapid and inexpensive method of PCR ready DNA isolation from human peripheral blood and saliva. Online. *Analytical Biochemistry*. 2022, roč. 655, č. 114852. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114852>. [cit. 2024-05-19].
- [64] BRUIJNS, Brigitte; HOEKEMA, Tina; OOMENS, Lisa; TIGGELAAR, Roald a GARDENIERS, Han. Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods. Online. *Analytica*. 2022, roč. 3, č. 3, s. 371-384. ISSN 2673-4532. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/analytica3030025>. [cit. 2024-05-19].
- [65] SHEN, Chang-Hui. Quantification and analysis of nucleic acids. Online. In: *Diagnostic Molecular Biology*. 2. Elsevier, 2023, s. 181-208. ISBN 9780323917889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91788-9.00018-1>. [cit. 2024-05-19].
- [66] GUPTA, Nalini. DNA extraction and polymerase chain reaction. Online. *Journal of Cytology*. 2019, roč. 36, č. 2. ISSN 0970-9371. Dostupné z: [https://doi.org/10.4103/JOC.JOC\\_110\\_18](https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18). [cit. 2024-05-19].
- [67] KRÁLOVÁ, Blanka; FUKAL, Ladislav; RAUCH, Pavel a RUMML, Tomáš. *Bioanalytické metody*. 3. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-449-1.
- [68] GUPTA, Nalini. DNA extraction and polymerase chain reaction. Online. *Journal of Cytology*. 2019, roč. 36, č. 2, s. 116-117. ISSN 0970-9371. Dostupné z: [https://doi.org/10.4103/JOC.JOC\\_110\\_18](https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18). [cit. 2024-05-19].

- [69] CEUPPENS, Siele; LI, Dan; UYTENDAELE, Mieke; RENAULT, Pierre; ROSS, Paul et al. Molecular Methods in Food Safety Microbiology: Interpretation and Implications of Nucleic Acid Detection. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014, roč. 13, č. 4, s. 551-577. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12072>. [cit. 2024-05-19].
- [70] SPYRYDONOV, Vladyslav; PIHIDA, Dmitro; SEREDA, Alexander; LIKHANOV, Artur a YU, Weiming. Production and evaluation of egg derived hot start antibodies. Online. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2020, roč. 44, s. 6-13. ISSN 07173458. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.01.005>. [cit. 2024-05-19].
- [71] LU, Shuhong; ZHANG, Xuesong; CHEN, Kaiying; XIE, Bingbin; SHAN, Dapeng et al. An Alternative Hot Start PCR Method Using a Nuclease-Deficient ExoIII from *Escherichia coli*. Online. *Molecular Biotechnology*. 2019, roč. 61, č. 12, s. 938-944. ISSN 1073-6085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00216-z>. [cit. 2024-05-19].
- [72] WITTMEIER, Patrick a HUMMEL, Susanne. Agarose Gel Electrophoresis to Assess PCR Product Yield: Comparison with Spectrophotometry, Fluorometry and qPCR. Online. *BioTechniques*. 2022, roč. 72, č. 4, s. 155-158. ISSN 0736-6205. Dostupné z: <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>. [cit. 2024-05-19].
- [73] LEE, Pei Yun; COSTUMBRADO, John; HSU, Chih-Yuan a KIM, Yong Hoon. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Online. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, č. 62. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/3923>. [cit. 2024-05-19].
- [74] HERBEL, S.R.; LAUZAT, B.; VON NICKISCH-ROSENEGK, M.; KUHN, M.; MURUGAIYAN, J. et al. Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2013, roč. 115, č. 6, s. 1402-1410. ISSN 13645072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.12341>. [cit. 2024-05-19].
- [75] KIM, Eiseul; YANG, Seung-Min; LIM, Bora; PARK, Si Hong; RACKERBY, Bryna et al. Design of PCR assays to specifically detect and identify 37 *Lactobacillus* species in a single 96 well plate. Online. *BMC Microbiology*. 2020, roč. 20, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01781-z>. [cit. 2024-05-19].
- [76] MOJGANI, Naheed; HUSSAINI, Fatimah a VASEJI, Narges. Characterization of Indigenous *Lactobacillus* Strains for Probiotic Properties. Online. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015, roč. 8, č. 2. ISSN 2008-3645. Dostupné z: <https://doi.org/10.5812/jjm.17523>. [cit. 2024-05-19].
- [77] MATLOCK, Brian. Assessment of Nucleic Acid Purity. In: ThermoFisher Scientific [online]. Wilmington, USA, 2015 [cit. 2023-05-19]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- [78] VEN, Seow; RANI, Abdul; MAGDELDIN, Sameh a BAHAMAN, Abdul Rani. Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis. Online. In: *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. InTech, 2012, s. 41-46. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/36891>. [cit. 2024-05-19].

- [79] RAMOS, O.L.; PEREIRA, R.N.; RODRIGUES, R.M.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. et al. Whey and Whey Powders: Production and Uses. Online. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, s. 498-505. ISBN 9780123849533. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9>. [cit. 2024-05-19].
- [80] AL-SOUD, Waleed Abu a RÅDSTRÖM, Peter. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. Online. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, roč. 39, č. 2, s. 485-493. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.485-493.2001>. [cit. 2024-05-19].

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ANI – průměrná nukleotidová identita

bp – pár bází

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

RNA – ribonukleová kyselina

RT-PCR – reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce

SDS – dodecyl sulfát sodný

*Taq* DNA-polymeráza – termostabilní enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

TE pufr – Tris-EDTA pufr

UV – ultrafialové světlo