



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

NOVÉ TRENDY VE VYUŽITÍ PROBIOTIK V KOSMETICKÝCH VÝROBCÍCH A JEJICH CHARAKTERIZACI

NEW TRENDS IN THE USE OF PROBIOTICS IN COSMETIC PRODUCTS AND THEIR CHARACTERIZATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Monika Dvořáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1880/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Monika Dvořáková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Nové trendy ve využití probiotik v kosmetických výrobcích a jejich charakterizaci

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny tyto dílčí úkoly:

- Vypracování literární rešerše na téma využití látek probiotického charakteru označovaných termínem "nového typu" v kosmetických výrobcích.
- Bude provedena mikrobiologická kultivace probiotických mikroorganismů obsažených ve vybraných kosmetických výrobcích dostupných na našem trhu.
- Následně bude provedena amplifikace bakteriální DNA pomocí konvenční analýzy PCR a PCR v kombinaci s použitím barviva ethidium monoazid za účelem stanovení živých, ale nekultivovatelných mikroorganismů.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Monika Dvořáková
studentka

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Probiotické výrobky jsou ve formě různých mléčných výrobků součástí naší stravy od nepaměti. V posledních letech se dostávají do popředí i v dalších odvětvích průmyslu, a to jak v odvětví farmaceutickém, kde jsou často dostupné jako doplňky stravy, tak zejména v odvětví kosmetickém, kde se často přidávají do produktů pro intimní hygienu, anebo také do produktů pečujících o pokožku.

První část práce se spočívá v teoretické rešerši v oblasti probiotik, mikrobiomu a dalšími možnostmi, jak se mohou probiotické organismy vyskytovat v kosmetických produktech.

Další část je věnována způsobům kultivace a izolace bakteriální DNA z následujících výrobků: krémy Benton, Mechnikov, La Roche-Posay a masky Benton a Neogen, a to v dostatečné kvalitě pro následnou amplifikaci pomocí PCR. DNA byla izolována pomocí magnetických nosičů, komerčním kitem a fenolovou extrakcí. Přítomnost bakteriální DNA byla prokázána analýzou q-PCR pomocí rodově specifických primerů u vybraných bakterií. Rodová identifikace byla v souladu s deklarovanými informacemi od výrobce.

Dále byla provedena PCR analýza v kombinaci s barvivem propidium monoazid pro určení životaschopnosti buněk a HRM analýza.

ABSTRACT

Probiotic products have always been, in the form of various dairy products, a part of our diet. In recent years, they also became prominent in the pharmaceutical sector, where they can often be found as food supplements, and in the cosmetic sector, where they are being added to intimate hygiene and skin care products.

The first part of the thesis consists of conducting a theoretical research in the field of probiotics, microbiome and other possibilities of where we can find probiotic organisms in cosmetic products.

Further, a part of the thesis is devoted to methods of cultivating and isolating bacterial DNA from the following products: Benton, Mechnikov, La Roche-Posay creams and Benton and Neogen masks, in sufficient quality for subsequent PCR amplification. DNA was isolated using magnetic carriers, a commercial kit, and phenol extraction. The presence of bacterial DNA was proved by a q-PCR analysis using genus-specified primers of selected bacteria. Genus identification corresponded with the information declared by the manufacturer.

To conclude, a PCR and propidium monoazide dye were used in combination for quantification of viable and dead cells, and a HRM analysis was performed.

KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotika, mikrobiom, kosmetický výrobek, PCR v reálném čase, HRM, izolace DNA

KEYWORDS

Probiotics, microbiome, cosmetic product, real-time PCR, HRM, DNA isolation

DVOŘÁKOVÁ, Monika. Nové trendy ve využití probiotik v kosmetických výrobcích a jejich charakterizaci [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149005>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Štěpánka Trachtová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé diplomové práce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení a čas, který mi věnovala. Děkuji také Ing. Denise Langové a Ing. Lence Fialové, Ph.D. za poskytnuté rady při tvorbě této práce. Dále bych ráda poděkovala rodině a nejbližším přátelům za podporu.

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
	2.1 POJEM KOSMETOLOGIE A KOSMETIKA	8
	2.1.1 Česká a evropská legislativa.....	8
	2.1.2 Anatomie kůže	8
	2.1.3 Onemocnění kůže	10
	2.2 MIKROBIOM	11
	2.2.1 Pojem mikrobiom a mikrobiota.....	11
	2.2.2 Střevní mikrobiom.....	11
	2.2.3 Kožní mikrobiom.....	12
	2.3 KOSMETICKÁ PÉČE NOVÉ GENERACE	16
	2.3.1 Nové trendy v kosmetice.....	16
	2.3.2 Probiotika v kosmetice	18
	2.3.3 Termín „-biotika“	21
	2.3.4 Prebiotika.....	21
	2.3.5 Parabiotika.....	21
	2.3.6 Postbiotika	22
	2.4 METODY IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH MIKROORGANISMŮ	25
	2.4.1 Fenotypové metody	26
	2.4.2 Morfologické metody.....	26
	2.4.3 Molekulárně diagnostické metody	26
	2.4.4 Gelová elektroforéza	34
3	CÍLE PRÁCE	35
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
	4.1 MATERIÁL.....	36
	4.1.1 Analyzované kosmetické výrobky obsahující probiotické bakterie	36
	4.1.2 Analyzované kosmetické výrobky obsahující postbiotické bakterie	39
	4.1.3 Bakteriální kmeny pro kultivace pozitivních kontrol	40
	4.1.4 Přístroje a pomůcky	40
	4.1.5 Chemikálie	41
	4.1.6 Roztoky.....	41
	4.1.7 Komponenty pro PCR.....	42
	4.1.8 Magnetické nosiče.....	42
	4.1.9 Kultivační média	42
	4.2 MIKROBIOLOGICKÉ METODY.....	44
	4.2.1 Mikrobiologické kultivační metody.....	44
	4.2.2 Příprava živných médií	44
	4.2.3 Příprava hrubých lysátů bakteriálních buněk z nakultivovaných výrobků.....	45
	4.2.4 Příprava hrubých lysátů z tekutého média.....	45
	4.2.5 Izolace DNA z hrubých lysátů buněk fenolovou extrakcí.....	45
	4.2.6 Izolace DNA z hrubých lysátů buněk pomocí magnetických mikročástic.....	46
	4.2.7 Izolace bakteriální DNA pomocí Omni Bacterial DNA Purification kitu.....	46
	4.2.8 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky	47
	4.3 MOLEKULÁRNĚ DIAGNOSTICKÉ METODY	47
	4.3.1 Provedení polymerázových řetězových reakcí	47
	4.3.2 Detekce produktů PCR agarosovou gelovou elektroforézou	50
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
	5.1 KULTIVACE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK Z VÝROBKŮ	52
	5.2 IZOLACE DNA.....	55

5.2.1	Stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA spektrofotometricky.....	55
5.2.2	Ověření intaktnosti izolované DNA.....	60
5.3	PROKÁZÁNÍ PŘÍTOMNOSTI DNA DOMÉNY <i>BACTERIA</i> METODOU PCR	61
5.4	PROKÁZÁNÍ PŘÍTOMNOSTI DNA RODU <i>LACTOBACILLUS</i> METODOU PCR	64
5.4.1	Primery <i>LbLMA</i> , <i>R 16-1</i>	64
5.4.2	Primery <i>F_allact</i> , <i>F_allact</i>	65
5.5	PROKÁZÁNÍ PŘÍTOMNOSTI DNA RODU <i>BIFIDOBACTERIUM</i> METODOU Q-PCR.....	66
5.6	PROKÁZÁNÍ PŘÍTOMNOSTI DNA RODU <i>LACTOCOCCUS</i> METODOU PCR	68
5.7	PROKÁZÁNÍ PŘÍTOMNOSTI DNA CELKOVÝCH KVASINEK METODOU Q-PCR.....	70
5.8	PRŮKAZ PŘÍTOMNOSTI VEGETATIVNÍCH BUNĚK METODOU PMA-PCR V REÁLNÉM ČASE	72
5.9	SHRnutí VÝSLEDKŮ PCR	75
5.10	HRM-PCR.....	76
6	ZÁVĚR.....	80
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	81
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	94

1 ÚVOD

Probiotické bakterie tradičně spadají do potravinářského průmyslu, kde je můžeme najít v mléčných produktech, nebo také v doplňcích stravy. Benefity, které tyto bakterie přinášejí, však mohou být využity i v jiném odvětví průmyslu – kosmetickém. Využití zde nacházejí jako složky krémů, gelů, ale i pomůcek pro intimní hygienu. Do těchto produktů se mohou přidávat jako živé buňky, probiotika, nebo i jen jako části buněk. Právě přidávání pouze vybraných částí buněk probiotických mikroorganismů do kosmetických výrobků je jeden z nových trendů, které můžeme pozorovat. Tento trend má mnoho benefitů, například umožnění používání kosmetických výrobků širší veřejností.

V práci bylo využito moderních molekulárních technologií, jako je PCR v reálném čase, HRM analýza nebo PCR s barvením živých a mrtvých buněk. Tyto technologie byly využity pro identifikaci probiotických bakterií v různých kosmetických produktech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pojem Kosmetologie a kosmetika

Kosmetologie je definována jako studium a aplikace kosmetického ošetření. Kosmetolog je vyškolený a licencovaný personál, který provádí kosmetická ošetření.

Termín kosmeceutika označuje kosmetické produkty s bioaktivními složkami, o nichž se tvrdí, že mají léčebné účinky. V současné době neexistují žádné právní požadavky, které by prokazovaly účinnost těchto produktů. Název vznikl spojením termínů „kosmetika“ a „nutriceutika“. Jedná se o topický přípravek, který se prodává jako kosmetika, ale má výkonnostní charakteristiky, které naznačují farmakologický účinek [1].

Podle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv v USA je kosmetika definována jako produkty „určené k aplikaci na lidské tělo za účelem čištění, zkrášlení, podpory, přitažlivosti nebo změny vzhledu bez ovlivnění struktury nebo funkcí těla“. Naproti tomu Evropská komise Dir. 93/35/EHS, čl. 1 kosmetický přípravek definuje jako „jakákoli látka nebo přípravek určený ke kontaktu s různými částmi lidského těla (epidermis, vlasový systém, nehty, rty a vnější pohlavní orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny za účelem výlučně nebo převážně k jejich čištění, parfémování, změně jejich vzhledu a/nebo úpravě tělesných pachů a/nebo k jejich ochraně nebo udržování v dobrém stavu“ [2].

Přípravky osobní péče jsou neléčivé výrobky, které jsou určeny k lokálnímu (topickému) podání a úpravě těla a vlasů, aniž by ovlivnily tělesnou strukturu a funkci. Používají se k čištění, tónování, zvlhčení, hydratování, peelingu, úpravě, vyhlazení, zklidnění, odstranění pachu, navonění a stylizování [3].

2.1.1 Česká a evropská legislativa

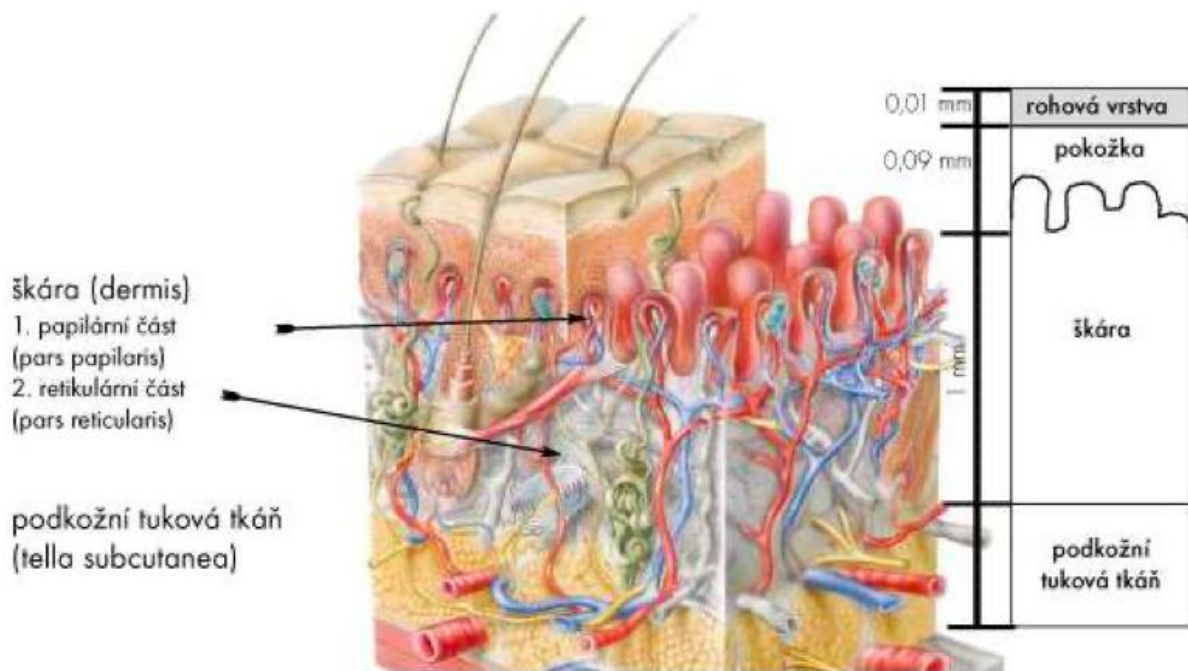
Při uvádění kosmetického přípravku na trh je potřeba jednat v souladu se zákonem č.258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví, § 27 Kosmetické přípravky, kde je požadováno uvedení údajů v českém jazyce při dodávání výrobků na český trh. Na tento zákon mimo jiné navazuje na Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích.

Na trh mohou být uváděny pouze takové kosmetické přípravky, pro které je v EU stanovena určitá právnická či fyzická osoba jako odpovědná osoba v EU. Tato odpovědná osoba zároveň uchovává informační dokumentaci snadno přístupnou a to na konkrétní adrese v EU. Musí k této dokumentaci zajistit přístup příslušného orgánu daného členského státu EU.. Pro uvedení kosmetického přípravku na trh, musí být na obalu, do kterého je přípravek naplněn a současně na jeho vnějším obalu nesmazatelně, čitelně a viditelně uvedeny jméno nebo zapsaný název a adresa odpovědné osoby. Před uvedením kosmetického přípravku na trh předkládá odpovědná osoba Evropské komisi informace o složení přípravku, které jsou dostupné toxikologickým střediskům s cílem umožnit rychlé a náležité lékařské ošetření v případě zdravotních obtíží [4].

2.1.2 Anatomie kůže

Právě kůže je největším orgánem lidského těla a představuje přibližně 16 % celkové tělesné hmotnosti dospělého člověka. Kůže se liší v tloušťce podle oblasti těla a jeho funkce. Kůže se obecně 1-2 mm silná, avšak v některých částech těla jako je očí víčko může mít tloušťku až 0,5 mm [5].

Kůže je složena z pevných vnějších vrstev, rozšířený systém potních žláz a vrstvě tukové tkáně pod povrchem kůže. Schéma Průřezu kůže je uvedeno na Obrázku 1. Součástí kůže jsou buňky citlivé na dotek, tlak, bolest, svědění nebo teplotu [5].



Obrázek 1: Průřez kůže (převzato a upraveno [6])

Dvě základní vrstvy kůže jsou epidermis a dermis. Epidermis neboli pokožka, se skládá z vrstveného keratinového dlaždicového epitelu. Obsahuje 4 hlavní typy buněk, z nichž největší část je zastoupena keratinocyty, a to až 90 %. Melanocyty tvoří 8 % epidermálních buněk, jsou odpovědné za produkci melaninu. Uvnitř epidermis se nacházejí také Langerhansovy a Merkelovy buňky [7]. V pokožce se nenachází krevní cévy a pokud se jedná o okysličení, zdroj metabolitů a odstraňování odpadních produktů, je závislá na dermis. Skládá se z několika vrstev – stratum basale, což je nejhlubší vrstva, dále stratum spinosum, stratum granulosum neboli granulární vrstva, také stratum lucidum a stratum corneum, což je vrchní vrstva. Tyto vrstvy představují různé fáze zralosti buněk a v průběhu stárnutí buněk se dostávají až na vrchní vrstvu, kde se odlupují. Pokožka se obnovuje dělením buněk ve své nejhlubší vrstvě [8]. Vše začíná v nejhlubší vrstvě stratum basale, která je jediná schopná dělení. Keranocyty v této vrstvě podléhají mitóze kdy jsou produkovány dvě dceřiné buňky. Jedna zůstává v této vrstvě a druhá migruje přes ostatní vrstvy na povrch pokožky. Tento proces trvá v průměrné epidermis o tloušťce 0,1 mm přibližně 28 dní [5]. U zdravé kůže je poměr mezi tvorbou nových keranocytů ve stratum basale a odumíráním keranocytů ze stratum corneum ekvimolární. Keratin je vláknitý protein, jehož funkcí je ochrana pokožky před teplem, chemikáliemi a mikroorganismy. Dále ve stratum basale najdeme melanocyty, buňky produkující melanin, což je pigment chránící pokožku před škodlivými účinky ultrafialového (UV) světla. Barva kůže je geneticky dána a přizpůsobuje se vnějším podmínkám, jako například vystavení UV paprskům. Zároveň souvisí s množstvím melaninu v epidermálních buňkách [5].

V další vrstvě, tedy stratum spinosum, se nacházejí Langerhansovy buňky, které jsou produkovány v červené kostní dřeni a poté migrují do stratum spinosum, kde se účastní

imunitních odpovědí proti mikroorganismům. Buňky při své cestě na povrch procházejí dále stratum granulosum, kde probíhá apoptóza neboli buněčná smrt. Buňky nejsou schopny vykonávat žádné metabolické funkce, zcela se keratinizují a jsou složeny z proteinu keratinu [7].

Nejvyšší vrstva pokožky, stratum corneum se skládá až z 30 vrstev zploštělých mrtvých keratinocytů. Buňky jsou mezi sebou spojeny pomocí intracelulárního lipidů z lamelárních granulí, které zabraňuje vysychání buněk. Při pohybu touto vrstvou ztrácí buňky svou lepivost a odlupují se ve shlucích [5].

Pod pokožkou leží vrstva dermis, jejíž hlavní funkcí je poskytovat živiny a fyzickou podporu epidermis. Tato vrstva obsahuje lymfatické cévy, nervová zakončení, vlasové folikuly a žlázy. K epidermis je připevněna pomocí síťových hřebenů, což jsou rýhy, které umožňují výměnu živin mezi dermis a epidermis [5]. Dermis je složena ze dvou vrstev, a to retikulární a papilární. Papilární vrstva obsahuje nervy a kapiláry, které vyživují epidermis, zatímco retikulární je tvořena silnou pojivovou tkání obsahující kolagenová a elastická vlákna.

Právě kolagen a elastin jsou dvě nejdůležitější bílkoviny obsažené v kůži. V dermis jsou uspořádány ve formě tkané sítě vláken, která má významnou pevnost v tahu a poskytuje dermis schopnost natahovat se a stahovat [8]. Trhání při napnutí kůže zabraňují především kolagenová vlákna v díky jejich vysoké pevnosti v tahu. Elastinová vlákna jsou syntetizována fibroblasty. Tato vlákna jsou jemnější než kolagen a jsou vetkaná mezi kolagenovými svazky. Elastin má také elastické vlastnosti, které umožňují pokožce návrat do normální polohy po natažení. S přibývajícím věkem dochází ke snižování počtu kolagenových vláken, která tuhnou a rozpadají se. To má za následek, že kolagenová vlákna ztrácejí svůj tvar a zamotávají se. Zatímco elastická vlákna ztrácejí část své pružnosti, ztlustňují se do svazků a třepí se. Tyto změny mají za následek vzhled vrásčité kůže [7].

2.1.3 Onemocnění kůže

Střevní mikrobiota tvoří metabolity, neurotransmitery a hormony, které vstupují do krevního řečiště a následně mají vliv na zdraví kůže. Kůže produkuje různé chemické látky, které mohou ovlivnit střeva, jako například vitamin D. V případě zvýšené propustnosti střevní bariéry, která může být zapříčiněna střevní dysbiózou, se znečišťující látky a škodlivé bakterie dostávají ze střev do krevního oběhu. Škodlivé bakterie a endotoxiny pak ovlivňují buňky a tato řetězová reakce může být v těle zdrojem zánětlivého prostředí a oxidativního stresu s důsledky pro kůži [9].

Změny v kožním mikrobiomu byly pozorovány u mnoha kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida (zvýšení podílu *S. epidermidis* a *S. aureus*), psoriáza (zvýšení podílu *S. aureus*), akné (zvýšení podílu *S. aureus*). Také seboroická dermatitida a lupy (zvýšení množství *Malassezia*) a onemocnění vitiligo (snížení mikrobiální diverzity a zvýšení podílu *Firmicutes* [10].

Ve studii o vlivu psychologického stresu na kůži bylo zmíněno propojení osa mozku a kůže. Ukázalo se, že akné, ekzém a atopický ekzém jsou aktivnější v době emocionálního stresu. U lidí, kteří trpí na akné, byla zjištěna chronicky zvýšená hladina stresového hormonu kortizolu. Bylo popsáno několik reakcí kůže na stres, mezi které je řazen vliv kortizolu, který se uvolňuje z nadledvin a při stresu změní činnosti receptorů kožních buněk, které tvoří maz.

Tím přispívá k zvýšení mastnosti kůže a produkci ucpaných pórů. Kortizol navíc ovlivňuje hladinu krevního cukru a snižuje citlivost na inzulin, což může narušit tvorbu zdravého kolagenu v kůži [9].

Acne vulgaris je chronické zánětlivé onemocnění, které poškozuje nebo zanicuje vlasové folikuly a mazové žlázy. S *acne vulgaris* je spojováno s řadou příčin, ale mikroby jsou mezi těmi hlavními. *Propionibacterium acnes* je dominantním mikroorganismem, který osidluje a přebírá kontrolu nad kožní mikroflórou v oblastech náchylných k tomuto onemocnění [9].

Psoriáza neboli lupénka je chronické autoimunitní onemocnění, které se vyskytuje v důsledku zvýšené obměny keratinocytů, v jehož důsledku buňkám trvá pouze 3-5 dnů, než se přesunou ze stratum basale do stratum croneum, aby se vyloučily. Přesná příčina psoriázy zatím nebyla určena. Nedávné výzkumy ukázaly možné spojení se zvýšeným výskytem některých kmenů bakterií, jmenovitě rody *Propiobacterium* a *Streptococcus*. Tyto studie prokázaly, že uvedené bakteriální rody jsou aktivnější u lidí s lupénkou. Lze tedy usuzovat, že výskyt lupénky souvisí s diverzitou kožní mikrobioty [7, 11]. Léčba této nemoci zahrnuje fototerapii pomocí UV světla. UVB je vlnová délka UV světla, která se vyskytuje v přirozeném slunečním světle. Proniká do epidermis a je zodpovědná za spálení sluncem. UVA záření se také vyskytuje při přirozeném slunečním světle a může se také používat při léčbě, ale jen po podání léku psoralen, které zvyšuje citlivost pokožky [8].

U atopické dermatitidy je pozorována dysbióza kožního mikrobiomu se zvýšením podílu *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* během atopické krize. To současně negativně ovlivňuje rovnováhu a mikrobiální diverzitu a zvyšuje pravděpodobnost tohoto onemocnění [9, 12]. *S. aureus* je považován za oportunní patogen, byly popsány různé faktory virulence (tvorba biofilmů, toxinů, modulinů rozpustných ve fenolu, proteáz) v souvislosti s kožními poruchami [13].

2.2 Mikrobiom

2.2.1 Pojem mikrobiom a mikrobiota

Lidský mikrobiom je soubor všech mikrobů, které najdeme na lidském těle a uvnitř. Poprvé byl tento termín použit genetikem Joshua Lederbegrem v roce 1946. Lze říci, že lidský organismus se skládá převážně z mikrobů. Uvnitř těla nebo na něm jich žije více než 100 bilionů, což je desetkrát více než kolik máme buněk. Mikrobiom může vážit až 2,3 kg a zahrnuje 99 % buněk [9]. Soubor mikroorganismů, které obývají lidské tělo, jejich genomy a metabolity a také prostředí, ve kterém žijí, se nazývá mikrobiota [14].

Již několik desetiletí se vědci zajímají o mikrobiom a jeho vliv na lidské zdraví. Velký důraz byl kladen na střevní mikrobiom a jeho pozitivní role na lidské zdraví byla dobře prokázána. V současné době se obrací zájem na další druhy mikrobiomů lidského těla. Začínají se objevovat nové poznatky o mikrobiomu plic, ústní dutiny nebo kůže [15].

2.2.2 Střevní mikrobiom

Střevní mikrobiom hraje velmi důležitou roli v udržování homeostázy lidského organismu. Vychýlení od rovnováhy může vést k prozánětlivým imunitním reakcím a iniciaci chorobných procesů [16]. Střevní mikrobiom funguje jako endokrinní orgán, generuje bioaktivní

metabolity, enzymy nebo malé molekuly, které mohou ovlivnit fyziologii hostitele [17]. Gastrointestinální trakt člověka je místem komplexní a dynamické populace mikroorganismů obsahujících převážně bakterie, které mají významný vliv na hostitele během homeostázy, a i v průběhu onemocnění. Výskyt tak velkého počtu střevních bakterií znamená, že lidský organismus je rezervoárem 10x více prokaryotických buněk než eukaryotických [16]. Asi 90 % bakteriální populace ve střevě představují dva bakteriální kmény, grampozitivní *Firmicutes* (*Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.* a *Clostridium spp.*) a gramnegativní *Bacteroidetes* [18].

Střevní mikrofóra se vyvíjí a dozrává během prvních tří let života. Vhodná rovnováha mezi bakteriálními populacemi zajišťuje homeostázu gastrointestinálního traktu [16]. Složení střevního mikrobiomu je však náchylné ke změnám. K poruchám střevní homeostázy může vést mnoho faktorů jako nevhodná strava, stres, gastrointestinální onemocnění, obezita nebo užívání léků [16]. Zdravá střevní mikroflóra musí být správně vyvážená a diverzifikovaná, aby byla zajištěna homeostáza [19]. Zdravá střevní mikroflóra napomáhá organismu podporovat imunitu, povzbuzovat dostupnost živin, zajišťuje vyvážené pH ve střevech, podporuje a udržuje v rovnováze kožní mikrofóru a chrání tělo před patogenními bakteriemi, které by ji mohly ohrožovat [9].

Hlavním důvodem k užívání probiotik je jejich pozitivní vliv na vývoj mikrobioty osidlující organismus tak, aby byla zajištěna vhodná rovnováha mezi bakteriemi nezbytnými pro normální funkci organismu [20]. Kompetitivní vyloučení patogenních mikroorganismů probiotiky může souviset se soutěží o živiny a adhezí ke střevní sliznici. V distální části tlustého střeva je k dispozici pouze omezené množství živin. Probiotika soutěží o živiny a rostou na úkor zbývající střevní mikroflóry [16].

Donedávna se předpokládalo, že [8] aby střevní mikrobiom mohl vykazovat zdraví prospěšné účinky na lidský organismus, musí být bakterie v trávicím traktu životaschopné. Toto tvrzení se s rozšiřujícím poznáním mění. Nedávný výzkum ukazuje, že ani všechny mechanismy, ani klinické přínosy přímo nesouvisí s životaschopností bakterií. Životaschopnost mikrobiomu tedy není nezbytná pro dosažení zdraví podporujících účinků pre/probiotik. Současné vyvíjející se terminologie, které se přidávají do probiotické vědecké literatury, jsou proto postbiotika, synbiotika, nutribiotika (probiotika, které vykazují potenciál pro udržení zdraví), para-probiotika a farmbiotika (obsahují účinné terapeutické nástroje pro lidské onemocnění) [21].

2.2.3 Kožní mikrobiom

Jak už bylo zmíněno výše, hlavní funkcí kůže je chránit organismus před vlivy prostředí a vytvářet fyzickou bariéru. Kůže navíc vykonává další funkce, které zahrnují regulaci tělesné teploty, kontrolu produkce potu, udržování lipidů a vody [22]. Je největší bariérou lidského těla vůči vnějšímu světu a vykazuje fyzikální a chemickou ochranu proti patogenům. Paradoxně si tělo na této bariéře udržuje dynamický a symbiotický vztah s rozsáhlým ekosystémem bakterií, hub, virů, roztočů a archeí – kožním mikrobiomem [23].

Celková plocha kůže u dospělých lidí je obvykle 2 m², pokud ale vezmeme v potaz všechny přídatné orgány (vlasové folikuly, potní a mazové žlázy), opravdová plocha je více jak 10x větší. Poskytuje tak alespoň 30 m² epitelu kde dochází k interakci s množstvím mikroorganismů [24].

Kožní mikroflóru lze definovat jako všechny mikrobiální buňky v oblasti těla, zatímco mikrobiom zahrnuje buňky a jejich genetický materiál [23]. Lidský organismus poskytuje vhodné prostředí pro mikroorganismy a jejich genetický materiál a společně přispívají k imunitní obraně a regulaci. Bakterie produkují peptidové toxiny a volné mastné kyseliny, které odrazují další potenciálně patogenní organismy od osídlení kůže [23]. Kožní mikrobiota zahrnuje dvě hlavní skupiny, a to rezidentní mikroorganismy, které se na kůži nacházejí běžně a které se přizpůsobují a obnovují se v měnícím se prostředí a tranzientní mikroorganismy, které se objeví poté, kdy je kůže vystavena určitému prostředí. Na kůži obvykle přetrvávají několik hodin nebo dnů a obvykle nejsou patogenní [9].

Mikrobiom se začíná utvářet už při porodu a velký vliv na něj má způsob porodu. U novorozenců, kteří přišli na svět přirozeně, převažují vaginální mikroorganismy, jako je *Lactobacillus*, *Prevotella* a *Sneathia*. Zatímco mikroorganismy, které převažují po porodu císařským řezem obsahují *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium*, které se podobají složení kůže dospělých [25]. Rozdíl v mikrobiotě získané při narození může mít dlouhodobější dopad na mikrobiotu, která se vyvine v dětství. Nízká mikrobiální diverzita a nevystavení vaginálním bakteriím u dětí narozených císařským řezem by mohlo způsobit zpoždění ve vývoji jejich imunologických funkcí, což by mohlo částečně vysvětlit jejich větší citlivost na některé patogeny a alergie a zvýšené riziko rozvoje atopické dermatitidy v dětství [26]. Vztahy mezi hostitelem a komenzálními bakteriemi se zakládá časné v postnatálním období prostřednictvím diferenciací regulačních T buněk, které hrají hlavní roli při udržování imunitní homeostázy v periferní tkáni [23].

Většina bakteriálních druhů na povrchu našeho těla je nepatogenní a saprofytická, ale některé se mohou stát patogenními v závislosti na kontextu hostitele [27]. Každá mikrobiální populace má preferované prostředí existence v různých kožních mikroprostředích [22].

Nejvíce zastoupené bakteriální druhy nalezené na lidské kůži patří do čtyř kmenů: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Bacteroidetes* [27]. Existují tři hlavní rody bakterií, které se přizpůsobily životu na naší pokožce a převládají nad jinými mikroby:

- 1) *Staphylococcus* je rod bakterií, které zahrnují minimálně 28 druhů známé jako stafylokoky. Některé druhy sice mohou způsobit nakažlivé nemoci, avšak většina z nich je neškodná. *S. epidermis* je na kůži dominantní, ale objevují se i další, jako je *S. hominis*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*. Jsou to grampozitivní bakterie, které charakterizuje řetízkovité uspořádání. Mají schopnost přežít s kyslíkem i bez něj. Mohou být zodpovědné za tělesný zápach, jsou však důležité při posilování kožní bariéry a uvolňování živin. *S. epidermis* má navíc schopnosti vytvářet enzym, které chrání před některými patogenními bakteriemi., jako je *S. aureus*. Ten může způsobit agresivní kožní infekce a onemocnění toxiny, jako je otrava z potravin či syndrom toxického šoku.
- 2) *Corynebacterium* se nejčastěji vyskytují ve vlhkých a mazových oblastech, jedná se například o *C. accolens*, *C. jeikeium*, *C. amycolatum*, *C. minutissimum* a *C. striatum*. Těmto bakteriím se daří na nejmastnějších částech kůže. Prospívá jim prostředí s vysokým obsahem soli, a některé přežívají na vitamínech z potu. Jisté druhy způsobují chronická kožní onemocnění, jako je erythrasma a fokální keratolýza.

- 3) *Propionibacterium* je rod anaerobních bakterií, které se vyskytují v oblastech s nízkou hladinou kyslíku, v pórech a vlasových folikulech, kde se živí mazem. *P. acnes*, známé jednoduše jako akné, je nejznámější druh těchto bakterií, ale na kůži najdeme také *P. avidum* a *P. granulosum*. Tyto bakterie pomáhají zabránit patogenním bakteriím dostat se do pórů. *P. acnes* navíc produkuje aminokyselinu arginin, které je zdrojem energie pro kožní bílkoviny. Množství této bakterie se zvětšuje v období puberty [9, 28].

Převaha těchto kmenů v určitých oblastech pokožky závisí na mnoha faktorech, jako je úroveň vlhkosti, pH, teplota, obsah mazu nebo na vystavení pokožky UV záření. Voda rovněž hraje důležitou roli při utváření mikrobiomu lidské pokožky, protože je v neustálé interakci s pokožkou, například mytím, hygienickými návyky a praním prádla [27]. Obsah lipidů je klíčovým faktorem ovlivňujícím složení mikrobiomu, které se drasticky mění mezi suchými a mazovými místy [29]. Mazová místa jsou kolonizována hlavně *Cutibacterium* (dříve *Propionibacterium*) a jejich mikrobiomy. Ty jsou obecně méně rozmanité, méně rovnoměrně rozmístěné a méně bohaté než ty z vlhkých oblastí, které obsahují hlavně druhy *Corynebacterium* a *Staphylococcus*. Suchá místa navíc obsahují druhy *Micrococcus*, *Enhydrobacter* a *Streptococcus* [30]. *S. epidermidis* je tradičně považována za jednu z hlavních reprezentativních bakterií mikrobiomu zdravé kůže. Patří mezi nejhojnější druhy kultivovatelného mikrobiomu: až 90 % kultivovatelné aerobní flóry. Nedávné studie prokázaly jeho roli při udržování účinné kožní bariéry in vitro, při hojení ran, v boji proti patogenům, v modulaci imunitního systému a v prevenci melanomu [10]. *Cutibacterium acnes* je také vysoce zastoupená bakterie v mikrobiomu lidské kůže (>50 % bakteriálních druhů podle sekvenačních dat), asi 10^5 bakterií/cm² v mazových oblastech (obličej, pokožka hlavy, záda; bohaté na maz). *C. acnes* degraduje mastné kyseliny s dlouhým řetězcem v kožním mazu na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, včetně kyseliny propionové (nebo kyseliny propanové) prostřednictvím své lipázové aktivity. Kyselina propionová se podílí na zápachu kůže, ale co je důležitější, udržuje pH pokožky a má antimikrobiální vlastnosti [10].

C. acnes se také účastní antimikrobiální obrany prostřednictvím sekrece bakteriocinů nebo antimikrobiálních peptidů, jako je kutimycin. Je spojován a má se za to, že hraje hlavní roli ve zdraví pokožky. Syntetizuje volné mastné kyseliny, jako je vitamín B12, jehož nedostatek může být spojen s hyperpigmentací kůže, vitiligem, peelingem. Biosyntéza vitamínu B12 je u pacientů s akné ve srovnání se zdravými jedinci snížena [10, 31]. *C. acnes* podporuje komedogenezi tvorbou oxidovaného skvalenu a volných mastných kyselin, což vede ke kvalitativní změně kožního mazu [10].

Plísně, viry a roztoči se také nacházejí na kůži, přičemž houby rodu *Malassezia* převažují v seboreických oblastech (části pokožky, kde se nalézají mazové žlázy) [32]. *Malassezia spp.* je nejhojnější houbou v celém těle, s výjimkou míst na chodidlech, která představují větší rozmanitost. Fág *Cutibacterium acnes* je nejvíce zastoupeným virem na různých kožních místech a eukaryotické viry jsou přechodnější [33].

Ve srovnání s jinými biotopy (orální, střevní nebo vaginální) vykazuje kožní mikrobiom největší variabilitu mezi subjekty a vykazuje největší stabilitu v čase [27]. Mezi trvalou a dočasnou populací na kůži existuje dobře vyvážená interakce. Tato rovnováha neustále závisí na vnitřních a vnějších faktorech (včetně životního prostředí), které mění složení mikrobiální

populace na kůži a funkci kožní bariéry hostitele. Změna této rovnováhy je charakterizována jako dysbakteriáza, jejíž výskyt může zhoršit chronická kožní onemocnění jako je atopická dermatitida a psoriáza nebo akné [25]. Dysbakteriázu však lze pozorovat nejen mezi bakteriemi. Nerovnováha mezi bakteriemi a komenzálním plísňovým kmenem na kůži hlavy je pozorována u pacientů s lupy [34].

Existují také rozdíly ve složení kožní mikrobioty, které závisí na pohlaví, fyziologické a anatomické specifičnosti, jako je produkce hormonů, pocení, tvorba kožního tuku, pH a tloušťka kůže [35].

Vnější faktory prostředí nebo vnitřní změny významně ovlivňují složení a funkci kožní mikroflóry, a to buď zachováním nebo poškozením zdravé pokožky [27]. Voda rovněž hraje důležitou roli při utváření mikrobiomu lidské pokožky, protože je v neustálé interakci s pokožkou, například mytím, hygienickými návyky a praním prádla [27].

Kůže je největší bariérou lidského těla vůči vnějšímu světu a vykazuje fyzikální a chemickou ochranu pro ochranu proti patogenům. Paradoxně si tělo na této bariéře udržuje dynamický a symbiotický vztah s rozsáhlým ekosystémem bakterií, hub, virů, roztočů a archeí – kožním mikrobiomem [23]. Jako součást symbiotického vztahu mezi mikroby a lidským organismem poskytuje tělo rozmanité prostředí pro kolonizaci a mikroorganismy a jejich genetický materiál přispívají k imunitní obraně a regulaci. Bakterie produkují peptidové toxiny a volné mastné kyseliny, které odrazují další potenciálně patogenní organismy od osídlení kůže [23].

Jsou také známy dva druhy roztočů o délce 0,2–0,4 mm sídlících na lidské kůži. *Demodex folliculorum* se nachází ve vlasových folikulech ve skupině s jinými roztoči stejného rodu. Malý *Demodex brevis* se vzácně vyskytuje v mazových nebo tarzálních žlázách lokalizovaných na okrajích očních víček [36].

2.2.3.1 Důsledky změny kožního mikrobiomu

Změny v mikroflóře nebo nerovnováha exogenních a endogenních faktorů mohou potenciálně vést k vyvinutí některých dermatologických poruch [37].

Mezi exogenní faktory patří například UV záření. Modré světlo z obrazovek, ale také sluneční paprsky vystavují naši kůži oxidativním stresorům, které hrají velkou roli v předčasném stárnutí kůže. Dalším dopadem pro naši kůži při používání UV záření je poškození DNA mikroorganismů osídlujících lidské tělo, což může změnit existenci a činnost mikrobiálních společenstev, která běžně na kůži sídlí. Dlouhodobé vystavování se UV záření vede ke změně množství, činnosti a šíření mikroorganismů, které podporují zdraví [9 38].

Pokožka se dělí na tři hlavní prostředí: suchá (např. předloktí), vlhká (např. podpaží) a mazová (např. pokožka hlavy). Složení se může během života značně lišit, například v pubertě se zvyšuje hladina lipofilních bakterií a v důsledku toho se také zvyšuje produkce kožního mazu ve srovnání s dospělou pokožkou [23].

Zvýšení pH stratum corneum je spojeno s několika kožními poruchami, jako je akutní ekzém, atopická dermatitida a seboroická dermatitida. U těchto onemocnění by zvýšené pH mohlo nepříznivě ovlivnit kožní funkce a tyto stavy dále zhoršit se závažnějšími klinickými projevy [39].

2.2.3.2 Funkce kožního mikrobiomu

Některé z bakterií žijící na našem těle jsou nezbytné pro zdraví pokožky. Uvolňují antibakteriální látky zabraňující patogennímu osídlení kůže a ovlivňují imunitu [40].

Kůže je charakterizována povrchovým reliéfem s velkým počtem vchlípenin, kapes a výklenků. Každá anatomická mezera zajišťuje vynikající mikroprostředí, kterému se mikroorganismy přizpůsobují. Mikroorganismy jsou „přichyceny“ k určité oblasti těla, a pokud je přemístíme z jednoho prostředí do druhého, například z jazyka na čelo, nebudou schopny kolonizovat nové území nebo změnit stávající mikrobiální komunity v této oblasti [40]. V tomto ohledu se ukázalo, že mikroorganismy na kůži jsou potaženy imunoglobuliny, které s největší pravděpodobností pocházejí ze sekretů potních žláz [40].

Svou roli při růstu mikroorganismů nebo zpomalení jejich progresu může hrát i teplota pokožky těla. Velmi důležité je také konstantní hodnota pH, které se pohybuje mezi 4,2 a 7,9. Při nadměrném používání detergentů může kolísat pH pokožky, což může mít za následek změnu mikrobiomu a podráždění pokožky, zejména na kůži rukou [41].

Také užívání antibiotik, radioterapie a chemoterapie mohou ovlivňovat kožní mikrobiotu [17].

Lidský epidermis žen ve srovnání s mužským vykazuje pestřejší soubor mikrobů, což je způsobeno nižší kyselostí povrchu kůže spolu s užíváním kosmetických přípravků [35].

Topické přípravky modulují kožní mikrobiom především prostřednictvím své antibakteriální aktivity proti *C. acnes* a/nebo *S. aureus*, dvěma hlavním implikovaným mikroorganismům [43]. Kožní mikroflóra může indukovat a aktivovat T lymfocyty, a to jak v bazálním stavu, tak během infekce. Tato interakce s imunitním systémem pomáhá kontrolovat homeostázu kůže a chránit imunitní systém před patogeny [10]. Je dobře známo, že buněčné mediátory produkované *S. epidermidis* modulují produkci různých cytokinů. Kyselina lipoteichoová je hlavní složkou buněčné stěny grampozitivních bakterií, jako je *S. epidermidis*, a také ligandem pro TLR2. Bylo zjištěno, že tato kyselina má protizánětlivý účinek na keratinocyty a stimuluje produkci faktoru keratinocytových kmenových buněk (SCF). Je také rozhodující pro diferenciaci žirných buněk [44, 45].

2.3 Kosmetická péče nové generace

2.3.1 Nové trendy v kosmetice

Zvyšující se zájem společnosti o kožní mikrobiom vedlo k zavedení přídatku probiotických mikroorganismů do přípravků určených pro péči o pokožku a vlasy. Tyto výrobky slibují, že aplikováním tohoto typu mikroorganismů na povrch kůže můžeme odvrátit vznik vrásek, eliminovat tvorbu lupů, zvýšit hydrataci a pomoci při odstraňování pigmentových skvrn. Studie, která zjišťovala přilnavost určitých probiotik ke kožním keratinovým buňkám, došla k závěru, že kmeny *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus* LA-10, *Lactobacillus paracasei* LA-26 a *Bifidobacterium lactis* B-94 a Bb12 lze považovat za benefiční [9]. V tabulce 1 jsou uvedeny základní účinky probiotických mikroorganismů při vnějším a vnitřním podání.

Tabulka 1: Účinky probiotik na zdraví kůže – vnitřní a vnější podání [46].

Probiotikum	Potencionální přínos na základě klinických důkazů
Druhy bakterií <i>Bifidobacteria</i>	Regulace imunity a snižování citlivosti kůže
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Klinické zlepšení akné
<i>Lactobacillus bulgarius</i>	Klinické zlepšení akné
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Regulace či zmírňuje kožní záněty
<i>Lactobacillus delbreuckii</i>	Pomáhá při léčbě atopického ekzému, snižuje citlivost kůže
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Podporuje funkci kožní bariéry, pomáhá při léčbě atopického ekzému
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Pomáhá chránit před vnějšími stresory a UV záření, pomáhá při léčbě atopického ekzému
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Ochrana epidermálních keratinocytů
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Pomáhá při léčbě atopického ekzému

Nejen probiotické mikroorganismy, ale i jejich metabolity a další bioaktivní látky mají pozitivní vliv na stav lidské pokožky. Mezi nejvýznamnější zástupce jsou řazeny:

1. Organické kyseliny (kyselina octová a mléčná), které pomáhají snižovat pH, regulovat záněty a podpořit hydratační vlastnosti pokožky. Hlavními producenty jsou *Lactobacillus acidophilus L-10* a *Lactobacillus paracasei L-26*.
2. Kyselina hyaluronová, která podporuje funkci kožní bariéry, hydrataci a opravu tkáně (*L. rhamnosus FTDC 8313* a *L. gasseri FTDC 8131*).
3. Sfingomyelináza, enzym potřebný pro tvorbu keramidu (*S. thermophilus*).
4. Lipoteichoová kyselina je strukturální součástí bakterie, která stimuluje obranu pokožky a podporuje léčbu zánětu – *L. plantarum KCTC10887BP* [47].

V dermokosmetice je pochopení vztahů mezi chemikáliemi zapojenými do osy hostitel-mikrobiota-prostředí zásadní pro vývoj inovativních řešení na bázi mikrobiomu pro léčbu kožních onemocnění [10]. Vývoj nových metod odběru vzorků kůže kompatibilních s necílenými metabolomickými pracovními postupy výrazně zlepšil charakterizaci chemického složení lidské kůže [48].

Od svého vývoje v roce 2015 se přístup 3D kartografie stala mocným nástrojem pro vizualizaci a integraci rozsáhlých mikrobiomů a metabolomických dat z povrchu kůže a pro rychlé vyhledávání omických prostorových distribucí spojených s různými fenotypy prostřednictvím prostorových korelací mezi molekulárními a bakteriálními distribucemi [49].

Většina kosmetiky je na vodní bázi a pH neutrální nebo mírně kyselá, což lze považovat za příznivé podmínky pro růst mikroorganismů. Současně obsahuje i některé složky, které by mohly ovlivnit životaschopnost probiotik, jako jsou povrchově aktivní látky, chelatační látky, glykoly, konzervanty a vůně. Ochrana kosmetických výrobků před mikrobiální kontaminací a proliferací je samozřejmě bezpečnostním a regulačním požadavkem ošetřením odpovídající legislativou. Udržení probiotik v kosmetických výrobcích naživu a zároveň zabránit růstu nežádoucích mikroorganismů, které by mohly nepříznivě ovlivnit zdraví spotřebitelů je proto

pro výrobce velkou výzvou. Toho lze dosáhnout různými prostředky, jako je zapouzdření probiotik nebo použití vhodného balení, kde jsou živé bakterie uchovávány odděleně a smíchány s přípravkem v době použití [10]. Mikrobiologické limity pro kosmetické přípravky jsou uvedeny v normě Mezinárodní organizace pro normalizaci ČSN EN ISO 17516. Tento dokument uvádí, že ačkoliv kosmetika nemusí být sterilní, mikroorganismy přítomné v produktu by neměly mít nepříznivý vliv na bezpečnost spotřebitele nebo kvalitu produktu. Výrobce proto musí respektovat správnou výrobní praxi a přijmout nezbytná opatření k omezení zavlečení mikroorganismů ze surovin, zpracování a balení. V této normě pro mikrobiologické limity jsou mikroorganismy považovány za kontaminanty, které jsou neúmyslně zaneseny do kosmetického přípravku a jsou stanoveny mikrobiologické limity, aby byla zajištěna kvalita produktu a bezpečnost spotřebitele. Tyto limity by se proto neměly vztahovat na probiotika, což jsou dobře charakterizované mikroorganismy záměrně zaváděné do kosmetických přípravků za účelem dosažení kosmetického přínosu [10].

2.3.2 Probiotika v kosmetice

Probiotika byla poprvé představena v roce 1900 ruským vědcem Iلسou Iljičem Mečnikovem, který byl za svou práci oceněn Nobelovou cenou. Jeho pozorování začalo u bulharských rolníků, kteří žili dlouhý a zdravý život. Toto bylo výsledkem pravidelné konzumace mléka a kvašených mléčných výrobků. Mečnikovova pozdější hypotéza byla, že organismy nacházející se ve fermentovaných produktech mohou předcházet výskytu nebezpečných bakterií. Tím předložil teorii ohledně pozitivních účinků živých mikrobů lidský organismus [50].

Posílení kožní bariéry může být důležité zejména u některých zánětlivých onemocnění, kde je bariérová funkce narušena, jako je atopická dermatitida, suchá kůže nebo stárnutí [40]. Bariérová funkce prochází denně řadou výkyvů v důsledku působení environmentálních, chemických nebo fyzikálních faktorů (UV záření, znečištění, horké a studené teploty, klimatizace, nízká vlhkost atd.), psychického stresu nebo nevyvážené stravy [51].

Některá probiotika mohou přispívat k modulaci kožní mikroflóry, lipidové bariéry a imunitního systému kůže, což vede k zachování homeostázy kůže [52]. Probiotické přípravky pro zdravou péči o pleť, prevenci a léčbu kožních onemocnění a prospěšné účinky proti stárnutí se stávají stále dostupnějšími a představují tak novou oblast pro zdraví pokožky [52].

Zástupci rodu *Bifidobacterium* mohou produkovat vitamín B2 neboli riboflavin. Nedostatek riboflavinu, koenzymu účastnícího se četných redoxních reakcí, mohou vést k poruchám kůže. U dvou kmenů bifidobakterií (*B. infantis* CCRC 14633 a *B. longum* B6) bylo popsáno, že zvyšují hladiny riboflavinu během 48hodinové fermentace v sójovém mléce. Fyziologické a měřitelné změny *in vivo* se projevují při pozitivě množství alespoň 10^8 – 10^9 CFU za den. Imunitní modulační účinky jsou indukovatelné denním požitím 100 g probiotického jogurtu se 10^6 CFU na gram [53]. Zkratkou CFU neboli počet jednotek tvořících kolonie se označují životaschopné, živé a aktivní bakterie, které jsou v produktu při jeho výrobě [9].

Výhody profylaktické terapie (praktických opatření, které mají za následek ochranu před nemocí) probiotiky spočívají ve skutečnosti, že nezpůsobují žádné nežádoucí nebo vedlejší účinky. Probiotika přispívají ke zdraví pokožky a působí okamžitě přes epidermis nebo

nepřímo, když se užívá s doplňky stravy a zlepšuje střevní mikroflóru. Kožní terapii probiotiky lze tedy potenciálně přiblížit jako standardní léčebnou metodu [40].

Při používání probiotik v kosmetice nastává problém jejich aktivity po dobu skladování. Kosmetické přípravky mají většinou vysoký podíl vody, proto je nezbytné použít konzervační látky pro mikrobiologickou nezávadnost a v takovém případě produkty nemohou obsahovat živou kulturu [42]. Jedna z možností, jak tento problém vyřešit, je přidáním lyzátů těchto kultur. Toto řešení jen nenákladné a také nevyžaduje žádné změny v používání konzervantů [42].

Výzkumy vykazují pozitivní vliv lyzátů probiotických kultur *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus paracasei*, *Bacillus subtilis* ve složení kosmetických přípravků pro léčbu atopické dermatitidy [54]. Probiotická bakterioterapie může mít velký potenciál v urychlení hojení ran, v prevenci a léčbě kožních onemocnění včetně ekzémů, atopické dermatitidy, akné, alergických zánětů nebo přecitlivělosti kůže, poškození kůže UV zářením a kosmetických přípravků [22].

Kožní mikroflóra hraje významnou roli při kompetitivním vyloučení patogenů, které jsou agresivní a vyvolávají infekci v kůži, a při zpracování kožních proteinů, volných mastných kyselin a kožního mazu [52].

Probiotika působí příznivě na hostitele prostřednictvím několika různých mechanismů. Znalost těchto mechanismů poskytla užitečný molekulární model pro zaměření na inovativní terapeutické aplikace. Bylo indikováno, že řada imunologických drah je ovlivněna probiotickými mikroorganismy, které zahrnují různé mechanismy. Probiotické účinky mohou být lokální, potenciálně zahrnují snížení permeability a systémové penetrace antigenů nebo změnu lokálního zánětu [55]. Vybrané probiotické kmeny, které stimulují expresi regulačních cytokinů, účinně předcházejí ekzému nebo jej zmírňují [40]. V jiných studiích bylo zmíněno, že přechodná ochrana, kterou probiotika nabízejí proti alergickým onemocněním spojeným s imunoglobuliny IgE, je založena na stimulaci Toll-like receptorů, které produkují mediátory, jako je IL-6, a ty dále indukují diferenciaci protilátky IgA od naivních B buněk [40]. Alergická onemocnění jsou spojena s nerovnováhou cytokinů Th1/Th2, aktivací Th2 buněk a se stimulací syntézy IgE a IgA, což vede k alergickým reakcím [56]. Probiotika inhibují odpověď Th2 lymfocytů a zároveň stimulují produkci cytokinů Th1 a Th1, jako je interferon γ [56]. Lze konstatovat, že mechanismus působení probiotické střevní flóry na kůži představuje změny v systémových imunitních odpovědích. Hlavním faktorem může být zejména modulace specifických podskupin T-buněk, jako je stimulace buněk Th1 ve střevní sliznici, která může následně ovlivnit imunitní reakce v jiných tkáních [40].

Nedávné studie prokázaly úspěšný pokrok prebiotického kosmetického přístupu k vyrovnání složení kožní mikroflóry. V těchto studiích byla kožní mikrobiota analyzována metodou fluorescenční hybridizace *in situ*. S využitím této metody metodě se vyhneme nevýhodám kultivačních metod a je umožněno přímé pozorování bakterií [39].

Lze říci, že působením probiotik je možné zlepšit složení kožní mikroflóry, omezit růst patogenních druhů a také současně zachovat a stimulovat růst prospěšných bakterií. V souladu s tím je takový probiotický kosmetický přístup zjevně výhodnější než antibakteriální kosmetické produkty, které neselektivně snižují růst bakterií pomocí antibiotik nebo antimikrobiálních látek [40].

Bylo pozorováno, že při aplikaci kosmetického přípravku s obsahem vybraných rostlinných výtažků z ženšenu, černého rybízu nebo borovice dvakrát denně na lidskou pokožku po celkovou dobu tří týdnů, bylo účinné v prevenci růstu *P. acnes* [57].

Probiotika představují užitečný terapeutický nástroj pro prevenci epidermálního oxidačního stresu buď topickou cestou nebo požitím [52]. Schopnost probiotik působit jako antioxidant lze přičíst přítomnosti antioxidantních enzymů, jako je superoxidodismutáza, která přeměňuje superoxidové radikály na méně toxický peroxid vodíku, dále také glutathion peroxidáza, které tento peroxid vodíku přeměňuje na vodu a molekulární kyslík [58]. Vzhledem k úloze oxidu dusnatého (NO) při zánětlivých stavech, *L. brevis* (s arginindeiminázou) metabolizuje arginin na citrulin a amoniak a následně může inhibovat tvorbu NO, tím že bude soupeřit s oxidem dusnatým syntázou (NOS) o stejný substrát, arginin [40].

Několik randomizovaných kontrolovaných studií poukázalo na pozitivní vliv synbiotik a prebiotik na průběh atopické dermatitidy u starších dětí, kdy bylo zjištěno, že u obou skupin došlo k významnému snížení skóre RAD (závažnost atopické dermatitidy) po třech měsících [40].

2.3.2.1 Nové trendy probiotik

V současné době se v kosmetických výrobcích začínají objevovat filtráty, fermenty nebo lyzáty buněk probiotických mikroorganismů. Pro některé z těchto látek bylo zavedeno označení postbiotika.

V případě filtrátů jsou bakteriální buňky (nezáleží, jestli živé nebo mrtvé) odstraněny spolu s potenciálně s dalšími molekulami s větší hmotností (např. peptidy). Tento krok by mohl odstranit některé bioaktivní sloučeniny z přípravku nebo složky bakteriálních buněk potřebných k pozorování probiotických přínosů. Proto jsou filtráty vyloučeny z definice postbiotik a nelze je považovat za probiotické.

Lyzáty jsou buňky, jejichž vnější membrána byla narušena v důsledku chemických nebo fyzikálních procesů [59, 60]. Mohou obsahovat bakteriální složky, které regulují imunitní odpověď hostitelských buněk; jsou zvláště účinné při léčbě infekcí dýchacích cest [61]. Při používání probiotik je také důležitá místní aplikace produktu. Například perorální užití probiotik ovlivňuje střevní mikrobiom, což následně vede k potenciálnímu zlepšení kožních onemocnění [62].

Nejvíce používaným způsobem, jak zpracovat probiotika je lyofilizace. V závislosti na použití ochranném prostředku proti vysychání se však konečná životnost může lišit. Nejvíce používanými látkami jsou odstředěné mléko, sérum, trehalóza, glycerol, betain, adonitol, sacharóza, glukóza, laktóza a polyethylenglykol [59]. Mikroenkapsulace se používá prodloužení trvanlivosti a životaschopnosti probiotik. Primárně má zajistit, aby organismy odolávaly extrémnímu prostředí trávicího systému, ale často se používá i v topických přípravcích [63].

Z bezpečnostních důvodů se předpokládá, že kosmetické přípravky budou mít nízký obsah mikroorganismů (pod 500 jednotek tvořících kolonie (CFU)/g pro přípravky na oblast očí a 1000 CFU/g pro zbytek pokožky) [59].

2.3.3 Termín „-biotika“

Probiotika jsou definována Organizací pro výživu a zemědělství Spojených národů a Světovou zdravotnickou organizací jako „živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v přiměřeném množství, prospívají hostiteli“ [64]. Aby byl produkt považován za probiotický musí splňovat tři základní kritéria. Prvním kritériem je celkové genotypová i fenotypová charakteristika kmenů, která musí být podložena řadou zdokumentovaných experimentů. Dále výrobek musí v době použití obsahovat dostatečné množství živých mikroorganismů, které jsou ekvimolární tomu, kdy bylo v klinických studiích prokázáno, že přípravek prospívá požadovanému cílovému místu. A poslední kritérium se vztahuje na způsob podání, dávkování a délku užívání, které by měly být založeny na vědeckých důkazech u lidí, pokud jsou zamýšlenými příjemci [59].

Dnes nejběžněji dostupné, a proto nejvíce prostudovanými probiotickými kmeny jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacteria*. Ty lze nalézt v celé řadě produktů, od fermentovaných mléčných výrobků přes pilulky, prášky až po topické přípravky [65].

Probiotika mají několik zdravotních výhod spojených s tím, že modulují střevní mikrobiom. Technická omezení, jako jsou kontroly životaschopnosti, však brání jejich plnému potenciálnímu využití v potravinářském a farmaceutickém odvětví. Proto se pozornost postupně přesouvá od životaschopných probiotických bakterií k neživotaschopným paraprobiotikům a/nebo biomolekulám odvozeným od probiotik, tzv. postbiotikům.

2.3.4 Prebiotika

Koncept prebiotik se začal uplatňovat v 80. letech 20. století, kdy díky raným zprávám a pozorováním bifidogenních vlastností inulinu, oligofruktózy, fruktooligosacharidů a oligosacharidů obsahujících galaktózu a xylózu [65]. Termín prebiotika byl oficiálně zaveden jako „nestavitelná složka potravy, která příznivě ovlivňuje hostitele tím, že selektivně stimuluje růst a/nebo aktivitu jedné nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě, a tím zlepšuje zdraví [65]. Nejčastěji využívané prebiotické sloučeniny jsou inulinového typu – fruktany a galaktooligosacharidy.

Bylo zjištěno, že kombinace pre- a probiotik, tedy synbiotika mají synergický účinek na střevní mikroflóru [26]. V dermatologii bylo navrženo použití pre-, pro- a synbiotik u několika onemocnění, včetně atopické dermatitidy, akné, růžovky a hojení ran [66].

Zvyšující se veřejné povědomí a poptávka po „přírodních“ lécích vyvolalo vzkvétající trh kosmetických produktů na bázi mikrobiomu. Jak je běžné u volně prodejných produktů, na podporu jejich tvrzení je publikováno málo vědeckých poznatků, avšak bylo prokázáno, že probiotika mají antioxidační vlastnosti, které mohou být přínosem při snižování poškození UV zářením a podpoře hydratace pokožky a ztlustění pokožky [26].

2.3.5 Paraprobiotika

Nejen živé mikrobiální buňky mohou ovlivňovat naše zdraví. V současné době jsou diskutované dva pojmy, a to paraprobiotika a postbiotika. Paraprobiotika, neboli „ghost probiotics“, jsou inaktivované mikrobiální buňky probiotik (neporušené nebo rozbité obsahující buněčné složky, jako jsou peptidoglykany, teichoové kyseliny, povrchové proteiny atd.) nebo surové buněčné extrakty (tj. se složitým chemickým složením) [67, 68].

2.3.6 Postbiotika

Termín postbiotický označuje látky získané poté, co mikroorganismy již nejsou živé, nebo jinými slovy neživé, mrtvé nebo inaktivované. Velkou část tvoří metabolity z lyzátů pocházejících z mikroorganismů, které jsou produkovány exogenně do kultivačního média a dále separovány [69].

Jsou to strukturní a metabolické mikrobiální produkty, které zahrnují bezbuněčné supernatanty, fragmenty buněčných stěn, kyselinu teichoovou, mastné kyseliny s krátkým řetězcem, vitamíny, enzymy, exopolysacharidy, různé peptidy, aminokyseliny a vedlejší produkty fermentace [69, 70]. Jako postbiotika jsou obecně označovány funkční bioaktivní sloučeniny produkované v matrici během fermentace, které lze použít k podpoře zdraví [71]. Nejčastěji jsou odvozeny od bakterií mléčného kvašení, rodů *Lactobacillus* a kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* [69]. Postbiotika přecházejí od metabolitů, jako jsou kyseliny teichoové, k polysacharidům a vykazují důležité biologické vlastnosti, jako jsou antioxidační, protizánětlivé, antiproliferativní a imunomodulační [69].

Tyto postbiotické složky jsou produkovány probiotiky, při jejich dlouhodobém skladování nebo zpracování, jako je pasterizace, pečení nebo během metabolických procesů [24]. Postbiotikum musí vycházet z přesně definovaného mikroorganismu nebo kombinace mikroorganismů, pro které jsou známy genomové sekvence a připraveny pomocí naznačeného technologického procesu produkce a inaktivace biomasy, který lze spolehlivě reprodukovat [72].

Postbiotická složky, které se často objevují v kosmetických produktech lze rozdělit to tři skupin:

- 1) Fermenty, lyzáty, extrakty, filtráty nebo jakákoli kombinace těchto složek, které nejsou živé, ale byly získány pomocí probiotických bakterií (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Vitreoscilla*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc*) nebo plísní používaných především jako facilitátory fermentace (*Saccharomyces*, *Candida bombicola*, *Kloeckera*, *Hansenula-Pichia*, *Aspergillus*)
- 2) Neživotaschopné mikroorganismy (inaktivované/tepelně usmrcené), většinou bakterie tvořící kyselinu mléčnou: *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus (paracasei, casei, acidophilus)*, *Lactococcus* nebo *Vitreoscilla filiformis*.
- 3) Metabolické produkty/vedlejší produkty (izolované) včetně extraktu bakteriocinu, ektoinu, kyseliny jantarové, kyseliny mléčné, hydrolyzovaného jogurtového proteinu, hyaluronátu sodného a mléčných proteinů [8].

Postbiotika mají protizánětlivé, antioxidační a protirakovinné vlastnosti [46]. Je vhodné je podávat pacientům s oslabenou imunitou, u kterých nejsou povolena živá probiotika [69]. Také mohou působit jako alternativa pre/probiotik, zvláště u imunosuprimovaných pacientů, dětí a předčasně narozených novorozenců [24]. Dále modulují imunitní odpověď, genovou expresi, inhibují vazbu patogenů, udržují střevní bariéry, pomáhají při kontrole karcinogeneze a patogenních infekcí [24].

Velkou výhodou postbiotik je jejich lepší trvanlivost, ve srovnání s probiotiky, protože není vyžadována žádná životaschopnost v topickém přípravku. Další výhody jsou spojené s jejich specifickým působením na rezidentní mikrobiotu [73]. Například kyselina lipoteichoová, která

je součástí buněčné stěny grampozitivních bakterií, vykazuje imunomodulační účinek v různých typech buněk (tj. lidských monocytových THP-1-buňkách, lidských HT29 buňkách a surových 264,7 makrofágech) což, i když nebyla provedena žádná předložená studie na kožních buňkách, může naznačovat potenciální přenos těchto výhod do kosmetických aplikací péče o pleť. Dále tato kyselina vykazuje určité schopnosti vyvolat různé účinky, jako je anti-ageing, tedy pozitivní působení proti stárnutí pokožky. [74]. Dalším významným aspektem postbiotického výzkumu je jejich vlastní stabilita, a to jak během průmyslových procesů, tak během skladování. Protože postbiotika nejsou schopna replikace, jsou bezpečnější než probiotika. Nejsou tedy schopny způsobit rizika spojená s probiotiky, jako je bakteriémie, fungémie atd. [75].

Nejvíce je prozkoumaná bakterie *Lactobacillus*, která se i nejčastěji používá k produkci postbiotik a mezi její přínosy spadá hydratace pokožky, zvýšení elasticity a lesku pokožky a snižující rozsah vrásek v kůži [76]. Laktobacily a další mikroby produkují různé typy homo- a hetero-polysacharidů, jako je kefricin, β -glukany, kyselina uronová atd. Jedná se o skupinu označovanou jako exopolysacharidy, které se uvolňují buď extracelulárně, nebo zůstávají pevně připojeny jako kapsle nebo volně jako slizová vrstva na povrchu mikrobiálních buněk [77]. Tyto makromolekuly poskytují nejen ochranu mikroorganismům před fágů, fagocyty a toxickými sloučeninami, ale ovlivňují také imunitu hostitele, fyziologické mechanismy, metabolismus lipidů a kolonizaci patogenů [24]. Bylo prokázáno, že extrakt *Lactobacillus acidophilus* in vitro vylučuje reaktivní formy kyslíku po UVB-indukovaném oxidativním stresu v keratinocytech [78]. Některé bakteriální extrakty (*Bacillus coagulans*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. plantarum* a *L. acidophilus*) mají antimikrobiální vlastnosti, které mohou podporovat hojení kůže. Lyzáty *Lactobacillus plantarum* a *L. salivarius* urychlily reepitelizaci indukci migrace keratinocytů [79]. Lyzáty *L. rhamnosus* zlepšily funkci kožní bariéry v rekonstruované lidské epidermis a extrakty *S. thermophilus* byly schopny zvýšit produkci ceramidů a zlepšit hydrataci kůže.

Extrakt *Vitreoscilla filiformis* prostřednictvím aktivace TLR2 posílil vrozenou imunitu a bariérovou funkci, což vedlo ke snížení symptomů spojených s atopickou dermatitidou a seboroickou dermatitidou [80]. *C. acnes* je schopna přeměnit glycerol na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, jako je kyselina propionová a její deriváty, které naopak inhibují růst meticilin-rezistentní *S. aureus* [81]. Kyselina propionová nakonec pomáhá udržovat hodnotu pH, což inhibuje kolonizaci patogenními mikroby, jako je *S. aureus*. *C. acnes* je známo, že specificky produkuje enzym zvaný RoxP, který má antioxidační aktivitu a hraje důležitou roli při udržování redoxní homeostázy na lidské kůži [82]. Vyrábí se různé antimikrobiální sloučeniny, které spadají do dvou kategorií nízkomolekulárních (tj. peroxid vodíku, oxid uhličitý a diacetylen) a vysokomolekulárních (tj. bakteriociny a bakteriocinům podobné látky) sloučenin, které jsou známé jako postbiotika [24].

Používá se několik způsobů přípravy postbiotik, vždy ale vychází ze základních kroků, jako je růst bakteriálních kmenů, jejich následné promytím a resuspendováním buněk, rozrušení buněk a konečné centrifugace média [69]. Bakteriální kmeny se pěstují v modifikovaných médiích a za přesně definovaných podmínek (teplota, čas, množství doplňku atd.). Zpracování buněčného materiálu se liší podle toho, kde se cílová látka nachází. Pokud je naším cílem pouze intracelulární obsah, tak buňky oddělíme centrifugací a buněčné pelety se obvykle alespoň třikrát promyjí tlumivým roztokem nebo deionizovanou vodou a poté se rozruší metodami, jako

je ultrazvuk, vysoká tlaková homogenizace a použitím metody french press [69]. Pro udržení extracelulárních metabolitů se promývání buněk neprovádí, pokud je cílem pouze supernatant (extracelulární metabolity) nebo supernatant spolu s intracelulárním obsahem. Není-li cílem intracelulární obsah, neprovádí se ani buněčná disrupce. Nicméně ve všech scénářích musí být konečným krokem střední centrifugace k odstranění intaktních buněk a/nebo buněčných zbytků [83]. Jako používané substráty pro výrobu postbiotik mohou být různé zdroje cukrů. Ve výzkumné studii [84] testovali několik proměnných (teplota, inkubační doba a koncentrace kvasnicového extraktu) k optimalizaci fermentačního procesu pro koprodukcii postbiotik (konjugovaná kyselina linolová, exopolysacharidy a bakteriociny) *Bifidobacterium lactis* BB12 v sýrové syrovátce [84]. Kromě sýrové syrovátky byly jako substráty při výrobě postbiotik uváděny také mléčné permeáty a lignocelulózová biomasa [85]. Vzhledem k tomu je třeba vážně zvážit použití substrátů získaných ze zemědělských a průmyslových činností, protože jsou hojné, levné a obnovitelné. Jejich využití má potenciál výrazně snížit výrobní náklady na surovinu a zároveň minimalizovat hromadění odpadu. Jako možné zdroje živin jsou uváděny kukuřičný výluh, sladový odpad, sójová moučka, bavlníková semena, pšeničné a rýžové otruby a rybí odpad [86].

Co se týče průmyslové výroby postbiotik, mnoho firem má obvykle vlastní patentovaný fermentační postup. Podle společnosti Bio Component Research jsou Dermaspring IQ, Dermaforce IQ, Elastiflex IQ, Royal Tea IQ a Gentleguard IQ (všechny postbiotika) vyráběny patentovaným fermentačním roztokem (Bio-Hacked BCRTM), který kombinuje probiotika přátelská biomu, *Lactobacillus plantarum* a *Saccharomyces boulardi* s prebiotickými superpotravinami. Ve společnosti Chemisches Laboratorium Dr. Kurt Richter GmbH, Repair Complex CLRTM PF, se postbiotický produkt získává fermentací *Bifidobacterium longum*. Po ukončení růstu jsou bakterie dezintegrovány pomocí ultrazvuku, přičemž se uvolňují frakce cytoplazmy a složky buněčné stěny. Po rozpadu buněk nejsou izolovány žádné buněčné frakce, čímž je zajištěna přítomnost všech složek v jejich přirozené distribuci v produktu. Průmyslově je také trendem využití diferencovaných substrátů mikroorganismů, cukrů a metabolitů, kromě běžného používání kultivačních médií a čistých kultur. Příkladem je gel TR-PRP plus-Celsi, ve kterém jsou hlavními účinnými složkami různá postbiotika, jako je plantaricin A a včelí chléb *Lactobacillus kunkei* (fermentovaný produkt a postbiotikum). Dalším příkladem je postbiotický Lactobiotyl® od Silab, cyklické polyoly pinitolového typu produkované jojobovou fermentací *Lactobacillus arizonensis* [83]. Tyto dva příklady ukazují, že existuje možnost použití různých substrátů k produkci postbiotik, jako jsou fermentované produkty, nebo dokonce použití jiných zdrojů cukrů pro krmení fermentačních účelů [69].

Postbiotické doplňky ještě nejsou tak široce dostupné, ale ukazuje se, že jejich použití je ve srovnání s probiotiky vhodnější zejména s ohledem na čistotu, snadnou přípravu, skladovatelnost, schopnost hromadné výroby, přesné působení a cílenější reakce prostřednictvím specifických interakcí ligand-receptor [87].

2.3.6.1 Vliv postbiotik na kůži

Co se týče kožního mikrobiomu a jeho funkce, bylo prokázáno, že některá postbiotika respektují rovnováhu mikrobioty a obnovují integritu kožní bariéry. Jiná postbiotika prokázala antioxidační aktivitu a zlepšenou UV ochranu (UV záření je hlavní příčinou oxidačního stresu

a stárnutí kožních buněk), což zpomaluje proces stárnutí kožních buněk. Některá také vykazují antimikrobiální aktivitu s potenciálem bojovat proti některým kožním onemocněním, u nichž se předpokládá vliv mikrobioty (např. *acne vulgaris*, infekční onemocnění pokožky hlavy) [69]. U některých produktů (tj. LactoSporin® od Sabinsy) byla prokázána antioxidační aktivita a bylo zjištěno, že chrání kožní buňky před UV-indukovanou apoptózou a buněčnou smrtí [76]. Další studie, která se zabývala LactoSporin®, tvrdí, že tento přípravek zlepšuje zánět kůže na otevřených i uzavřených komedonech (malé hrbolky, které často vyskytují na čele a bradě u lidí s akné) a zlepšuje další příznaky zánětu, jako je textura kůže a zarudnutí [76].

Další produkty (tj. Ecobiotys® od Silab) na bázi kvasnicového extraktu obohaceného o biopeptidy z *Metschnikowia reukaufii* jsou identifikovány jako produkty, které specificky znovu ekvilibrují mikrobiotu zralé pleti a obnovují tak funkci imunitní kožní bariéry [83].

Pokud jde o antimikrobiální aktivitu proti patogenům, bylo prokázáno, že LactoSporin® inhibuje různé kožní patogenní bakterie, jako je *Pseudomonas aeruginosa*, oportunní patogen, a *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, dva nejvýznamnější kožní patogeny. Největší inhibiční účinek byl prokázán proti *Cutibacterium acnes*, bakteriím způsobujícím akné, vykazující minimální inhibiční koncentraci (MIC) 4 % [76].

Další prokazatelně účinná postbiotika, jako je TR-PRP plus Celsi gel, se ukazují jako řešení k léčbě dermatologických onemocnění, jako je Alopecie areata, kde je u subjektů léčených přípravkem pozorováno výrazné zlepšení opětovného růstu vlasů [88].

2.3.6.2 Antioxidační potenciál probiotik a postbiotik

Probiotické bakterie a postbiotika lze dnes považovat za nový zdroj přírodního antioxidačního potenciálu a lze je využít pro biotechnologické aplikace, konkrétně pro léčiva, nutraceutika a kosmetické produkty [89].

V dnešní době je pro člověka prospěšná gastrointestinální mikrobiota vystavena negativním účinkům konzervačních látek a dalších látek s antimikrobiálním účinkem, které se dostávají do trávicího systému potravou. Také antibiotická terapie, ozařování a chemoterapie narušuje rovnováhu střevní flóry [90]. Také stres z okolního prostředí a každodenní stres mohou mít vliv na zastoupení kožních mikrobů [89]. Oxidační stres je patologický stav, při kterém ROS (reaktivní formy kyslíku) překonají antioxidační obranu těla, což vede k oxidační modifikaci biologických makromolekul (tj. lipidů, proteinů, DNA), poškození tkání a urychlené buněčné smrti jako základ mnoha onemocnění [91].

U mnoha probiotických kmenů byla na různých zvířecích modelech prokázána vysoká antioxidační vlastnosti a ochranná aktivita před oxidativním stresem v různých orgánech a tkáních [92]. Probiotické bakterie projevují svůj vlastní antioxidační obranný systém především díky odstraňování volných radikálů syntézou enzymů, peptidů a thiolů [93].

2.4 Metody identifikace probiotických mikroorganismů

Základem analýzy mikroorganismů, a to nejen v potravinových výrobcích, jsou mikrobiologické metody nebo metody molekulární biotechnologie, kde je cílem získat templátovou DNA, která je následně analyzována [93].

2.4.1 Fenotypové metody

Fenotypové metody jsou stále nejvyužívanějšími metodami identifikace v potravinově založených mikrobiologických laboratořích. Tato metoda je založena na morfologické a fyziologické charakterizaci, fermentaci karbohydrátů a analýze profilů proteinů. Fyziologické testy se nejčastěji doplňují o komerční fermentační metody stanovení sacharidů. I přes široké použití těchto metod, studie ukázaly, že tato metoda má i své limity. Mezi které patří například malá reprodukovatelnost nebo nízké taxonomické rozlišení. Proto se v současné době používají převážně molekulárně diagnostické metody [93, 94].

2.4.2 Morfologické metody

Morfologická metoda popisuje bakterii podle morfologie buňky. Nejvýznamnějšími a nepoužívanějšími druhy barvení je barvení dle Grama, endospórické barvení a barvení pouzder, které se používají pro rozlišení probiotických bakterií. Následně pomocí mikroskopického pozorování je vyhodnocena velikost, tvar a uspořádání bakterie, které se provádí během růstu za určitých podmínek. Výsledkem metody je identifikace rodu a čistoty bakterie [95].

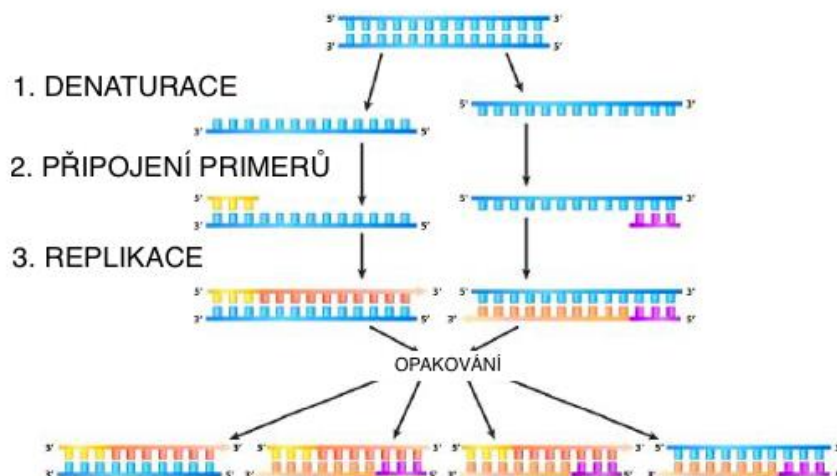
2.4.3 Molekulárně diagnostické metody

Molekulární metody jsou založené na objevování a vytvoření specifických primerů řazené na ribozomální sekvenci 16S – 23S rRNA. Tyto primery jsou dále používány pro specifické určení rodu a kmene zkoumaného vzorku. Sekvenování 16S rRNA je považován za nejlepší standard, který je využíván zejména k získání informací taxonomie, převážně na druhové úrovni. Základním požadavkem pro správnost molekulárních metod je izolace kvalitní DNA [96].

2.4.3.1 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Polymerázová řetězová reakce je enzymová metoda sloužící k rychlé syntéze velkého množství definovaného úseku DNA *in vitro*. Tato metoda, podobně jako molekulové klonování, umožnila řadu experimentálních přístupů, jež byly dříve neproveditelné a počet aplikací PCR neustále vzrůstá. PCR nachází uplatnění při syntéze fragmentů DNA na základě chromosomální DNA nebo cDNA (DNA uměle získaná reversní transkripcí mRNA) například při detekci infekčních mikroorganismů (MO) v potravinách, mapování genomu, kontrole výrobků (např.: zjišťování geneticky modifikovaných mikroorganismů (GMO)), průkazu identity v kriminalistice atd. [94].

Podstatou PCR je cyklicky se opakující syntéza určitého úseku DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím termostabilní DNA polymerázy. K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA se hybridizují (připojují) krátké syntetické oligonukleotidy (primery), od nichž probíhá syntéza nového řetězce DNA. PCR reakce probíhá v opakovaných cyklech. Každý z cyklů se skládá ze tří pravidelně se střídajících kroků. Jednotlivé kroky se od sebe liší reakční teplotou a časem, během nichž probíhají tři odlišné děje (Obrázek 2) [97].



Obrázek 2: Jednotlivé kroky v polymerázové řetězové reakci (převzato a upraveno [99])

Prvním krokem je denaturace, kdy obvykle při 95 °C dojde k uvolnění vodíkových můstků a z dvouřetězcové DNA (dsDNA) vzniknou dvě jednořetězcové DNA (ssDNA). Následuje annealing – připojení (hybridizace) primerů k templátové ssDNA. Tím dojde k ohraničení cílové sekvence, která bude amplifikována. Tento krok probíhá při teplotě 50 až 65 °C. Ta závisí na bodu tání primerů (T_m), jejich délce a nukleotidové sekvenci. U tohoto kroku je nutné provést optimalizaci. Poté následuje poslední krok, syntéza nového vlákna DNA (vznik dsDNA), tzv. elongace. Probíhá obvykle při teplotě 72 °C a kromě DNA-polymerasy jsou nutné všechny čtyři 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTPs – adenin, guanin, cytosin a thymin). Složení reakční směsi můžeme vidět v tabulce 2 [99].

Aby PCR reakce probíhala správně, musí směs pro PCR nezbytně obsahovat DNA templát, primery, teplotně stabilní DNA polymerázu a deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs) (Tabulka 2).

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro PCR a jejich funkce [100]

PCR pufr	vytváří optimální prostředí pro DNA polymerázu obsahuje ionty Mg^{2+} , které jsou potřebné pro enzymatickou aktivitu <i>Taq</i> DNA polymerázy
PCR voda	používá se na doplnění PCR směsi do požadovaného objemu
dNTP	deoxynukleosidtrifosfáty představují základní kameny pro výstavbu nového řetězce DNA standardní obsahuje ekvimolární množství každého nukleotidu dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Oligonukleotidové primery	komplementární k templátu DNA, sekvenčně specifické, nesmí být vůči sobě komplementární, obsahují 18-25 nukleotidů
Matrice DNA (templát)	makromolekula DNA pro syntézu nových řetězců DNA, obsahuje cílová místa pro primery
Termostabilní DNA-polymeráza	syntetizuje nový řetězec DNA podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci templátu DNA od místa navázání primeru

Správný průběh reakce se sleduje systémem kontrol. Ty nám mohou indikovat např. kontaminaci PCR komponent (negativní kontrola) nebo funkčnost všech složek reakce (pozitivní kontrola). Aby nedocházelo ke křížovým kontaminacím, je potřeba mít od sebe oddělené prostory pro izolaci DNA, přípravu reakční směsi (nejlépe laminární box) a manipulaci s PCR produkty, včetně samostatných pomůcek pro každou z těchto činností. Tyto místnosti by se měly pravidelně dekontaminovat UV světlem [98].

Přesnost a úspěšnost PCR reakce závisí na pečlivém návrhu obou primerů. Při návrhu primerů je proto třeba se řídit několika důležitými pravidly, mezi něž patří:

- délka zpravidla 18-25 nukleotidů,
- teplota tání primeru alespoň 50 °C,
- rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry,
- podobná teplota tání u obou primerů,
- obsah G + C 40 % až 60 %,
- specifčnost primerů – na templátové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa [101].

Výsledným produktem PCR reakce jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp [101].

K analýze produktů polymerázové řetězové reakce mohou být použity různé metody, např. hybridizace, ELISA nebo sekvenční analýza. Avšak snadná, levná a asi nejužívanější je separace ampliconů pomocí agarózové gelové elektroforézy (ELFO). PCR produkty migrují agarózovým gelem na základě jejich záporného náboje od katody ke kladně nabitě anodě, rychlost pohybu molekul DNA je nepřímě úměrná logaritmu jejich velikosti. Amplicony jsou obarveny např. ethidium bromidem (barvivo interkalující se mezi vlákna dsDNA). V ultrafialovém světle obarvený fragment DNA oranžově fluoreskuje. Bezpečnější alternativou ke karcinogenní, mutagenní a teratogenní látce ethidium bromid je barvení PCR produktů pomocí látky Midori Green, která emituje zelenou fluorescenci [98].

Polymerázová řetězová reakce je používána v široké škále variant, které jsou upraveny podle účelu analýzy. U mnohonásobné multiplex PCR je možná detekce více genů v jedné reakci současně. Podle počtu požadovaných ampliconů, obsahuje master mix počet párů primerů. Primery musí být navrženy tak, aby se výsledné PCR produkty daly odlišit svou velikostí nebo byly značeny různými fluorofory (u real-time PCR). Tato varianta PCR je výhodnější než provedení samostatných amplifikací, zejména z hlediska časového i ekonomického (ušetření komponent reakční směsi). Avšak optimalizace metody je náročnější než s jednou sadou primerů. Obecně platí, že jsou amplifikovány maximálně 4 různé cílové sekvence pro zajištění adekvátní citlivosti, specifčnosti a snadné interpretace dat.

Dále se používají metody odstupňovaná PCR, reverzní PCR, in situ-PCR, interrepetitivní (repetitivní) PCR (REP-PCR), náhodná PCR (RAPD) [98]. Pokrok v technologii nové generace sekvenování (NGS) navíc v poslední době přinesl nové změny do mikrobiologického výzkumu. V minulých mikrobiologických studiích byla mikrobiální identifikace možná pomocí konvenčního Sangerova sekvenování pomocí bakteriálního genu 16S rRNA. Na druhé straně lze technologii NGS použít k získání genomů mnoha mikrobů (nazývaných metagenom), včetně kultivovatelných a nekultivovatelných mikroorganismů [102]. Mikrobiální klasifikace založená na NGS byla aplikována na různé studie mikrobiomů, což vedlo k významným

biomedicínským nálezům. Technologie sekvenování metagenomu má však určité problémy. Například je to drahé a časově náročné, pokud je účelem detekce specifických mikroorganismů. Z těchto důvodů se k provedení rychlé mikrobiální detekce pomocí kvantifikace cílového genu z klinických vzorků odebraných účastníkům obvykle používá real-time PCR [102].

Polymerázová řetězová reakce je nejpoužívanější amplifikační technika. Má však i svá omezení. Její citlivost je tak vysoká (umožňující detekci jediné buňky), že u kontaminovaných vzorků se mohou vyskytnout falešně pozitivní reakce. Naopak v přítomnosti kontaminujících látek, které PCR inhibují, může dojít k falešně negativní reakci [99].

2.4.3.1.1 Inhibitory PCR reakce

Technika PCR umožňuje teoreticky detekovat jednu jedinou buňku či molekulu DNA. Správný průběh reakce ale může být narušen přítomností celé řady inhibitorů.

Inhibitory PCR jsou jakýkoli faktor, který brání amplifikaci nukleových kyselin prostřednictvím polymerázové řetězové reakce. Inhibice PCR je nejčastější příčinou selhání amplifikace, pokud je přítomno dostatečné množství kopií DNA. Inhibitory PCR obvykle ovlivňují PCR prostřednictvím interakce s DNA nebo interferencí s DNA polymerázou [103]. Za snížení citlivosti či úplné selhání reakce mohou být zodpovědné bakteriální enzymy (nukleázy, proteázy), polysacharidy, proteiny, lipidy a další složky potravin (např. ionty Ca^{2+} u mléčných výrobků, myoglobin u masných výrobků), složky kultivačních médií, detergenty, antibiotika, aj. [100].

Inhibitory mohou uniknout odstranění během procesu čištění DNA vazbou přímo na jednovláknovou nebo dvouvláknovou DNA. Alternativně je PCR inhibována snížením dostupnosti kofaktorů (jako je Mg^{2+}) nebo jiným zásahem do jejich interakce s DNA polymerázou. Inhibitory reakce mohou být již součástí vzorku nebo mohou být přidány do vzorku při zpracování vzorku (izolaci DNA) [104].

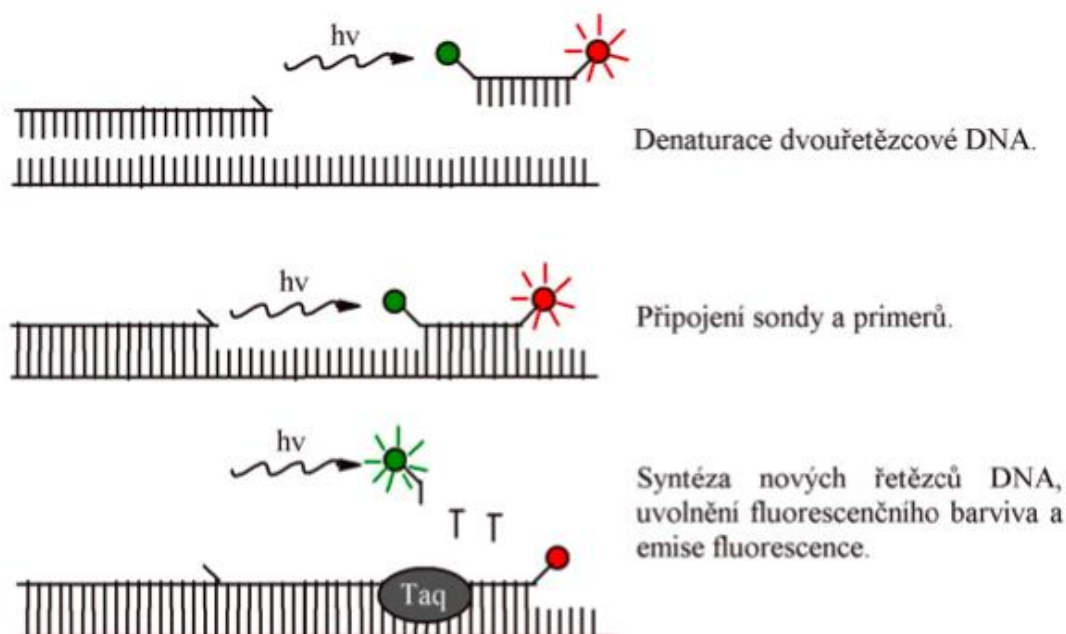
K inhibici dojde snáze, pokud je nízká koncentrace templátové nukleové kyseliny a pokud se tvoří dlouhý amplikon nebo amplikon s nižším obsahem G+C bazí. U real-time PCR může být inhibován také fluorescenční signál. Tyto nežádoucí vlivy se mohou projevit jako falešně negativní výsledek [100].

Dalším z faktorů ovlivňujících přesnost výsledku PCR je teplota. Jelikož samotný proces prodlužování primerů probíhá při laboratorní teplotě, může tento faktor ovlivnit přesnost výsledků. Aby se vyhnulo takovýmto chybám, používá se metoda tzv. „hot-start PCR“. Tento způsob zajistí větší citlivost a přesnější výsledek této reakce [105].

2.4.3.2 Real-time PCR

Metoda kvantitativní real-time PCR (q-PCR) je moderní technika molekulární biologie umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. Umožňuje sledování průběhu polymerázové řetězové reakce přímo během reakce pomocí fluorescenčních sond či barviv, které umožňují detekovat množství PCR produktu během reakce zvýšením fluorescenční aktivity. Existují tři základní metody běžně používané při detekci množství amplikonů. Podle toho, která metoda je použita, jsou navíc v PCR směsi obsaženy interkalační barviva vázající se na DNA, fluorescenčně značené sondy nebo fluorescenčně značené primery [106].

Schéma reakce s využitím fluorescenčně značenou značkou je uvedeno na Obrázku 3. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace [106].



Obrázek 3: PCR v reálném čase s fluorescenčně značenou sondou [106]

Stejně jako v případě konvenční PCR je i podstatou q-PCR cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ prostřednictvím termostabilní DNA polymerázy. Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo úměrná množství amplifikonu přítomného v reakční směsi [99].

PCR v reálném čase zahrnuje konverzi RNA na cDNA prostřednictvím reverzní transkripce, po které následuje několik kol PCR pro amplifikaci a detekci požadovaných genů. Produkty lze detekovat v „reálném čase“ pomocí sond SYBR-green nebo TaqMan [107].

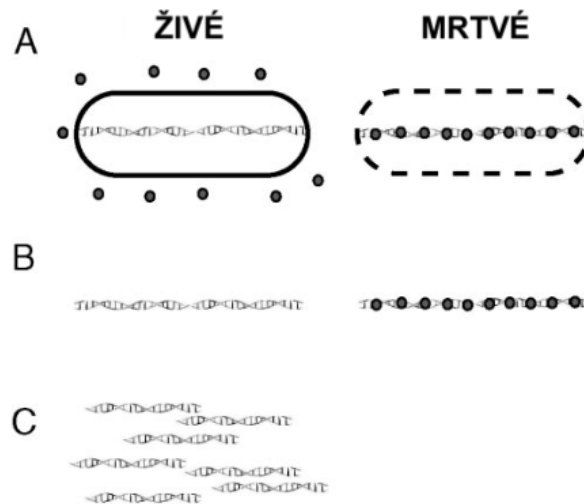
Na rozdíl od klasické konvenční PCR (End-point PCR), metodou PCR v reálném čase lze stanovit přesnou koncentraci DNA v analyzovaném vzorku pomocí interpolace kalibrační křivky standardů o známé koncentraci DNA. Jeho intenzita je permanentně snímána a analyzována speciálním přístrojem, ve kterém zároveň probíhá PCR, tudíž se amplikony nemusí detekovat elektroforeticky. Tím je tato technika zjednodušena a urychlena. Stanovení množství molekul nukleových kyselin ve vzorku se využívá při studiu detekce patogenních mikroorganismů a virů a také exprese genů. Předností metody qPCR je zejména rychlost bez nutnosti detekce PCR produktu, jednoduchost provedení, přesnost a citlivost [99].

2.4.3.3 EMA-PCR

Živé/mrtvé barvení ethidium monoazid (EMA) se používá v kombinaci s real-time PCR k inhibici amplifikace DNA z mrtvých buněk, které přijaly toto barvivo. Diferenciace životaschopných/mrtvých buněk se získá kovalentní vazbou EMA na DNA v mrtvých buňkách fotoaktivací. EMA proniká pouze do mrtvých buněk s narušeným systémem

membrány/buněčné stěny. Schéma reakce vidíme na Obrázku 4. DNA kovalentně navázaná na EMA nemůže být amplifikována pomocí PCR. Lze tedy detekovat pouze DNA z životaschopných buněk. Stanovení životaschopných/mrtvých jedinců jsou klíčovými otázkami v mnoha aspektech biologického výzkumu [108].

Jedním z hlavních překážek diagnostiky PCR je rozlišení DNA od životaschopných a mrtvých buněk. I když jsou organismy mrtvé, může být přítomna intaktní DNA.



Obrázek 4: Schematické znázornění EMA-PCR. [113]

(A) EMA se přidá k testovanému vzorku obsahujícímu jak životaschopné, tak mrtvé buňky. EMA proniká do mrtvých buněk a váže se na DNA. Vystavení světlu po dobu 1 minuty vede ke kovalentní vazbě a inaktivaci volné EMA. EMA nevstupuje do životaschopných buněk.

(B) Po čištění existují dvě populace DNA. Populace DNA z životaschopných buněk není obarvena, zatímco DNA z mrtvých buněk je kovalentně vázána na EMA.

(C). Nezabarvená DNA z životaschopných buněk je amplifikována pomocí PCR, zatímco DNA z mrtvých buněk s navázanou EMA nemůže být amplifikována. (převzato a upraveno [108])

To je zvláště důležité pro patogeny podrobené likvidačním procedurám, jako jsou dezinfekce nebo antibiotika. Ještě s většími problémy se setkáváme při práci s organismy, jako je *Campylobacter jejuni*, které mají specifické požadavky pro růst a mohou vstoupit do stavu, kdy jsou životaschopné a infekční, ale nemohou být kultivovatelné. Proto může být zavedení používání barviva ethidium monoazid pro kvalitativní diferenciaci živých/mrtvých bakterií na bázi DNA v čistých monokulturních modelech průlomové [109].

Podobné analýzy se v praxi běžně používají, například techniky založené na fluorescenci. Avšak prozatím nebylo možné analyzovat vzorky, které kombinují analýzu specifických buněk ve směsných vzorcích, které obsahují několik různých bakterií [110].

Při srovnání barvení vzorků pomocí ethidium monoazid a mikroskopickou metodou BacLight, kdy se vzorek barví pomocí propidium jodid, lze s jistotou říci, že při použití EMA lze pozorovat širší rozsah detekce [108]. Rozsah použití EMA-PCR také daleko přesahuje detekci patogenů. Například EMA se již široce používá jako životaschopné/mrtvé barvivo pro eukaryota v aplikacích průtokové cytometrie [111].

Pro stejné účely se také využívá barvivo propidium monoazid (PMA), které může být účinnější v některých případech, ale vždy je potřebné optimalizovat výběr a koncentraci barviva před aplikací na vzorky [112].

DNáza I je endonukleáza, která štěpí jednovláknovou a dvouvláknovou DNA hydrolyzou fosfodiesterových vazeb. Použití ošetření nukleázou k odstranění extracelulární DNA nebo DNA z buněk s narušenými buněčnými stěnami/membránami bylo původně aplikováno k hodnocení životaschopnosti savčích buněk pomocí průtokové cytometrické analýzy. Podobně jako u principů EMA-qPCR a PMA-qPCR bude tato technika poskytovat indikaci životaschopnosti založenou na integritě membrány a detekci nukleových kyselin. Výsledky studií ukázali, že qPCR analýza ošetření DNázou byla účinnější pro detekci životaschopných termofilních bacilů, protože použité vysoké koncentrace EMA (24 a 240 μM) byly pro tyto buňky cytotoxické [113].

Právě cytotoxicita barviva EMA ve vyšších koncentracích je velkou nevýhodou. Jedním z řešení je použití nižší koncentrace barviva v kombinaci s kratší dobou expozice nebo inkubace. Dále se doporučuje inkubovat vzorek na ledu, pro udržení nižší teploty, která snižuje permeabilitu membrány, a tudíž složitější pronikání EMA do neporušených buněk [112, 114]. Citlivost organismů na vliv barviva může být přičtena rozdílům ve složení membrány mezi gramnegativními (složitá struktura vnější membrány) a grampozitivními (silná vrstva peptidoglykanu) bakteriemi [114].

2.4.3.4 Vysoce rozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Analýza HRM (high resolution melting) je metoda analýzy po PCR, která se používá k identifikaci genetických variací v sekvencích nukleových kyselin. Tato jednoduchá a rychlá metoda je založena na technikách PCR tání (disociační křivky). Analýza HRM může rozlišit sekvence DNA na základě jejich složení, délky, obsahu GC (guanino-cytosinový pár) nebo komplementarity řetězce.

Po skončení posledního amplifikačního kroku PCR (s použitím interkalačního barviva) je PCR produkt zchlazen a je zvyšována teplota o 0,05 $^{\circ}\text{C}/1$ s. HRM analýza je založena na snímání poklesu fluorescence při tepelné denaturaci amplikonů. Důležitá je hodnota teploty tání T_m , při které dojde k denaturaci 50 % molekul DNA na jednořetězcovou DNA.

HRM analýza umožňuje rovněž rozlišení specifických produktů PCR od nespecifických, ale i specifických produktů vzájemně [103]. Jak vypadají specifické a nespecifické produkty v grafu vidíme na Obrázku 5.

Schopnost tání je základní vlastností DNA. Jak se dvojitá šroubovice zahřívá, její vlákna se oddělují. Pokud je duplexní oblast krátká, jako u většiny syntetizovaných sond, dochází k tání v jednom přechodu („všechny“ nebo „žádné“) bez přechodných stavů a teplota tání. T_m krátkých duplexů lze obvykle odhadnout s přesností 2 $^{\circ}\text{C}$ na základě termodynamiky sousedních bází [115].

Oproti tomu delší produkty PCR mohou tát ve více fázích nebo „doménách“, přičemž oblasti bohaté na AT (thyminovo-adeninový pár) tají při nižších teplotách než oblasti bohaté na GC. Nejčastěji se oblasti tání DNA pohybují od 50 do 500 bps [116].

Tepelné tání DNA se běžně sleduje pomocí UV absorbance. Pro vysoce kvalitní křivky tání se typicky používají μg množství DNA a rychlosti 0,1–1,0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Na rozdíl od absorbance

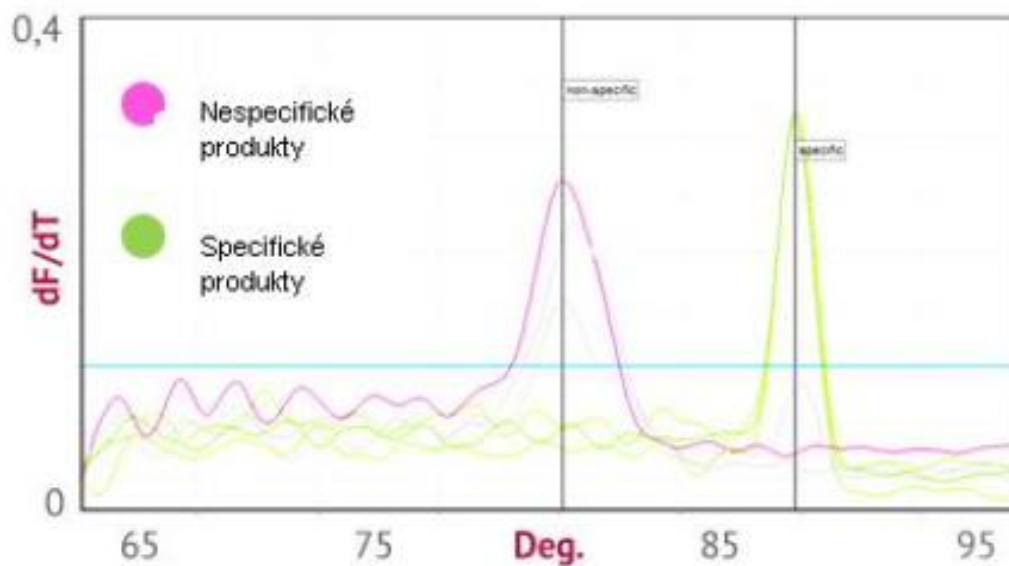
je monitorování tání DNA pomocí fluorescence citlivější a jsou vyžadovány pouze ng, pohodlně poskytované PCR amplifikací. Fluorescenční tavení DNA v kontextu PCR v reálném čase bylo zavedeno s LightCycler® v roce 1997 [117]. Na rozdíl od většiny technik analýzy DNA nebylo nutné žádné zpracování nebo separace [118].

Protože tavení DNA je tak jednoduchý proces, který nevyžaduje více než PCR a generické barvivo DNA, snahy o zvýšení obsahu informací nakonec vedly k analýze křivky tání s vysokým rozlišením. Ačkoli barvivo SYBR Green I dokáže odlišit mnoho homozygotních variant, které se liší v T_m , např. velké delece, komplexní repetitivní oblasti a methylační analýzu, je obtížné detekovat heteroduplexy pomocí SYBR Green I [119].

Některá saturační barviva, která jsou dostupná mimo komerční master mixy, odhalují rozdíly ve schopnosti detekovat heteroduplexy. Cílený software je nezbytný k identifikaci malých rozdílů křivky tání, které identifikují variantu nebo genotyp. Citlivost a specifická tavení s vysokým rozlišením závisí na použitém barvivu, přístroji a softwaru [120].

Dvě hlavní aplikace tavení ampliconu s vysokým rozlišením jsou cílené genotypování a skenování genů. Většina variant jedné báze může být genotypována tavením s vysokým rozlišením, protože mnoho homozygotů se liší v T_m . Nicméně homozygoti některých variant s jednou bází a mnoha inzercí a delecí mají podobné nebo identické T_m a nelze je odlišit. Konkrétně homozygotní genotypy jednobázových variant třídy 3 a třídy 4, také známé jako „neutrální varianty základního páru“, je obtížné odlišit pomocí T_m [116].

T_m ampliconu může být určena z inflexního bodu křivky tání nebo z tavného píku získaného vynesemím negativní derivace fluorescence (F) nad teplotou ($-dF/dT$) proti teplotě (T) [121].



Obrázek 5: Teplotní profily amplifikačních produktů citace (převzato) [122]

Návrh primerů, optimalizace podmínek PCR a kvalita DNA jsou proto významné kroky pro správnost metody. Při navrhování primerů je třeba klást důraz na zabránění vzniku nespecifických produktů, např. dimery primerů. Vzhledem k tomu, že i délka ampliconu má vliv na citlivost následné analýzy HRM, tak by amplicony neměly obsahovat více než 300 párů bází [122].

2.4.4 Gelová elektroforéza

K identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA získaných pomocí PCR se používá elektroforéza v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Touto metodou může být detekován až 1 ng DNA. Rozdělené fragmenty DNA lze izolovat přímo z gelu a použít pro další práce. Volbou typu a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností (Tabulka 3) [94].

Tabulka 3: Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v agarosovém gelu o různých koncentracích agarosy [94]

Koncentrace agarosy (%)	Rozmezí molekulových hmotností separace lineárních molekul DNA (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

2.4.4.1 Elektroforéza v agarovém gelu

Elektroforéza na agarózovém gelu je nejúčinnějším způsobem separace fragmentů DNA různých velikostí v rozmezí od 100 bp do 25 kb. Agaróza je izolována z mořských řas rodu *Gelidium* a *Gracilaria* a skládá se z opakovaných podjednotek agarobiózy (L- a D-galaktóza). Během gelace se agarózové polymery nekovalentně spojují a tvoří síť svazků, jejichž velikost pórů určuje vlastnosti gelu pro molekulární síto. Použití elektroforézy na agarózovém gelu způsobilo revoluci v separaci DNA [95].

K oddělení DNA pomocí elektroforézy na agarózovém gelu se DNA nanese do předem odlitých jamek v gelu a aplikuje se proud. Fosfátová kostra molekuly DNA je záporně nabitá, takže když se umístí do elektrického pole, fragmenty DNA migrují na kladně nabitou anodu. Protože DNA má jednotný poměr hmotnost/náboj, jsou molekuly DNA v agarózovém gelu odděleny podle velikosti tak, že rozdíl vzdáleností je nepřímě úměrná logaritmu její molekulové hmotnosti.

Hlavním modelem pohybu DNA agarózovým gelem je „objektivní replace“, kdy se přední hrana pohybuje dopředu a táhne zbytek molekuly podél. Rychlosti migrace molekuly DNA přes gel může být ovlivněna například velikostí molekuly DNA, koncentrace agarózy, konformace DNA, použití napětí nebo typem agarózy. Po separaci mohou být molekuly DNA vizualizovány pod UV světlem po obarvení vhodným barvivem např.: ethidium bromid [96].

3 CÍLE PRÁCE

Diplomová práce má 4 cíle. V první řadě bylo cílem zpracovat literární rešerši v oblasti využití látek probiotického charakteru v kosmetických výrobcích, nových přístupů ke zpracování těchto mikroorganismům a nových typů produktů.

Dále bylo cílem práce prokázat přítomnost probiotických organismů ve vybraných probiotických kosmetických výrobcích (krémy Benton, Mechnikov, La Roche-Posay a masky Benton a Neogen). K tomu bylo zapotřebí připravit hrubé lyzáty buněk a izolovat z nich DNA, a to metodou fenolové extrakce pomocí magnetických částic a pomocí komerčního kitu, včetně stanovení kvantity a kvality izolované DNA.

Zbýlými cíli bylo pomocí metody PCR s rodově specifickými primery prokázat přítomnost bakteriální DNA určitých rodů deklarovaných výrobcí, provést amplifikaci bakteriální DNA pomocí PCR v kombinaci s použitím barviva propidium monoazid pro určení živých a nekultivovatelných buněk, a následně provést HRM analýzu pro určení teploty tání produktů reakce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Analyzované kosmetické výrobky obsahující probiotické bakterie

Byly použity běžně dostupné kosmetické výrobky zakoupené v komerční síti.

BENTON vyživující plátýnková maska s fermentovanými ingrediencemi

Kosmetický výrobek – Pleťová maska

Výrobce: Benton Inc.

06928 15F, Leaders Tower 104, Noryangjin-ro,
Dongjak-gu, Seoul, Korea
www.bentoncosmetics.com

Dovozce: Kocos Beauty s. r. o.

Valcířská 457, Frýdek – Místek 738 01, Česká
republika
IČO: 06967221
www.kocosbeauty.cz

Šarže: GC081

Datum spotřeby: 16.9.2024

Charakteristika: Prémiová vyživující maska s obsahem vzácného komplexu fermentovaných složek, peptidů a ceramidů.

Složení: Galactomyces Ferment Filtrate, Water, Lactobacillus/Collagen Ferment Filtrate, Glycerin, Propanediol, Pentylene Glycol, Butylene Glycol, Bifida Ferment Lysate, 1,2-Hexanediol, Sodium Hyaluronate, Ceramide NP, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Althaea Rosea Root Extract, Acetyl Hexapeptide-8, Copper Tripeptide-1, Betaine, Panthenol, Usnea Barbata (Lichen) Extract, Zanthoxylum Piperitum Fruit Extract, Pulsatilla Koreana Extract, Hydroxyethylcellulose, Adenosine, Carbomer, Hydrogenated Lecithin, Arginine

Objem balení: 20 g.



Obrázek 6: Výrobek Benton – Maska

BENTON Fermentation Essence – pleťová essence proti vráskám

Kosmetický výrobek – Pleťové sérum

Výrobce: Benton Inc.

06928 15F, Leaders Tower 104, Noryangjin-ro,
Dongjak-gu, Seoul, Korea
www.bentoncosmetics.com

Dovozce: Kocos Beauty s. r. o.

Valcířská 457, Frýdek – Místek 738 01, Česká
republika
IČO: 06967221
www.kocosbeauty.cz

Šarže: EL097

Datum spotřeby: 13.6.2023



Obrázek 7: Výrobek Benton – krém

Charakteristika: Essence s vysokou koncentrací fermentovaných složek pomáhá účinně eliminovat tvorbu vrásek. Aktivní složky (fermentovaný filtrát Galactomyces, kvasinky, kyselina hyaluronová a ceramidy) podporují regeneraci pokožky a pomáhají obnovit pružnost a jas pokožky, která se v průběhu let pomalu snižuje.

Složení: Galactomyces Ferment Filtrate, Aqua (Water), Butylene Glycol, Pentylene Glycol, Glycerin, 1,2-Hexanediol, Bifida Ferment Lysate, Ceramide NP, Althaea Rosea Root Extract, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Betaine, Panthenol, Allantoin, Sodium Hyaluronate, sh-Oligopeptide-1, Zanthoxylum Piperitum Fruit Extract, Pulsatilla Koreana Extract, Usnea Barbata (Lichen) Extract, Adenosine, Arginine, Xanthan Gum, Hydrogenated Lecithin, Polysorbate 20, Lecithin.

Objem balení: 1,2 g.

HOLIKA HOLIKA Mechnikov's Probiotics Formula Radiance Cream

Kosmetický výrobek – Krém

Výrobce: Enprani Co., Ltd.

1st floor, 88 Chukhang-daero 296 beon-gil, Jung-gu,
Incheon, South Korea
www.holikaholika.co.kr

Dovozce: Navi concept s.r.o.

Korunní 841/27, Vinohrady, 120 00 Praha 2, Česká
republika
IČO: 08275513
www.koreankosmetika.cz

Šarže: UM01

Datum spotřeby: 10.6.2023

Charakteristika: Tato směs obsahuje inovativní kombinaci probiotik zvanou Quattro Biome™, což jsou čtyři typy probiotik zahrnující fermentát *Lactococcus lactis*, fermentát

Lactobacillus, fermentát *Streptococcus thermophilus* a Bifida Ferment Filtrate.

Složení: Water, Cyclopentasiloxane, Butylene Glycol, Cetyl Ethylhexanoate, Glycerin, Caprylic/Capric Triglyceride, Niacinamide, Cetearyl Alcohol, Ethyl Perfluorobutyl Ether, Glyceryl Stearate, 1, 2-Hexanediol, Cyclohexasiloxane, Polysorbate 60, Ethyl Perfluoroisobutyl Ether, Dimethicone, Streptococcus Thermophilus Ferment, Bifida Ferment Filtrate, Lactobacillus Ferment, Lactococcus Ferment, PEG-100 Stearate, Sodium Polyacrylate, Batyl Alcohol, Sorbitan Stearate, Stearic Acid, Succinoglycan, Allantoin, Dipotassium Glycyrrhizate, Lecithin, Polymnia Sonchifolia Root Juice, Oxygen, PEG/PPG-18/18 Dimethicone, Trideceth-6, Ethylhexylglycerin, Adenosine, Lactobacillus/Soybean Ferment Extract, Yeast Ferment Extract, Resveratrol, Sodium Hyaluronate, Betaine, Candida Bombicola/Glucose/Methyl Rapeseedate Ferment, Trehalose, Xylitol, Lysolecithin, Olea Europaea (Olive) Fruit Oil, Cocos Nucifera (Coconut) Oil, Oryza Sativa (Rice) Germ Oil, Cynara Scolymus (Artichoke) Leaf Extract, Pyrus Malus (Apple) Fruit Extract, Arctium Lappa Root Extract, Macadamia Integrifolia Seed Oil, Sodium Lauroyl Glutamate, Brassica Campestris (Rapeseed) Sterols, Disodium EDTA, Cholesterol, PEG-5 Rapeseed Sterol, Hydrogenated Lecithin, Ceteth-3, Ceteth-5, Sodium Surfactin, Fragrance.



Obrázek 8: Výrobek Mechnikov

Objem balení: 1,2g.

NEOGEN Maska pro obnovení biorytmu pokožky Dermalogy Probiotics Relief Mask

Kosmetický výrobek – Pleťová maska

Výrobce: Audin Futures Co., Ltd.

06178 15F, Haesung 2 Building, 508 Teheran-ro (Daechi-dong)
www.neogenlab.co.kr

Dovozce: Ksisters s.r.o.

Bajkalská 45G, 821 05 Ružinov, Bratislava,
Slovenská republika
IČO: 53 143 230
www.ksisters.cz

Šarže: NF01

Datum spotřeby: 26. 6. 2025

Charakteristika: Maska pro obnovení biorytmu pokožky se sadou trojitých probiotik Dermalogy Probiotics Relief Mask Neogen posílí imunitu tvé pokožky.

Složení: Water, Lactobacillus Ferment Lysate(8.5%), Propanediol, Caprylic/Capric Triglyceride, Isopentylidol,

Glycerin, Niacinamide, 1,2-Hexanediol, Glycereth-26, Butylene Glycol, Dimethicone, Cetyl Alcohol, Stearyl Alcohol, Hydroxyethyl Urea, Tromethamine, Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Carbomer, Ethylhexylglycerin, Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer, Adenosine, Allantoin, Hydrogenated Lecithin, Betaine, Trehalose, Panthenol, Phytosteryl/Octyldodecyl Lauroyl Glutamate, Ceramide 3, Sodium PCA, Sodium Lactate, Gossypium Herbaceum (Cotton) Extract, Vaccinium Macrocarpon (Cranberry) Fruit Extract, Fragaria Chiloensis (Strawberry) Fruit Extract, Rubus Idaeus (Raspberry) Fruit Extract, Vaccinium Angustifolium (Blueberry) Fruit Extract, Cornus Officinalis Fruit Extract, Euterpe Oleracea Fruit Extract, Sambucus Nigra Fruit Extract, Schizandra Chinensis Fruit Extract, Panax Ginseng Berry Extract, Vaccinium Myrtillus Fruit Extract, Bifida Ferment Lysate(8.4ppm), Arginine, Aspartic Acid, PCA, Streptococcus Thermophilus Ferment(2.4ppm), Glycine, Alanine, Lecithin, Broussonetia Kazinoki Root Extract, Royal Jelly Extract, Fragaria Vesca (Strawberry) Fruit Extract, Hippophae Rhamnoides Oil, Milk Extract, Pearl Extract, Tocopherol, Polysorbate 20, Propolis Extract, Hydrolyzed Collagen, Lactose, Artemisia Capillaris Extract, Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil, Serine, Valine, Sodium Hyaluronate, Isoleucine, Threonine, Proline, Phenylalanine, Histidine, Rubus Fruticosus (Blackberry) Fruit Extract, Hyaluronic Acid, Sodium Ascorbyl Phosphate, Phospholipids, Phytosphingosine, Copper Tripeptide-1, Lactic Acid, Cholesterol, Hydrolyzed Hyaluronic Acid, Squalane, Tripeptide-1, Palmitoyl Tripeptide-1, Tripeptide-2, Hexapeptide-11, Phytosterols, Dunaliella Salina Extract, Acetyl Hexapeptide-8, Palmitoyl Tetrapeptide-7, Palmitoyl Pentapeptide-4, Hexapeptide-9, Nonapeptide-1, Disodium EDTA, Fragrance.

Objem balení: 25 g.



Obrázek 9: Výrobek Neogen

4.1.2 Analyzované kosmetické výrobky obsahující postbiotické bakterie

Byly použity běžně dostupné kosmetické výrobky zakoupené v komerční síti.

AVÈNE Cicalfate+ Obnovující ochranný krém na podrážděnou a narušenou pokožku

Kosmetický výrobek – krém

Výrobce: Laboratoires dermatologiques avène

45 Place Abel Gance - 92100 BOULOGNE,
France

www.eau-thermale-avene.cz

Dovozce: Pilulka lékárny a.s.

Drahobejlova 1073/36, Libeň, 190 00 Praha 9,
Česká republika

IČO: 3615278

www.pilulka.cz

Šarže: AV1456

Datum spotřeby: 1.7.2024

Charakteristika: Avène Cicalfate+ Obnovující ochranný krém je novou generací obnovující a ochranné péče, která urychluje proces obnovy podrážděné a poškozené pokožky a vnějších sliznic celé rodiny (kojenci, děti, dospělí).

Složení: Avene Thermal Spring Water (Avene Aqua), Caprylic/capric Triglyceride, Mineral Oil (Paraffinum Liquidum), Glycerin, Hydrogenated Vegetable Oil, Zinc Oxide, Propylene Glycol, Polyglyceryl-2 Sesquiossearate, Peg-22/dodecyl Glycol Copolymer, Aluminum Stearate, Aquaphilus Dolomiaie Ferment Filtrate, Arginine, Beeswax (Cera Alba), Copper Sulfate, Magnesium Stearate, Magnesium Sulfate, Microcrystalline Wax (Cera Microcristallina), Tromethamine, Zinc Sulfate.

Objem balení: 40 ml.



Obrázek 10: Výrobek Avène

LA ROCHE-POSAY Lipikar Lipidoobnovující balzám pro suchou a náchylnou k atopii pleť obličejí a těla

Kosmetický výrobek – krém

Výrobce: L'Oréal S.A.,

Paříž, 750 08, Francie

www.loreal.com

Dovozce: La MakeUp Sp. z o.o

Domaniewska 37 lok. 17,6, Varšava, Polsko
www.makeup.cz

Šarže: 54W703

Datum spotřeby: 1.7.2025

Charakteristika: Přípravek je vhodný pro suchou a citlivou pokožku se sklonek k alergiím a atopii. Základ produktu tvoří Aqua Posae Filiformis, niacinamid, bambucké máslo a termální voda.

Složení: Aqua/Water, Butyrospermum Parkii Butter/Shea Butter, Glycerin, Dimethicone, Niacinamide, Paraffinum Liquidum/Mineral Oil, Cetearyl Alcohol, Brassica Campestris Oleifera Oil/Rapeseed Seed Oil, Ammonium Polyacryldimethyltauramide/Ammonium, Polyacryloyldimethyl Taurate, Peg-100 Stearate, Glyceryl Stearate, Peg-20 Methyl Glucose Sesquistearate.

Objem balení: 75 ml.



Obrázek 11: Výrobek La Rosche – Posay

4.1.3 Bakteriální kmeny pro kultivace pozitivních kontrol

Použité bakteriální kmeny pro kultivace byly poskytnuty Ing. Štěpánkou Trachtovou Ph.D. Sbírkové kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) a ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů (CCDM). Kmeny byly kultivovány v MRS médiu a následně byla DNA izolována pomocí fenolové extrakce, magnetickými částicemi a komerčním kitem. DNA byla vyředěna na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

- *Lactobacillus plantarum* CCM 7039
- *Lactobacillus casei* CCM 7088
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T
- *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190
- *Lactobacillus pentosus* CCM 4619
- *Bifidobacterium breve* CCM 7825
- *Lactococcus lactis cremoris* CCDM 1004
- *Lactococcus delbrueckii* CCDM 125
- *Candida glabrata* CCM 8270

4.1.4 Přístroje a pomůcky

- Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI
- Centrifuga miniSpin plus $14\,500 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New jersey, USA)
- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New jersey, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)

- Zařízení pro elektroforézu OWL D2, (OWL Separation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Transiluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Rotor-Gene 6000 (Corbett Research UK Ltd, Cambridge, United Kingdom)
- MiniIncubator Labnet (Labnet International, Inc., New Jersey, USA)
- Personal Microwave Autoclave Microjet (Enbio Technology Sp. z o.o., Suchy Dwór , Polsko)
- Biological thermostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Denzitometr McFarland (Grant-bio DEN-1, Grant Instruments, Spojené království)
- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- Špičky z umělé hmoty
- Další laboratorní pomůcky (špachtle, lžička, buničina...)

4.1.5 Chemikálie

- Agarosa pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA standard (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg·ml⁻¹) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- GoldView (Ecoli, Bratislava, Slovensko)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylen glykol (PEG 6000) (FLUKA BioChemika, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, SRN)

4.1.6 Roztoky

- 0,5 M EDTA, pH 8,0
- Lyzační pufr (10 M Tris-HCl, pH 7,8; 5 M EDTA, pH 8,0; lysozym 3 mg·ml⁻¹)

- Tris-HCl (1 M, Tris-báze (121 g·l⁻¹), destilovaná voda, koncentrovaná HCl pro úpravu pH)
- TE pufr (0,01M Tris-HCl (pH 7,8), 0,001M EDTA (pH 8))
- CIZ (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1)
- 5 × TBE pufr (Tris-base (54 g·l⁻¹), kyselina boritá (27,5 g·l⁻¹), 0,5 M EDTA (20 ml) a destilovaná voda do 1 l)

4.1.7 Komponenty pro PCR

- PCR voda (PCR Ultra H₂O) (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR pufr s Mg⁺ ionty (10x PCR blue buffer complete (750 mM Tris-HCl; pH 8,8; 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20; 25 mM MgCl₂)) (Top-Bio, Praha, ČR)
- směs dNTP (PCR dNTP mix, 10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA-polymerasa (Taq DNA pol. 1.1, 500 U, 1 U·μl⁻¹) (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (2x koncentrovaný: 150mM Tris-HCl; pH 8,8; 40mM (NH₄)₂SO₄; 5mM MgCl₂; 400μM dATP; 400μM dCTP; 400μM dGTP; 400μM dTTP; Taq DNA polymeráza (50 U/ml); monoklonální protilátka anti-Taq; SYTO-9; stabilizátory a aditiva) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Bacteria* [125]
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* [125]
- Primery specifické pro rod *Bifidobacterium* [126]
- Primery specifické pro rod *Lactococcus* [127]
- Primery specifické pro kvasinky [128]

4.1.8 Magnetické nosiče

Pro izolaci DNA byly použity magnetické nosiče FH 46 ox (2 mg·ml⁻¹) funkcionalizované COOH skupinami. Jedná se o P(HEMA-co-EDMA) – kopolymer hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu. Magnetické nosiče byly syntetizovány Ing. D. Horákem z Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd v Praze. Vlastnosti magnetických nosičů jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Vlastnosti magnetických nosičů

Označení	Polymer	Fe (%)	-COOH (mM/g)	Průměr nosiče (μm)	PDI
PH 46ox	P(HEMA-co-EDMA)	6,55	0,85	1,5	1,07

P(HEMA-co-EDMA) - poly(hydroxyethylmethakrylát-co-ethylendimethakrylát)

PDI – index polydispersity = poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti

4.1.9 Kultivační média

Složení médií použitých pro kultivace bakteriálních buněk je uvedeno v Tabulce č 4. Pro kultivaci mikroorganismů bylo použito médium de Man, Rogosa, Sharpe (MRS);

masopeptonový agar (MPA); Lysogeny broth médium (LB); Malt Extract Broth Base bujón; Malt Extract Broth Base agar; M17 agar a Nutrient Broth (NB) médium (Tabulka 5).

Tabulka 5: Složení médií

Médium	pH	Složení	(g·l ⁻¹)
<i>Lactobacillus</i> MRS Broth	6,5 ± 0,2	Proteosový pepton	10,00
		HM Pepton B	10,00
		Výtažek z kvasnic	5,00
		Dextróza (glukóza)	20,00
		Polysorbát 80	1,00
		Citran amonný	2,00
		Octan sodný	5,00
		Síran hořečnatý	0,10
		Síran manganatý	0,05
		Hydrogenfosforečnan draselný	2,00
Nutrient Broth w/ 1% Peptone	7,3 ± 0,2	Masový pepton	10,00
		Hovězí extrakt	10,00
		Chlorid sodný	5,00
MPA agar	7,3 ± 0,2	Peptický digest zvířecí tkáň	5,00
		Masový extrakt	3,00
		Agar	15,00
Malt Extract Broth Base	5,4 ± 0,2	Sladový extrakt	17,00
		Mykologický pepton	3,00
LB Broth	7,0 ± 0,2	Rostlinný pepton	10,00
		Kvasničný extrakt	5,00
		Chlorid sodný (NaCl)	5,00
Malt extract Broth Base agar	4,7 ± 0,2	Sladový extrakt	17,00
		Mykologický pepton	3,00
		Agar	15,00
M17 agar	6,9 ± 0,2	Trypton	5,00
		Sojový peptone	5,00
		Prášek Lab-Lemco	5,00
		Výtažek z kvasnic	2,50
		Kyselina askorbová	0,50
		Síran hořečnatý	0,25
		Di-sodný glycerofosfát	19,00

4.2 Mikrobiologické metody

4.2.1 Mikrobiologické kultivační metody

Z mikrobiologických metod byly aplikovány metody kultivace v tekutém živném médiu a na pevném živném médiu (kultivace na agarových plotnách).

4.2.2 Příprava živných médií

Byly připraveny 3 druhy pevných živných médií a 4 druhy tekutých živných médií. Média byla připravena navážením příslušného množství komerčního média (uvedeno v Tabulce 6) v práškové formě a rozpuštěna v destilované vodě o objemu 500 ml. Z pevných médií se jednalo o MPA, M17 agar a Malt extract Broth Base agar. Z tekutých médií se jednalo o tekuté MRS médium, LB Broth, NB a Malt Extract Broth Base.

Tabulka 6: Příprava médií

Výrobce	Médium	Navážené množství [g/500ml]
HiMedia Laboratories	MPA	11,5
HiMedia Laboratories	M17	19,6
HiMedia Laboratories	MRS	27,6
Sigma-Aldrich	LB Broth	10,0
HiMedia Laboratories	NB	12,5
HiMedia Laboratories	Malt extract broth base	10,0

- Všechna připravená média s agarem byla vyautoklávována a rozlita do Petriho misek asi po 20 ml.
- Tekuté média byla připravena stejným způsobem jako médium pevné, ale bez obsahu agaru. Tekutá média byla po autoklávování rozlita po 10 ml do sterilních zkumavek.

4.2.2.1 Kultivace bakterií ve výrobcích na pevných médiích

- Bylo napipetováno 0,5 ml krému nebo 1 g plátýnkové masky každého výrobku do sterilních zkumavek.
- Z každého výrobku byly ředěním sterilní vodou připraveny vzorky o ředění 10^{-3} . Vzorky masek byly navíc ponechány na třepače po dobu 24 hodin.
- Na agarové plotny s MPA médiem bylo rozetřeno 100 μ l vzorku sterilní hokejkou ve třech paralelách. Růst při 37 °C byl kontrolován každých 24 hodin.
- Po třech dnech kultivace byly kolonie narostlé na MPA médiu přeočkovány křížovým roztěrem na nové MPA médium a kultivovány dalších 48 hodin.

4.2.2.2 Kultivace bakterií ve výrobcích v tekutém živném médiu

- Navážka 0,5 g krému nebo 1 g plátýnkové masky byla zaočkována do 10 ml tekutého MRS a NB média. Byla provedena kultivace při 37 °C po dobu 3 dnů.
- Růst bakterií byl kontrolován každých 24 hodin.

4.2.3 Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk z nakultivovaných výrobků

- Byly připraveny hrubé lyzáty buněk z krémů (Mechnikov, Benton) a masek (Benton, Neogen) ve čtyřech opakováních. Lyzační pufr obsahoval lysozym o koncentraci $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.
- K nakultivovanému kosmetickému výrobku (500 ml) byl přidán lyzační roztok s lysozymem. Vzorek byl důkladně resuspendován.
- Rozsuspendovaný vzorek byl inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě.
- Do každé Eppendorfovy zkumavky (celkem 16 vzorků) bylo přidáno $25 \mu\text{l}$ 10% SDS a $5 \mu\text{l}$ proteinasy K ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).
- Vzorky byly inkubovány v inkubátoru při teplotě $55 \text{ }^\circ\text{C}$ do druhého dne.
- Z hrubých lyzátů buněk byla izolována DNA.

4.2.4 Příprava hrubých lyzátů z tekutého média

- Bakteriální buňky z výrobku La Roche-Posay získané 3. den od zaočkování do tekutého MRS média byly povařeny 15 minut při $99 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Stejně byly připraveny vzorky výrobku La Roche-Posay ve sterilní vodě, které byly také povařeny 15 min při $99 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Získané hrubé lyzáty buněk byly dále používány jako DNA matrice do směsi pro PCR.

4.2.5 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk fenolovou extrakcí

- K $500 \mu\text{l}$ lyzátu buněk bylo přidáno $500 \mu\text{l}$ fenolu (předestilovaný, pH 7,8). Směs byla kývavým pohybem míchána 4 minuty. Poté byla směs centrifugována 5 minut při $14\,500 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Do čisté Eppendorfovy zkumavky byla odebrána vodní fáze obsahující DNA.
- Do každé zkumavky bylo následně přidáno $700 \mu\text{l}$ roztoku CIZ (chloroform:isoamylalkohol, 24:1) a směs byla opět kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minut.
- Směs byla opět centrifugována při $14\,500 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 5 minut a poté byla odebrána vodní fáze do čisté Eppendorfovy zkumavky.

4.2.5.1 Přesrážení DNA ethanolem

- Ke vzorku DNA získaného fenolovou extrakcí bylo přidáno $30 \mu\text{l}$ 3 M octanu sodného a vzorek byl promíchán.
- Následně bylo do každé zkumavky přidáno 1 ml 96% ethanolu, směs byla promíchána a DNA byla srážena při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut.
- Po ukončení inkubace byla směs centrifugována při $14\,500$ otáčkách po dobu 15 minut a supernatant je opatrně slit.
- Sediment byl promyt 70% ethanolem a směs opět centrifugována při $14\,500$ otáčkách 10 minut.
- Po slití supernatantu byl sediment DNA vysušen v exikátoru 20 min a DNA rozpuštěna v TE pufru $50 \mu\text{l}$.
- Takto přečištěná DNA byla uchovávána při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.6 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických mikročastic

Byla izolována DNA z hrubých lyzátů buněk z výrobků. Byla namíchána separační směs za použití magnetických mikročastic FH 46 ox v přesném pořadí dle Tabulky 7.

Tabulka 7: Separací směs pro izolaci DNA magnetickými mikročasticemi

Krok	Složka	Objem [μl]
1	NaCl (5M)	400
2	DNA (lyzát buněk)	100
3	PEG 6000 (40%)	400
4	Magnetický nosič (2 mg·ml ⁻¹)	100
Celkem		1 000

- Výsledná koncentrace PEG 6000 je 16 % hm, NaCl 2 M.
- Směs všech složek v Eppendorfově zkumavce byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla krátce stočena na minicentrifuze a umístěna do magnetického separátoru. Magnetické částice byly separovány 5 minut při laboratorní teplotě.
- Po odebrání supernatantu bylo do zkumavky přidáno 1 000 μl 70% etanolu, vzorek byl promíchán a magnetické částice byly separovány pomocí magnetického separátoru. Ethanol byl odebrán a DNA navázaná na magnetické nosiče byla znovu promyta ethanolem (70%, 500 μl).
- Zbylý etanol byl odpařen v exsikátoru a DNA adsorbovaná na magnetické nosiče byla eluována do 50 μl TE pufru.
- Druhý den byly magnetické částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

4.2.7 Izolace bakteriální DNA pomocí Omni Bacterial DNA Purification kitu

- Postupovalo se dle návodu od výrobce s drobnými úpravami.
- Navážka 0,5 g nebo 1 g každého výrobku byla zaočkována do 10 ml tekutého média. Byla provedena kultivace při 37 °C po dobu 3 dnů.
- Růst bakterií byl kontrolován každých 24 hodin.
- Třetí den bylo z nekultivovaného média odebráno 2 ml vzorku a centrifugováno na 10 000 otáček 10 minut a supernatant je opatrně slit.
- Bylo přidáno 200 μl TE pufru a vzorek by důkladně resuspendován.
- Do vzorku bylo přidáno 10 μl lysozymu a inkubováno v pokojové teplotě 10 minut.
- Obsah zkumavky byl kvantitativně přesunut do 1,5 ml Eppendorfkovy zkumavky a bylo přidáno 25 μl Protease solution a 100 μl DLB pufru.
- Vše bylo vortexováno 10 sekund a inkubováno při 55 °C do dobu 1 hodiny za neustálého míchání.
- Vzorky byly centrifugovány na 10 000 otáček 2 minuty a eluát byl přelit to čisté zkumavky.
- Do vzorku bylo přidáno 220 μl BB pufru a dostatečně promícháno a ponecháno k inkubaci při 60 °C na 10 minut.
- Následně bylo přidáno 220 μl ethanolu a vortexováno 20 sekund.

- Do čisté zkumavky byla vložena Omni DNA mini kolona a vzorek byl kvantitativně přelit a centrifugován na 10 000 otáček 1 minutu.
- Kolona se vzorkem byla přemístěna do nové zkumavky a bylo přidáno 500 μ l CBH pufru.
- Pro promytí vzorku byl centrifugován samotný v prázdné zkumavce následně byl rozpuštěn v 50 μ l EB pufru a izolované DNA byla uschována při teplotě 4 °C.

4.2.8 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

- Pomocí přístroje NanoDrop 2000 byla proměřena absorbance izolované DNA v TE pufru proti čistému TE pufru. Objem roztoku DNA použitého k měření byl 2 μ l vzorku.
- Absorbance byla odečtena pro vlnové délky 230 nm (minimum absorbance pro DNA), 260 nm (maximum absorbance pro DNA), 280 nm (maximum absorbance pro proteiny).
- Z hodnoty absorbance pro 260 nm byla stanovena koncentrace DNA ve vzorku.
- Z hodnoty A260 nm/A280 nm byla určena čistota vzorku DNA.

4.3 Molekulárně diagnostické metody

4.3.1 Provedení polymerázových řetězových reakcí

Byly připraveny směsi pro PCR, byly provedeny PCR a detekovány produkty PCR. Jednotlivé reakce se odlišovaly použitými primery, složením PCR směsi a odpovídajícího programu PCR.

4.3.1.1 Primery pro PCR

- Pro přípravu PCR směsi byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub) [125] a pro rod *Lactobacillus* (F_all lact, R_all lact) [125], (LbLMA, R 16-1) [129], *Bifidobacterium* (Pbi F1, Pbi R2) [126], *Lactococcus* (PALA-4, PALA-14) [127], kvasinky (Oli-R, Oli-F) [128].
- Sekvence primerů specifických pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus*, rod *Lactococcus*, rod *Bifidobacterium*, rod *Streptococcus* a kvasinky se nachází v Tabulce 8.

Tabulka 8: Specifické primery pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus*, rod *Lactococcus*, rod *Bifidobacterium*, rod *Streptococcus* a kvasinky

Primery		Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost produktu PCR	Zdroj
Doména <i>Bacteria</i>				
1	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp	[125]
2	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Rod <i>Lactobacillus</i>				
1	F_alllact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92 bp	[125]
2	R_alllact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT		

1	LbLMA	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250 bp	[129]
2	R 16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		
Rod <i>Bifidobacterium</i>				
1	Pbi F1	CCG GAA TAG CTC C	914 bp	130]
2	Pbi R2	GAC CAT GCA CCA CCT GTG AA		
Rod <i>Lactococcus</i>				
1	PALA-4	CTTCAACA GACAAGTCC	1131 bp	[127]
2	PALA-14	GATAAATGATTCCAAGC		
Kvasinky				
1	Oli-F	CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC	152 bp	[128]
2	Oli-R	ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC		

4.3.1.2 Příprava směsí pro PCR

- Všechny komponenty PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a krátce zcentrifugovány.
- Byly připraveny směsi pro konvenční PCR o celkovém objemu 25 μ l. Komponenty byly přidávány v pořadí uvedeném v Tabulkách 9, 10, 11.

Tabulka 9: Příprava směsi pro konvenční PCR pro doménu Bacteria

Krok	Komponent	Objem [μ l]
1	Voda pro PCR	18,0
2	10x reakční pufr kompletní	2,5
3	Směs dNTP (10 mM)	0,5
4	Primer F_eub (10 pmol/ μ l)	1,0
5	Primer R_eub (10 pmol/ μ l)	1,0
6	Taq DNA-polymerasa (1 U· μ l ⁻¹)	1,0
7	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0

Tabulka 10: Složení PCR směsí po jednotlivé reakce pro doménu Bacteria, rod *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* a kvasinky

Krok	Komponent	Objem [μ l]
1	Voda pro PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer č. 1 (10 mM)	1,0
4	Primer č. 2 (10 mM)	1,0
5	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0

Tabulka 11: Příprava směsi pro PCR v reálním čase pro doménu *Bacteria* pro vzorky postbiotik a pro PMA-PCR

Krok	Komponent	Objem [μl]
1	Voda pro PCR	8,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer č. 1 (10 mM)	1,0
4	Primer č. 2 (10 mM)	1,0
5	Matrice DNA	2,0
Celkem		25,0

- V případě PCR z jedné kolonie byl jako DNA matrice přidán do reakční směsi lyzát získaný lyzí jedné bakteriální kolonie (viz kapitola 5.2.3.1)
- Do reakční směsi byla DNA přidávána jako poslední.
- Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola (PK), jako matrice byla použita DNA izolovaná z čisté bakteriální kultury (koncentrace 10 ng·μl⁻¹).
- Analogicky byla připravena negativní kontrola (NK) (kontrola kontaminace komponent).

4.3.1.3 Programy amplifikace PCR

- Byla provedena amplifikace izolované DNA. Teplotní programy byly zvoleny v závislosti na použitých primerech. (Tabulka 12)
- Teplotní program pro doménu *Bacteria*, pro rod *Lactobacillus*, rod *Bifidobacterium*, rod *Lactococcus* a kvasinky se nachází v Tabulce 12.

Tabulky 12: Teplotní programy

Prodloužená denaturace PCR	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
Doména Bacteria				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/5 min
	30 cyklů			
Rod Lactobacillus				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/7 min
	30 cyklů			
Rod Lactococcus				
94 °C/5 min	94 °C/60 s	45 °C/60 s	72 °C/60 s	72 °C/10 min
	30 cyklů			
Rod Bifidobacterium				
94 °C/5 min	94 °C/60 s	50 °C/60 s	72 °C/120 s	72 °C/10 min
	35 cyklů			
Rod Streptococcus				
95 °C/5 min	95 °C/60 s	58 °C/60 s	72 °C/120 s	72 °C/10 min
	30 cyklů			

Kvasinky				
94 °C/5 min	94 °C/60 s	51 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/5 min
	30 cyklů			

4.3.1.4 Analýza křivek tání produktů PCR (melt analýza)

- Melt analýza produktů PCR byla provedena ihned po amplifikaci DNA PCR v reálném čase.
- Melt analýza byla měřena v teplotním rozmezí od 60 do 97 °C s teplotním krokem 0,1 °C za s.
- Amplifikační křivky i křivky tání byly zaznamenány a analyzovány programem RotorGene.

4.3.1.5 Metoda rozlišení živých a mrtvých buněk (PMA-PCR)

- Bakteriální buňky (450 µl) byly vystaveny působení propidium monoazidu (PMA; 0,1 mg/ml; 50 µl).
- Živé buňky byly při laboratorní teplotě inkubovány s PMA (0,1 mg/ml) po dobu 10 minut.
- Paralelně byl připraven i vzorek povařen 20 min při 99 °C a následně inkubován s PMA (0,1 mg/ml) po dobu 10 minut.
- Po inkubaci byl roztok 10 minut ozařován halogenovou lampou (500 W) ze vzdálenosti 20 cm (na ledu). Po fotoaktivaci byla provedena centrifugace (10 000 otáček/3 min.).
- Sediment byl opakovaně promýván a následně resuspendován v 450 µl sterilní vody.
- Paralelně byl připraven i vzorek bez působení PMA.
- Vzorky byly povařeny 10 min při 99 °C pro tepelnou lýzi buněk.
- Ověření amplifikovatelnosti DNA byl prováděn pomocí PCR za využití primerů specifických pro doménu Bacteria [125]. Produkty PCR (466 bp) byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na 1,8% agarosovém gelu.

4.3.1.6 Vysokorozlišovací analýza křivek tání ampliconů (HRM)

- Jako DNA matrice byla použita DNA o koncentraci (viz 8.2.1).
- U negativní kontroly bylo místo matrice DNA přidáno ekvivalentní množství vody.
- U pozitivní kontroly jako matrice byla použita DNA izolovaná z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus plantarum* (koncentrace 10 ng·µl⁻¹).
- Komponenty byly přidávány v pořadí uvedeném v Tabulce 10.
- Teplotní program pro q-PCR-HRM byl stejný jako je uveden v Tabulce 12. Koncová HRM analýza byla provedena podle teplotního profilu od 60 °C do 97 °C po 0,05 °C/s.

4.3.2 Detekce produktů PCR agarosovou gelovou elektroforézou

- Byl připraven 1,8% agarosový gel pro detekci ampliconů navážením 1,8 g agarosy a jejím rozpuštěním ve 100 ml 0,5 × TBE pufru. Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě.

- Po vychladnutí na teplotu cca 60 °C byla suspenze promíchána a bylo přidáno fluorescenční Midori Green Advance DNA Stain (5 µl barviva/100 ml). Suspenze byla nalita do připravené formy.
- Gel byl ponechán tuhnout po dobu 30 minut a do komůrek vzniklých po vyjmutí hřebínku byly nanесeny produkty PCR smísené v poměru 5:1 s nanášecím pufrem Yeallow load (6 × koncentrováný).
- Do jedné z komůrek byl nanесen DNA standard (50 bp) o objemu 5 µl (dle doporučení výrobce). Obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp.
- Po vložení do elektroforetické vany byl gel převrstven 0,5 × TBE pufrem do výšky 0,5 cm nad gel.
- Elektroforéza probíhala po dobu 2 hodin při konstantním napětí 80 V. Poté byl gel vyhodnocen v UV světle na transilluminátoru TVR-312A při vlnové délce 312 nm.
- Gel byl popřípadě dobarven v lázni s ethidiumbromidem (0,5 µg·ml⁻¹).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kultivace bakteriálních buněk z výrobků

Bakterie ve výrobcích byly dle 5.2.2.1. kultivovány v tekutých médiích (MRS a Nutrient Broth – NB) a na tuhém médiu (MPA).

Při kultivaci v tekutém MRS médiu byl po 3 dnech viditelný nárůst buněk u výrobků Neogen, Benton maska, Benton krém a Mechnikov. Vzorky Neogen, Benton maska, Benton krém a Mechnikov v NB médiu byly po 3 dnech kultivace lehce zakalené. Koncentrace buněk byla změřena pomocí denzitometrem McFarland (Tabulka 13).

V případě postbiotických krémů Avene a La Roche – Posay nebyl zaznamenán žádný růst buněk (Obrázek 12), což vychází z definice postbiotik, které nejsou živé buňky.

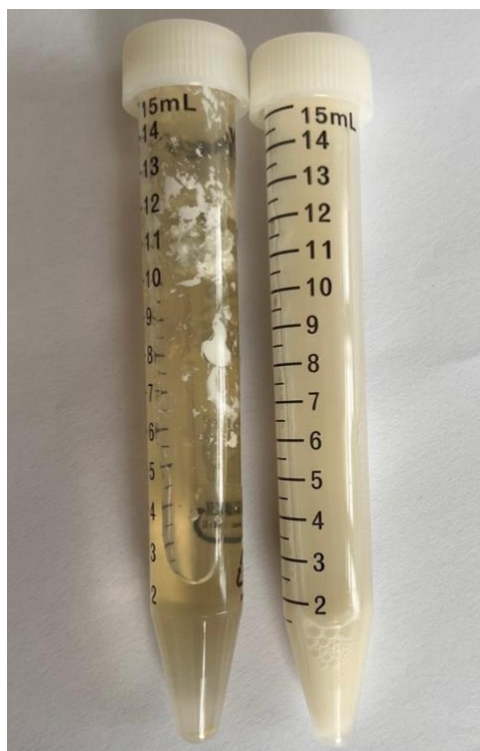
Pro špatné vlastnosti výrobku Avene, hydrofobní vlastnosti krému nedovolily získat emulzi výrobku ve sterilní vodě ani v médiu, nebyl vzorek dále zpracováván.

Tabulka 13: Shrnutí koncentrace buněk v médiích (MRS a NB) po 3 dnech kultivace

Výrobek		Koncentrace [MFU]	
		MRS	NB
Benton krém	1a	3,1	0,0
	1b	0,4	0,7
Mechnikov	2a	12	0,4
	2b	7,7	0,6
Neogen	3a	7,7	1,5
	3b	7,4	1,4
Benton maska	4a	13	1,0
	4b	2,3	0,9

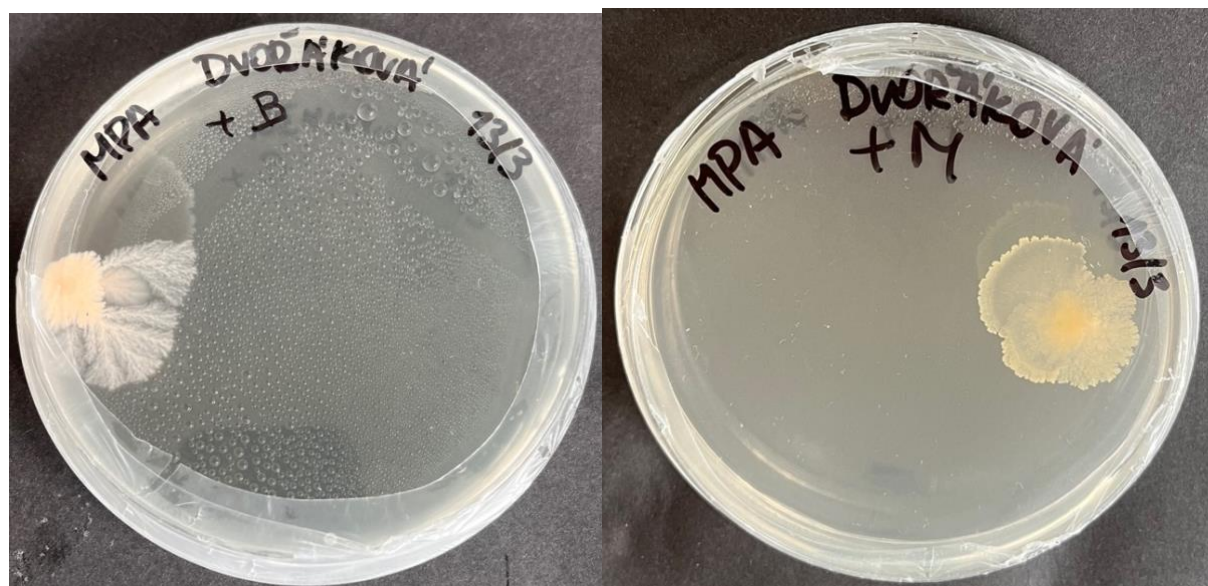
(Pozn. MFU – McFarland jednotek, např.: 0,5 MFU odpovídá 1×10^8 KTJ)

Nejvyšší množství buněk bylo pozorováno u produktu Neogen jak už v MRS médiu, tak v médiu NB. Tento závěr odráží charakter výrobku plátýnkové masky, která byla vytřepaná do sterilní vody a také vysoká koncentrace mikroorganismů deklarovaným výrobcem. Nejmenší nárůst buněk byl zaznamenávám u výrobku Benton krém, nejspíše z důvodu povahy produktu krém, se kterým se obtížněji pracuje a předpokládá se, že obsahuje více konzervantů, které brání kultivaci.

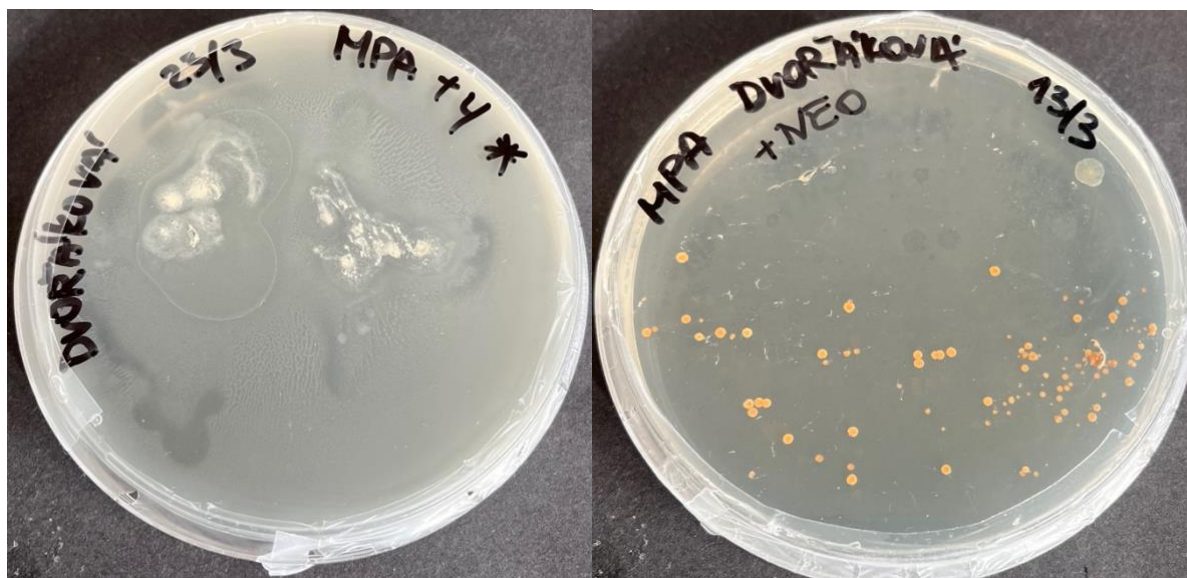


Obrázek 12: Vlevo vzorek La Rosche – Posay zaočkován do Nutrient Broth média, vpravo – vzorek Avene zaočkován do Nutrient Broth média

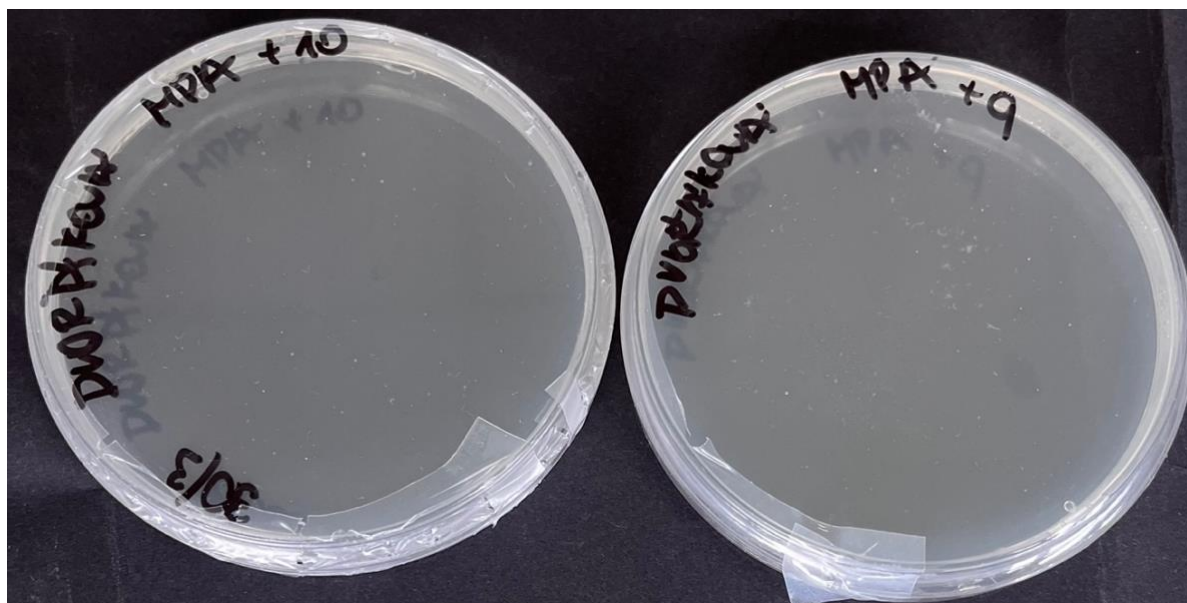
V případě kultivace na tuhém MPA médiu byl pro výrobky Benton maska, Neogen, Mechnikov a Benton krém pozorován nárůst kolonií při ředění 10^{-3} (Obrázky 13, 14). V případě krémů Avene a La Rosche – Posay nedošlo k nárůstu kolonií (Obrázek 15), což potvrzuje výsledky z tekutého média. Shrnutí růstu buněk na médiu MPA je uvedeno v Tabulce 14.



Obrázek 13: Vlevo – růst kolonií buněk z výrobku Benton krém, vpravo – růst kolonií buněk z výrobku Mechnikov



Obrázek 14: Vlevo – růst kolonií buněk z výrobku Benton maska, vpravo – růst kolonií buněk z výrobku Neogen



Obrázek 15: Vlevo – růst kolonií buněk z výrobku Avene, vpravo – růst kolonií buněk z výroku La Roche – Posay

Tabulka 14: Shrnutí růstu buněk neředěných a ředěných výrobků na MRS médiu

Výrobek	Ředění	MPA médium		
Benton krém	10^0	–		
	10^{-1}	–		
	10^{-2}	–		
	10^{-3}	++	–	–
Mechnikov	10^0	–		
	10^{-1}	–		
	10^{-2}	++		

	10^{-3}	+	++	+
Neogen	10^0	++		
	10^{-1}	-		
	10^{-2}	-		
	10^{-3}	+	+++	++
Benton maska	10^0	++		
	10^{-1}	++		
	10^{-2}	++++		
	10^{-3}	+++++	++	++

(Pozn. Symbol – odpovídá $<100 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (bez růstu mikroorganismů), + odpovídá $10^2 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (nepatrný růst mikroorganismů), ++ odpovídá $10^3 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (mírný růst mikroorganismů), +++ odpovídá $10^4 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (silný růst mikroorganismů), ++++ odpovídá $10^5 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (masivní růst mikroorganismů), symbol C odpovídá $10^6 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (povrch pokrytý mikroorganismy))

Na výsledky kultivací jak v tekutém médiu, tak na tuhém médiu, má zřejmě vliv přítomnost konzervantů v kosmetických výrobcích, které jsou přidávány do produktů dle legislativy, aby nedošlo k pomnožení nežádoucí mikroflóry.

V případě výrobků s obsahem postbiotik je výsledek kultivace očekávatelný, protože ve výrobcích nejsou obsaženy živé buňky pouze jejich částí.

5.2 Izolace DNA

Z bakteriálních výrobků Benton (maska), Mechnikov, Neogen a Benton dle postupu 4.2.3 byly připraveny hrubé lyzáty buněk ve čtyřech opakováních.

DNA z nich byla izolována fenolovou extrakcí dle 4.2.5 s následným přesrážením ethanolem dle 4.2.5.1, izolace magnetickým nosičem dle 4.2.6 a pomocí Omni Bacterial DNA Purification kitu dle 4.2.7. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky.

5.2.1 Stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA spektrofotometricky

Na přístroji NanoDrop byla proměřena absorbance DNA v rozmezí vlnových délek 220-320 nm. Výsledky stanovení pro jednotlivé výrobky jsou uvedeny v Tabulkách 15, 16, 17 a 18. F značí izolaci metodou fenolové extrakce. M značí izolaci magnetickými částicemi. K značí izolaci pomocí kitu.

5.2.1.1 Benton – krém

Byla proměřena absorbance DNA v rozmezí vlnových délek 220-320 nm pro DNA izolovanou fenolovou extrakcí, magnetickými částicemi a použitím komerčního kitu z výrobku Benton – krém. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15: Spektrofotometrické stanovení DNA izolované metodou fenolové extrakce (F), magnetickými částicemi (M) a izolace komerčním kitem (K) z kosmetického výrobku Benton – krém

Výrobek		Metoda izolace DNA	A 260/280 nm	A 260 nm	A 280 nm	c DNA [ng·μl ⁻¹]
Benton – krém	1	F	1,61	5,232	3,259	261,6
	2		1,59	4,483	2,817	224,2
	3		1,67	4,387	2,629	219,4
	1	M	1,48	0,230	0,155	11,5
	2		1,46	0,081	0,062	15,0
	3		1,42	0,525	0,370	26,3
	1	K	2,01	3,065	1,527	153,2
	2		2,08	2,320	1,118	116,0
	3		2,06	3,118	1,517	155,9

DNA byla izolována v koncentraci vhodné pro amplifikaci v PCR. Poměr A_{260/280} nm indikuje znečištění proteiny.

5.2.1.2 Mechnikov – krém

Byla proměřena absorbance DNA v rozmezí vlnových délek 220-320 nm pro DNA izolovanou fenolovou extrakcí, magnetickými částicemi a použitím komerčního kitu z výrobku Mechnikov. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16: Spektrofotometrické stanovení DNA izolované metodou fenolové extrakce (F), magnetickými částicemi (M) a izolace komerčním kitem (K) z kosmetického výrobku Mechnikov

Výrobek		Metoda izolace DNA	A 260/280 nm	A 260 nm	A 280 nm	c DNA [ng·μl ⁻¹]
Mechnikov	1	F	1,60	2,141	1,341	107,1
	2		1,45	1,909	1,314	95,5
	3		1,48	2,385	1,614	119,2
	1	M	1,41	0,223	0,158	11,1
	2		1,32	0,766	0,581	38,3
	3		1,40	0,503	0,360	25,2
	1	K	2,00	11,327	5,667	566,4
	2		2,00	10,672	5,345	533,6
	3		2,01	5,944	2,957	297,2

DNA byla izolována v koncentraci vhodné pro amplifikaci v PCR. Poměr A_{260/280} nm indikuje znečištění proteiny.

5.2.1.3 Neogen

Byla proměřena absorbance DNA v rozmezí vlnových délek 220-320 nm pro DNA izolovanou fenolovou extrakcí, magnetickými částicemi a použitím komerčního kitu z výrobku Neogen. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17: Spektrofotometrické stanovení DNA izolované metodou fenolové extrakce (F), magnetickými částicemi (M) a izolace komerčním kitem (K) z kosmetického výrobku Neogen

Výrobek		Metoda izolace DNA	A 260/280 nm	A 260 nm	A 280 nm	c DNA [ng·μl ⁻¹]
Neogen	1	F	1,49	2,768	1,856	138,4
	2		1,66	3,351	2,015	167,6
	3		1,50	3,539	2,353	177,0
	1	M	1,36	0,376	0,277	18,8
	2		1,35	0,016	0,132	26,0
	3		1,39	0,499	0,359	24,9
	1	K	2,00	1,911	0,957	95,5
	2		2,14	1,740	0,813	87,0
	3		1,88	2,063	1,079	101,7

DNA byla izolována v koncentraci vhodné pro amplifikaci v PCR. Poměr A_{260/280} nm indikuje znečištění proteiny.

5.2.1.4 Benton – maska

Byla proměřena absorbance DNA v rozmezí vlnových délek 220-320 nm pro DNA izolovanou fenolovou extrakcí, magnetickými částicemi a použitím komerčního kitu z výrobku Benton – plátýnková maska. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 18.

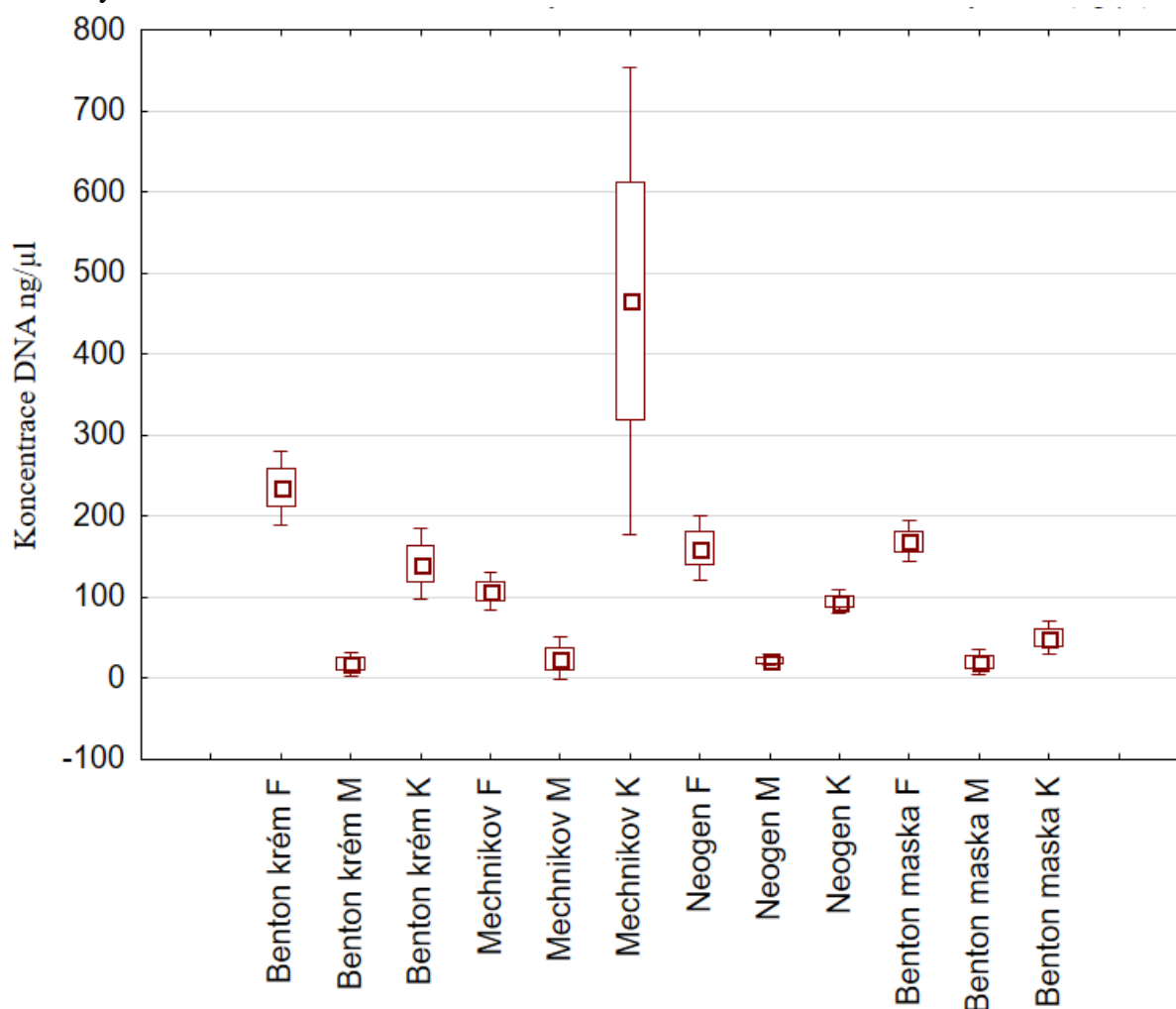
Tabulka 18: Spektrofotometrické stanovení DNA izolované metodou fenolové extrakce (F), magnetickými částicemi (M) a izolace komerčním kitem (K) z kosmetického výrobku Benton – maska

Výrobek		Metoda izolace DNA	A 260/280 nm	A 260 nm	A 280 nm	c DNA [ng·μl ⁻¹]
Benton – maska	1	F	1,66	3,296	1,983	164,8
	2		1,52	3,678	2,426	183,9
	3		1,67	3,190	1,910	159,5
	1	M	1,36	0,592	0,436	29,6
	2		1,34	0,309	0,231	15,5
	3		1,38	0,312	0,226	15,6
	1	K	2,19	1,237	0,565	61,9
	2		2,23	0,945	0,424	47,3
	3		2,74	0,823	0,300	41,2

DNA byla izolována v koncentraci vhodné pro amplifikaci v PCR. Poměr $A_{260/280}$ nm indikuje znečištění proteiny.

5.2.1.5 Shrnutí a srovnání koncentrace a čistoty bakteriální DNA

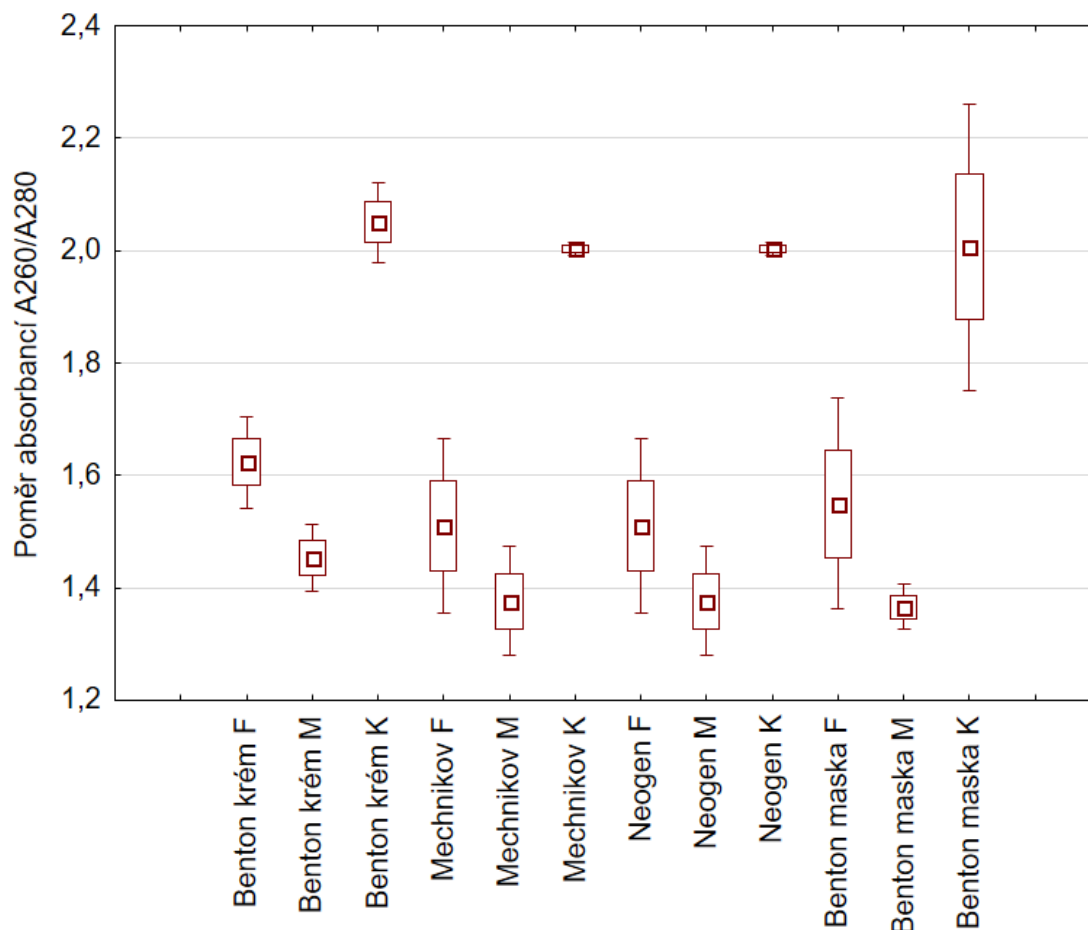
Spektrofotometricky byla prokázána přítomnost DNA ve všech zvolených výrobcích a byla změřena její koncentrace. Průměrné hodnoty koncentrací pro všechny výrobky jsou uvedeny v Grafu 1 a v Tabulce 19 a průměrné hodnoty poměru absorbancí A_{260} nm/ A_{280} nm jsou uvedeny v Grafu 2 a v Tabulce 20.



Graf 1: Průměrné hodnoty koncentrací DNA izolované z výrobků ($ng \cdot \mu l^{-1}$)

Tabulka 19: Průměrné hodnoty koncentrací DNA izolované z výrobků ($ng \cdot \mu l^{-1}$)

Způsob izolace	Benton krém	Mechnikov	Neogen	Benton maska
Fenolová extrakce (F)	235,1 ± 23,1	107,2 ± 11,8	161,0 ± 20,1	169,4 ± 12,8
Magnetické částice (M)	17,6 ± 7,7	24,8 ± 13,6	23,2 ± 3,8	20,2 ± 8,1
Komerční kit (K)	141,7 ± 22,3	465,7 ± 146,8	94,7 ± 7,3	50,1 ± 10,6



Graf 2: Průměrné hodnoty poměru absorbančí A260 nm/A280 nm DNA izolované z výrobků

Tabulka 20: Průměrné hodnoty poměru absorbančí A260 nm/A280 nm DNA izolované z výrobků

Způsob izolace	Benton krém	Mechnikov	Neogen	Benton maska
Fenolová extrakce (F)	1,62 ± 0,04	1,51 ± 0,07	1,51 ± 0,07	1,55 ± 0,09
Magnetické částice (M)	1,45 ± 0,03	1,37 ± 0,04	1,37 ± 0,04	1,36 ± 0,02
Komerční kit (K)	2,05 ± 0,03	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,13

DNA byla izolována v dostatečné koncentraci i čistotě pro testování v PCR.

Nejvyšší koncentrace byla dosažena ve výrobku Mechnikov a to pomocí izolace komerčním kitem. Naopak nejnižší koncentrace DNA byly získány pomocí izolace magnetickými částicemi, a to u všech výrobků.

Poměr hodnot absorbančí A260nm/A280nm určuje čistotu získané DNA a jeho rozptyl by se měl u čisté DNA pohybovat mezi 1,8 – 2,0. Pokud je tento poměr menší, než 1,8, indikuje

tento závěr znečištění proteiny. Pokud je tento poměr vyšší jak 2,0 značí tento výsledek obsah RNA.

Nejvyšší čistoty DNA bylo dosaženo pomocí izolace komerčním kitem, což se očekávaný výsledek, protože sám výrobce Bacterial DNA Purification kitu slibuje po dodržení všech podmínek izolace čistotu DNA mezi 1,7-1,9.

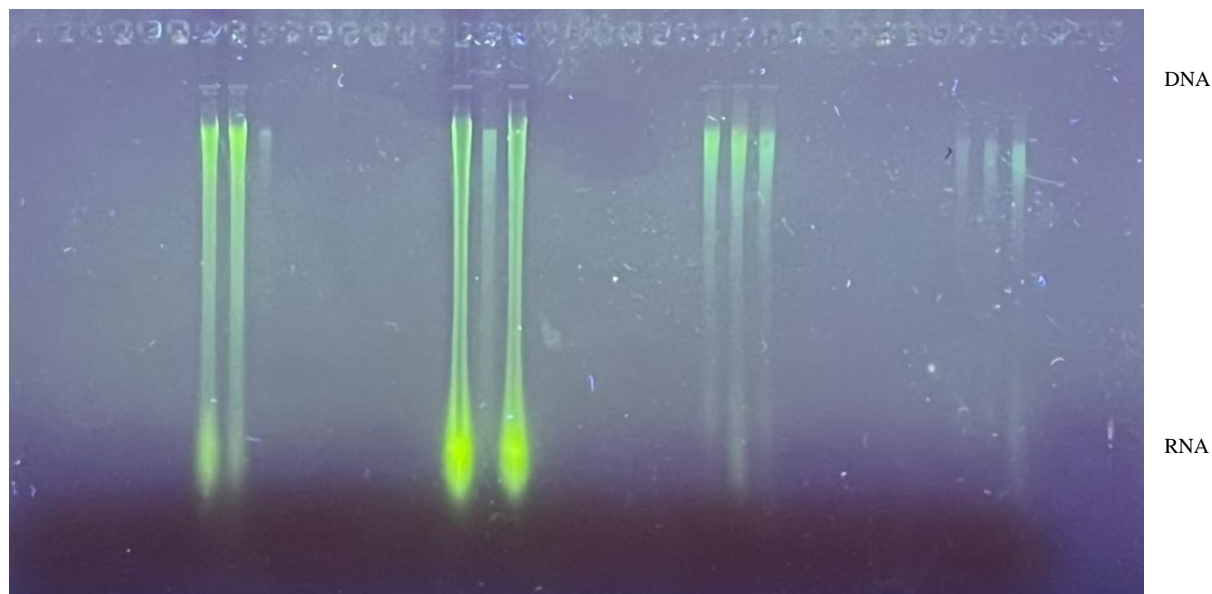
Pokud bychom se snažily porovnat množství nárůstu buněk s následným množstvím vyizolované DNA, tak u produktu Benton krém, u kterého jsem zaznamenaly nejnižší nárůst buněk bylo nakonec možné získat velké množství DNA pomocí fenolové extrakce i komerčním kitem.

K významnému znečištění vyizolované DNA došlo zřejmě v důsledku komplexní matrice výrobku, která obsahuje vysoké množství látek, které jsou při izolaci hůře odstranitelné (tuky, konzervační látky, emulgátory).

5.2.2 Ověření intaktnosti izolované DNA

Pomocí agarózové gelové elektroforézy (0,8% agarózový gel) byla DNA ve vzorcích sbírkových kmenů (Obrázek 16).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36



Běh č.	DNA	Izolace	mDNA [ng·μl ⁻¹]	Intaktnost	Běh č.	DNA	Izolace	mDNA [ng·μl ⁻¹]	Intaktnost
1	Benton krém	F	100,0	-	19	Neogen	F	100,0	-
2			100,0	-	20			100,0	-
3			100,0	-	21			100,0	-
4		M	11,5	-	22		M	18,8	-
5			15,0	-	23			26,0	-
6			26,3	-	24			24,9	-
7			153,2	+++	25			K	95,5

8			116,0	+++	26			87,0	++
9			85,0	+	27			101,7	++
10	Mechnikov	F	107,1	-	28	Benton maska	F	100,0	-
11			95,5	-	29			100,0	-
12			100,0	-	30			100,0	-
13		M	11,1	-	31		M	29,6	-
14			38,3	-	32			15,5	-
15			25,2	-	33			15,6	-
16		K	566,4	+++	34		K	41,2	+
17			150,0	++	35			47,3	+
18			533,6	+++	36			61,9	++

Obrázek 16: Gelová elektroforéza DNA – ověření intaktnosti DNA izolované fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K) (- nedetekován PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

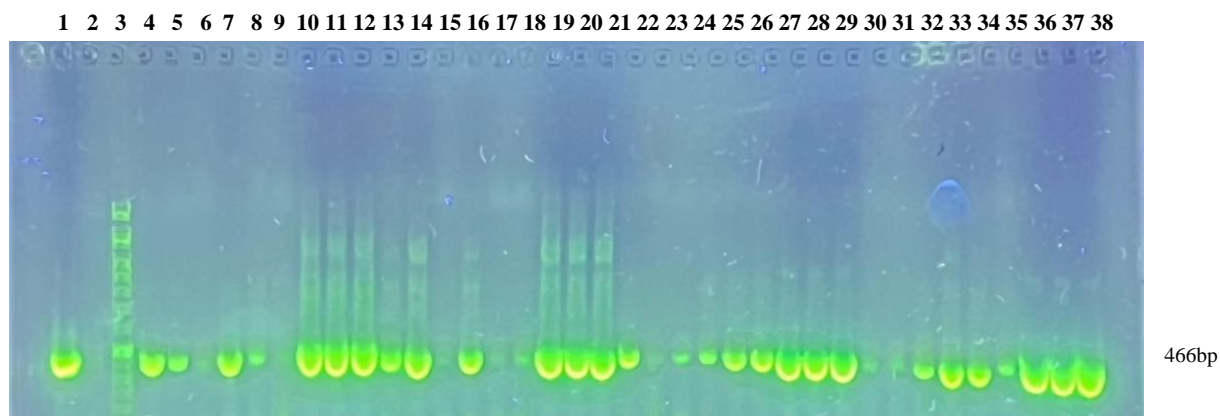
Z důvodu, kvality tisku nebyla vidět DNA, proto byla zvýrazněna.

Stanovení intaktnosti DNA bylo prováděno na závěr práce, proto u některých vzorků není použita nejvyšší koncentrace DNA pro nedostatek vzorku. Kvůli nedostatečné koncentraci DNA u metod izolace fenolovou extrakcí a izolace pomocí magnetických nosičů nelze detekovat DNA. U vzorku izolované pomocí komerčního kitu lze vidět intaktní DNA.

5.3 Prokázání přítomnosti DNA domény *Bacteria* metodou PCR

Byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena PCR dle postupu 4.3.1. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná ze sbírkového kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039.

Metodou PCR, za pomoci primerů specifických pro doménu *Bacteria* (Feub, Reub), byla prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích DNA izolované z výrobků (Benton krém, Mechnikov, Neogen a Benton maska) v plné koncentraci (viz. 5.2.1) [125]. Velikost specifických produktů PCR byla 466 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 7039 vyředěná na $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Detekce produktů PCR je uvedena na Obrázku 17.



466bp

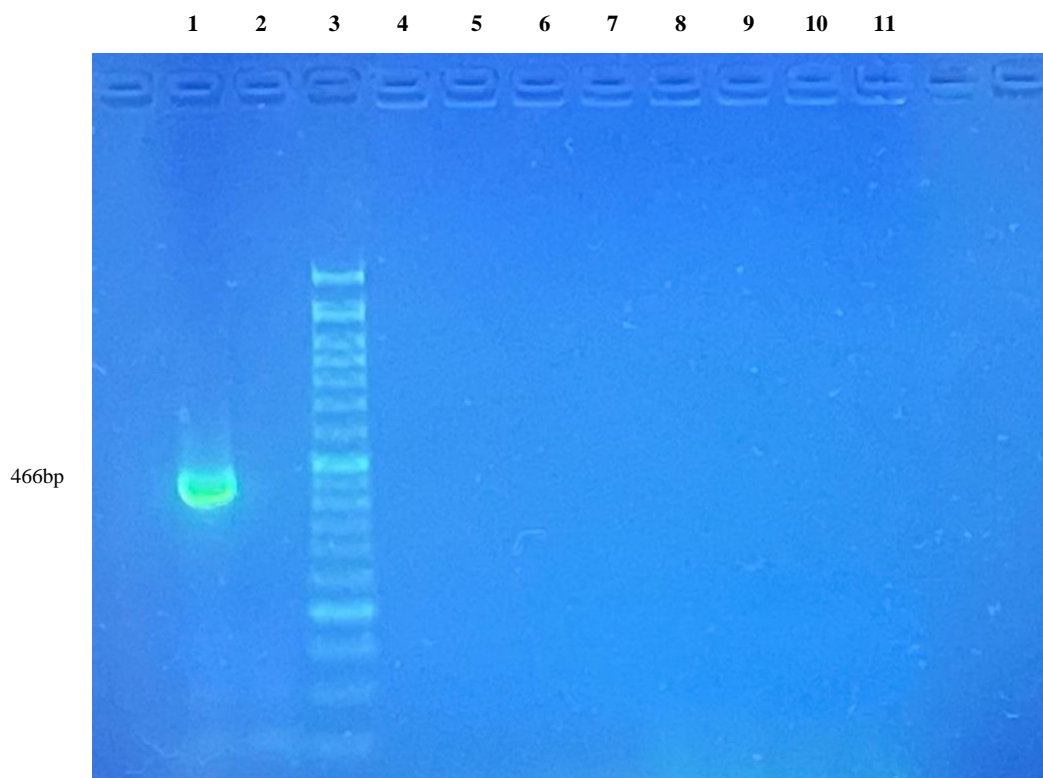
Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt	Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt		
1	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+++	22	Neogen	F	++		
2	NK		-	23			-		
3	DNA standart			24			+		
4	Benton krém	F	++	25		M	+		
5			++	26			+++		
6			-	27			+++		
7		M	+++	28			K	+++	
8			++	29				+++	
9			-	30				+++	
10		Mechnikov	K	+++		Benton maska	F	+	
11				+++				32	+
12				+++				33	++
13	F		++	M	+++				
14			+++		35		+++		
15			+		36		+		
16	M	+++	K		+++				
17		-			38		+++		
18		+			39		+++		
19	K	+++							
20		+++							
21		+++							

Obrázek 17: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp) amplifikována byla DNA z výrobků Benton krém, Mechnikov, Neogen a Benton maska fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K) (- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

Po amplifikaci DNA izolované pomocí magnetických částic a fenolovou extrakcí byly detekovány produkty PCR slabší intenzity. Naopak po amplifikaci DNA izolované pomocí komerčního kitu byly detekovány produkty PCR vysoké intenzity. Tyto výsledky odrážejí čistotu získané DNA, kdy ve vzorcích izolované komerčním kitem je vždy DNA nejvyšší čistoty. Ve všech výrobcích byla prokázána přítomnost bakteriální DNA. Můžeme se domnívat, že u některých vzorků izolovaných pomocí magnetických částic a fenolovou extrakcí nedošlo k odstranění všech inhibitorů PCR reakce, proto byla účinnost amplifikace snížena.

Z DNA z výrobku s deklarovaným obsahem postbiotik (La Roche-Posay) byla provedena amplifikace pomocí PCR v reálném čase s primery Feub a Reub [125]. Jako matrice DNA byly použity vzorky připravené v tekutém médiu MRS a ve sterilní vodě. Vzorky byly podrobeny teplotní lyzi při 99 °C po dobu 15 minut (viz 4.2.4).

Velikost specifických produktů PCR byla 466 bp. Detekce PCR je uvedena na Obrázky 18. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 7039 vyředěná na 10 ng·μl⁻¹.



Běh č.	DNA	PCR produkt
1	PK [10 ng·μl ⁻¹]	+++
2	NK	-
3	DNA standart	
4	La Rosche-Posay ve vodě	-
5		-
6		-
7		-
8	La Rosche-Posay v médiu	-
9		-
10		-
11		-

Obrázek 18: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp) amplifikována byla DNA z výrobku La Rosche-Posay (- nedetekován PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

Agarósovou gelovou elektroforézou nebyla prokázána přítomnost PCR produktů specifických pro doménu *Bacteria*.

Tato reakce byla provedena opakovaně s tím rozdílem, že vzorky v médiu a ve vodě nebyly před přidáním do PCR směsi vystaveny teplotní lyzi. Následná PCR reakce byla provedena stejných způsobem.

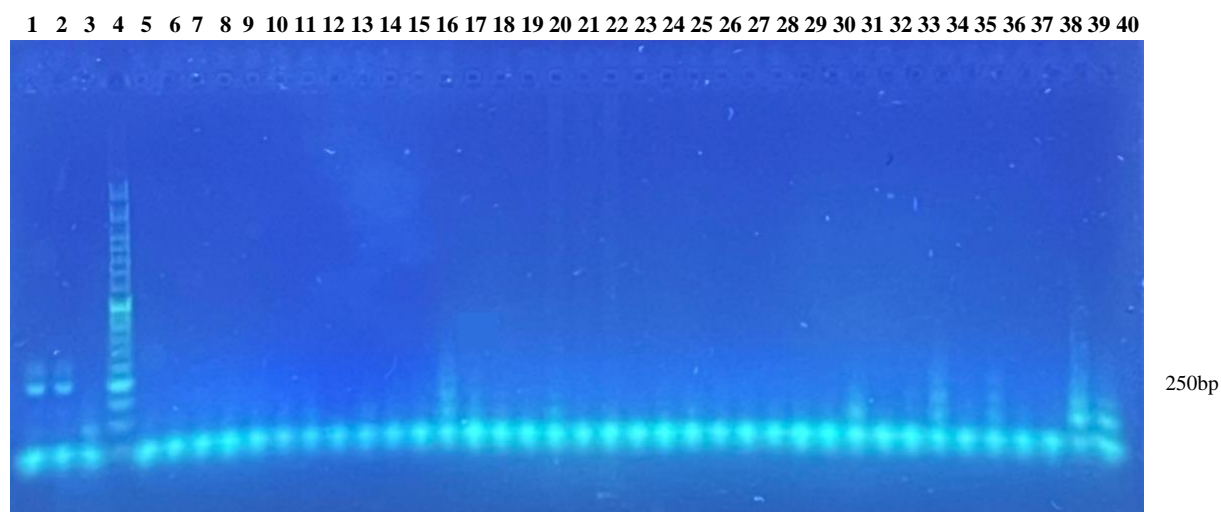
Následky výsledek PCR reakce byl naprosto shodný s prvním pokusem, a to že se ve vzorcích nevyskytovala žádná bakteriální DNA, což bylo prokázáno pomocí agarosové gelové elektroforézy. Další PCR reakce nebyly prováděny.

5.4 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Lactobacillus* metodou PCR

5.4.1 Primery LbLMA, R 16-1

Byly připraveny směsi pro PCR s DNA matricí izolovanou fenolovou extrakcí, pomocí magnetických částic a komerčním kitem z výrobků Benton krém, Mechnikov, Neogen a Benton maska v plné koncentraci (viz. 5.2.1). S primery specifickými pro rod *Lactobacillus* (LbLMA, R 16-1) [129] byla provedena PCR dle postupu 4.3.2. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 7039 vyředěná na $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Byly amplifikovány specifické produkty PCR o délce 250 bp. Snímek agarózového gelu s nanesenými produkty PCR je uveden na Obrázku 19.



Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt	Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt
1	PK [$10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]		+++	23	Neogen	F	-
2	PK [$10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]		+++	24			-
3	NK		-	25			-
4	DNA standart			26		M	-
5	Benton krém	F	-	27			-
6			-	28			-
7			-	29		-	
8		M	K	-		30	-
9				-		31	+/-
10				-		32	-
11		Benton maska	F	-		33	-
12				+/-		34	+/-
13			+/-	35		-	
14			M	-		36	+/-
15	-			37		-	
16	-	38		-			
	Mechnikov	F			K	-	

17		M	-	39			+/-
18			-	40			+/-
19			-				
20		K	-				
21			-				
22			-				

Obrázek 19: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* (250 bp) amplifikována byla DNA z výrobků Mechnikov, Neogen a Benton maska fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K)

(- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

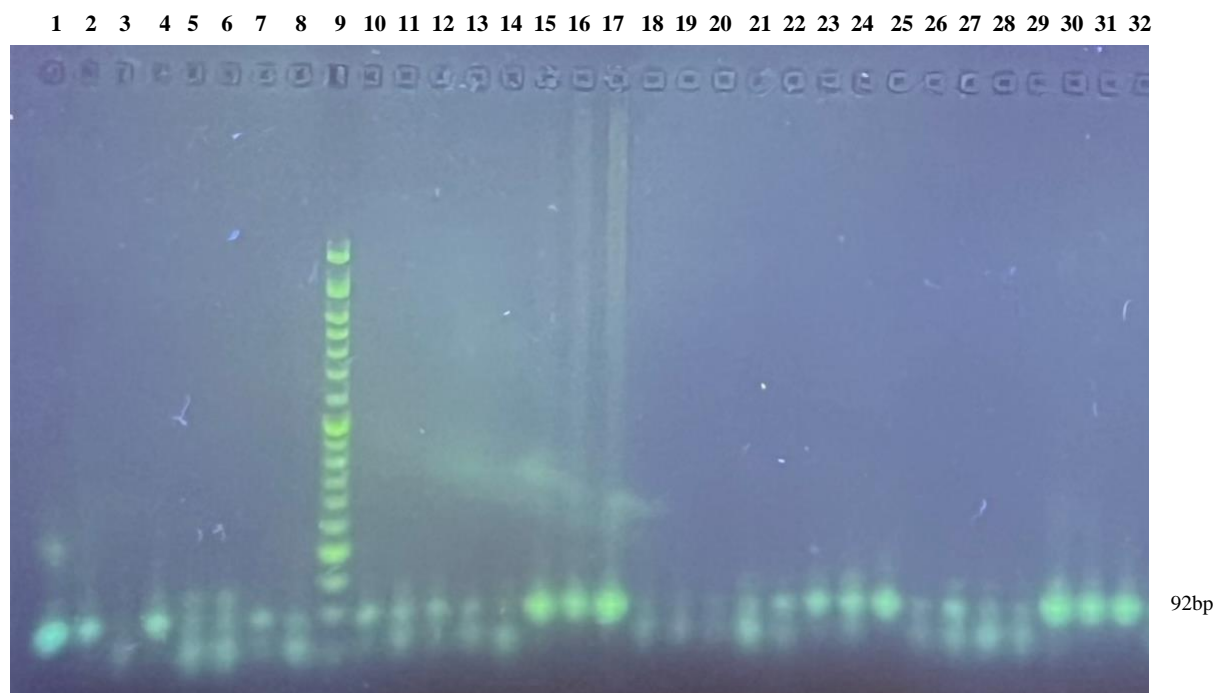
Agarósovou gelovou elektroforézou nebyla prokázána přítomnost PCR produktů specifických pro rod *Lactobacillus*. Produkty PCR specifické velikosti byly detekovány pouze v případě amplifikace DNA izolované ze sbírových kmenů (pozitivní kontrola).

5.4.2 Primery F_allact, R_allact

Byly vybrány nové primery – pro rod *Lactobacillus* (F_allact, R_allact) [125]. PCR reakce byla provedena obdobně za použití nových primerů.

Jako pozitivní kontroly byly použity DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus casei* CCM 7088, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T, *Lactobacillus delbrueckii* CCM 7190 a *Lactobacillus pentosus* CCM 4619 všechny vyředěné na 10 ng·μl⁻¹.

Byly amplifikovány specifické produkty PCR o délce 92 bp. Snímek agarózového gelu s nanesenými produkty PCR je uveden na Obrázku 20.



Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt	Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt
1	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+++	18	Mechnikov	M	+/-
2	PK [10 ng·μl ⁻¹]		++	19			+/-
3	NK		-	20			+/-
4	PK [10 ng·μl ⁻¹]		++	21		F	+
5	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+	22			+
6	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+	23		K	++
7	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+	24			++
8	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+	25			++
9	DNA standart			26	Neogen	F	+/-
10	Benton maska	F	+	27			+
11			+	28		+	
12			+	29		+/-	
13		M	+	30		+++	
14			+/-	31		+++	
15		K	+++	32		+++	
16			+++				
17			+++				

Obrázek 20: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* (92 bp) amplifikována byla DNA z výrobků Mechnikov, Neogen a Benton maska fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K) (- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

Po amplifikaci DNA izolované pomocí magnetických částic a izolované pomocí fenolem u některých vzorků byly detekovány produkty PCR slabší intenzity. Naopak po amplifikaci DNA izolované pomocí komerčního kitu byly detekovány produkty PCR vysoké intenzity. Ve všech výrobcích byla prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*.

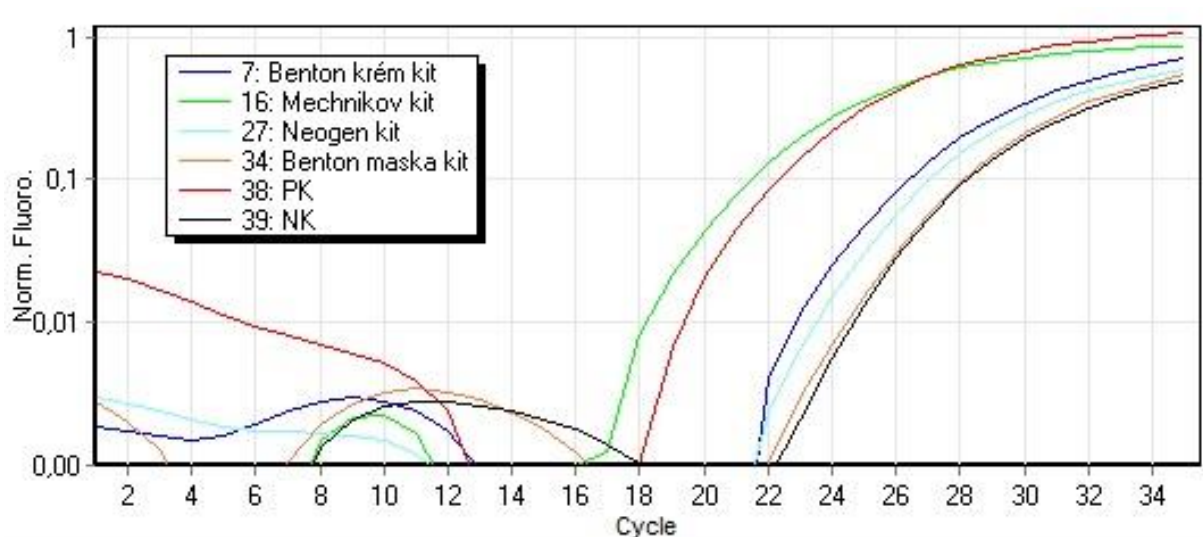
5.5 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* metodou q-PCR

Metodou PCR v reálném čase za pomoci primerů specifických pro rod *Bifidobacterium* [126], byla prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích DNA izolované z výrobků (Benton krém, Mechnikov, Neogen a Benton maska) v plné koncentraci (viz. 5.2.1).

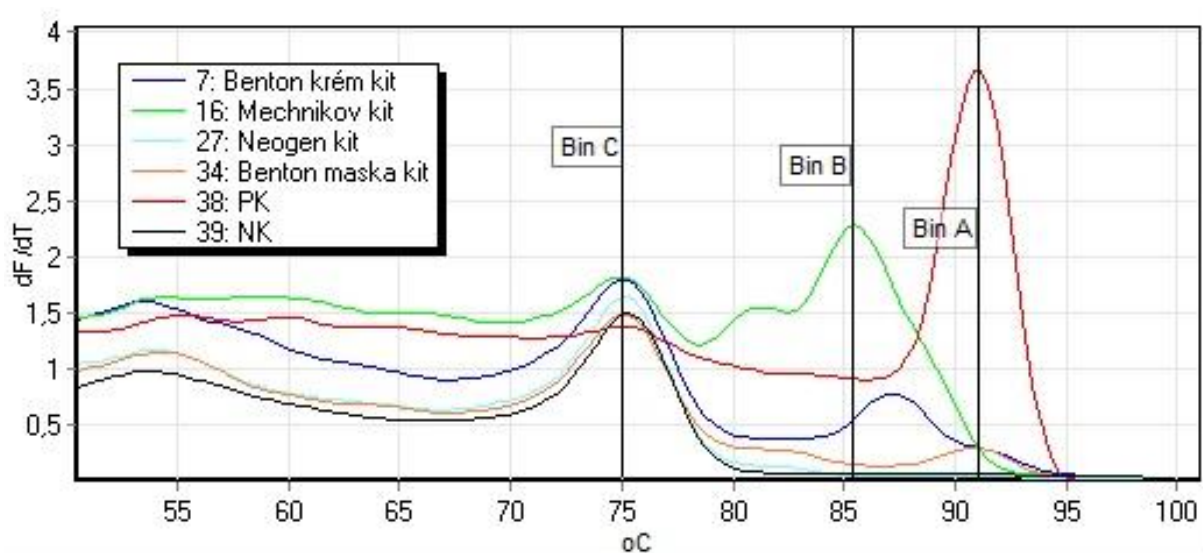
Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Bifidobacterium breve* CCM 7825 vyředěná na 10 ng·μl⁻¹.

Amplifikační křivka q-PCR je uvedena na Obrázku 21 a příslušná analýza teploty tání ampliconů na Obrázku 22.

Velikost specifických produktů PCR byla 914 bp. Snímek agarózového gelu s nanesenými produkty PCR je uveden na Obrázku 23.

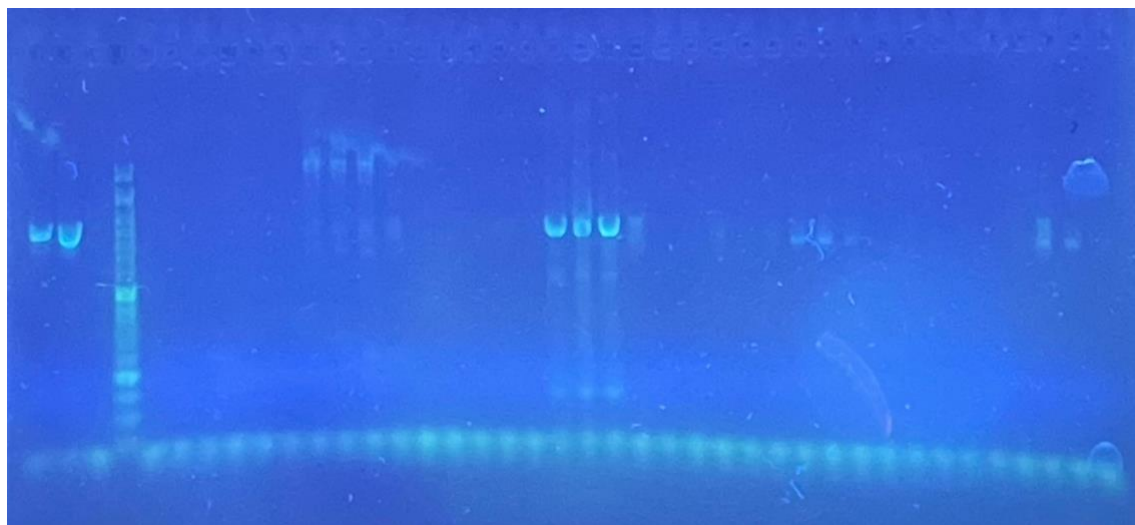


Obrázek 21: Amplifikační křivka rod *Bifidobacterium*



Obrázek 22: Analýza křivky tání rod *Bifidobacterium*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



914bp

Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt	Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt	
1	PK [10 ng·µl ⁻¹]		+++	23	Neogen	F	+	
2	PK [10 ng·µl ⁻¹]		+++	24			-	
3	NK		-	25			-	
4	DNA standart			26		M	+/-	
5	Benton krém	F	-	27			-	
6			-	28			+/-	
7			-	29			+	
8		M	-	30		+		
9			-	31		+		
10			-	32		-		
11		Mechnikov	K	++	33	Benton maska	F	-
12				++	34			-
13				++	35			-
14			F	-	36	M	-	
15	-			37	-			
16	-			38	+			
17	M		-	39	K	+		
18			-	40		+/-		
19			-					
20	K		+++					
21		+++						
22		+++						

Obrázek 23: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* (914 bp) amplifikována byla DNA z výrobků Benton krém Mechnikov, Neogen a Benton maska fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K)

(- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

Po amplifikaci DNA *Bifidobacterium* a tepelné denaturaci amplikonu byly zjištěny hodnoty teploty tání amplikonů ($T_m = 75,0$ °C, $T_m = 87,2$ °C, $T_m = 91,0$ °C). Teplota tání produktu PCR odráží druh *Bifidobacterium*.

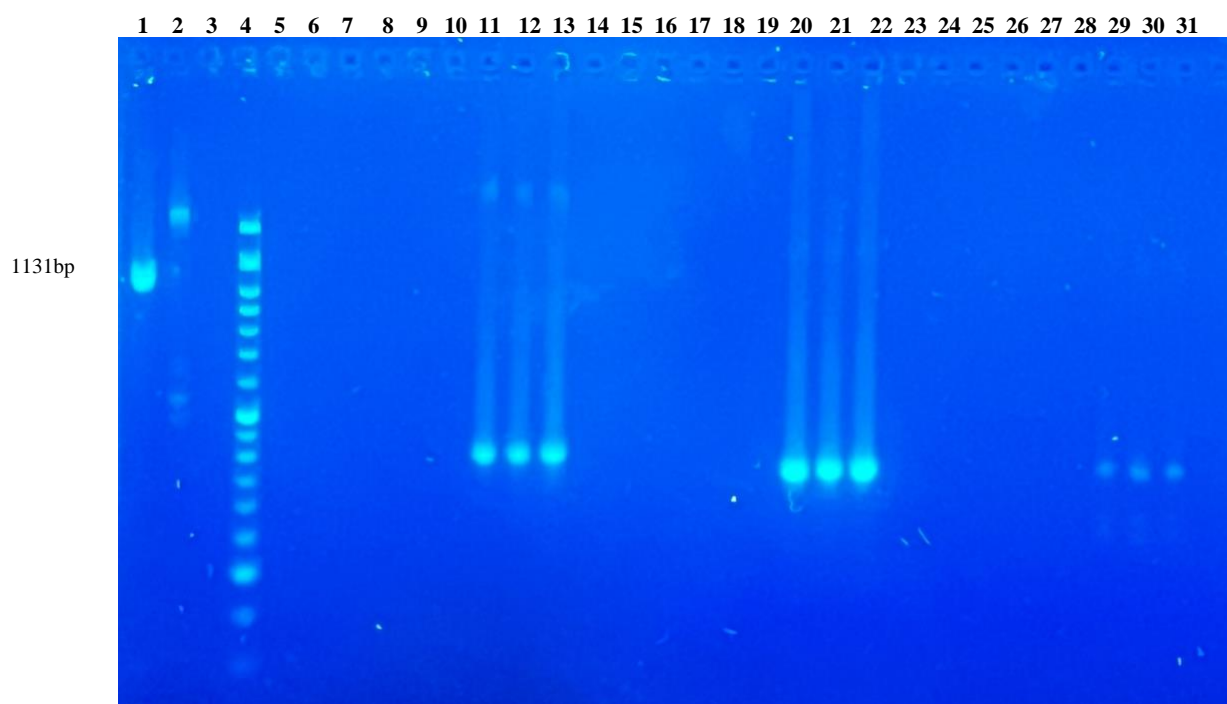
Po amplifikaci DNA izolované pomocí magnetických částic a izolované pomocí fenolem nebyly detekovány produkty PCR specifických pro rod *Bifidobacterium*. Důvodem může být nedostatečná koncentrace zmíněné DNA ve vzorku nebo také vliv inhibitorů PCR.

Avšak po amplifikaci DNA izolované komerčním kitem byly detekovány PCR produkty střední intenzity specifické pro rod *Bifidobacterium*.

5.6 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Lactococcus* metodou PCR

Metodou PCR, za pomoci primerů specifických pro *Lactococcus lactis* [127], byla prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích DNA izolované z výrobků (Mechnikov, Neogen a Benton maska) v plné koncentraci (viz. 5.2.1.). Velikost specifických produktů PCR byla

1131 bp. Jako pozitivní kontroly byly použity DNA *Lactococcus lactis cremoris* CCDM 1004 a *Lactococcus delbrueckii lactis* CCDM 125 vyředěné na 10 ng·μl⁻¹. Snímek agarózového gelu s nanesenými produkty PCR je uveden na Obrázku 24.



Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt	Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt
1	PK <i>L. lactis cremoris</i>		+++	17	Neogen	K	-
2	PK <i>L. delbrueckii lactis</i>		+++	18			-
3	NK		-	19			-
4	DNA standart			20	Mechnikov	K	+++
5	Benton maska	F	-	21			+++
6			-	22			+++
7			-	23	-		
8	Neogen	F	-	24	Benton maska	M	-
9			-	25			-
10			-	26			-
11	Mechnikov	F	++	27	Neogen	M	-
12			++	28			-
13			++	29			+
14	Benton maska	K	-	30	Mechnikov	M	+
15			-	31			+
16			-				

Obrázek 24: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactococcus* (1131 bp) amplifikována byla DNA z výrobků Mechnikov, Neogen a Benton maska fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K) (- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

Byly zvoleny primery PALA-4 a PALA-14, které jsou specifické pro rod *Lactococcus lactis*, ale výsledky ukázaly, že v testovaných vzorcích není přítomen *Lactococcus lastis*.

Po amplifikaci DNA izolované pomocí magnetických částic byly detekovány produkty PCR specifických slabší intenzity pro rod *Lactococcus*.

Avšak po amplifikaci DNA izolované komerčním kitem a izolované fenolovou extrakcí byly detekovány PCR produkty vysoké intenzity specifické pro rod *Lactococcus*.

Pro porovnání lze na gelu vidět i DNA výroků Benton maska a Neogen, které neobsahují DNA rodu *Lactococcus*.

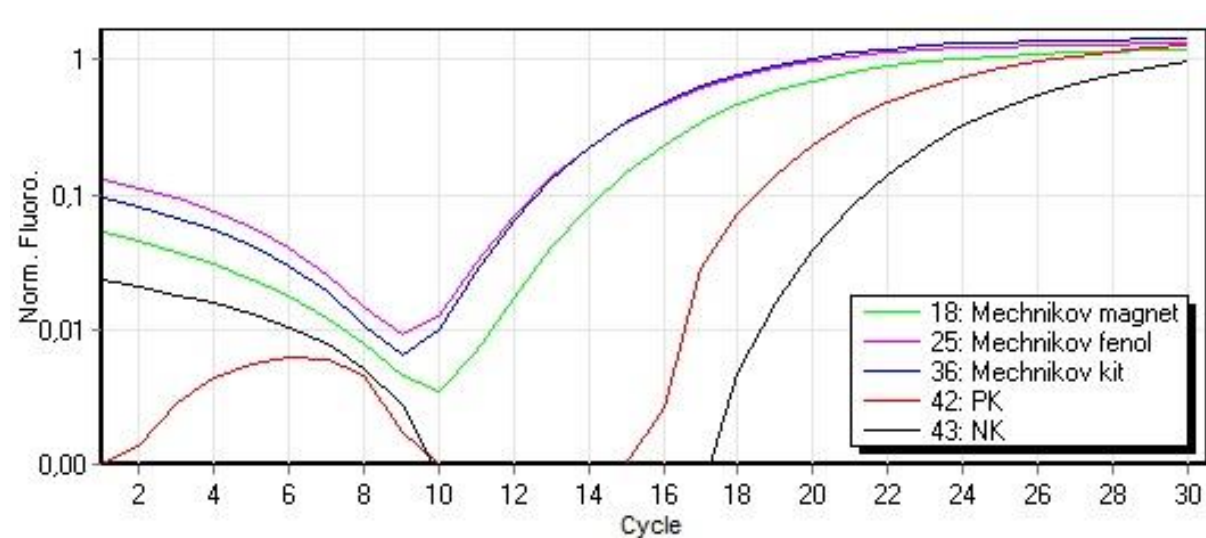
5.7 Prokázání přítomnosti DNA celkových kvasinek metodou q-PCR

Metodou PCR v reálném čase za pomoci primerů specifických pro kvasinky [128] byla prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích DNA izolované z výrobků (Benton krém, Mechnikov, Neogen a Benton maska) v plné koncentraci (viz. 5.2.1).

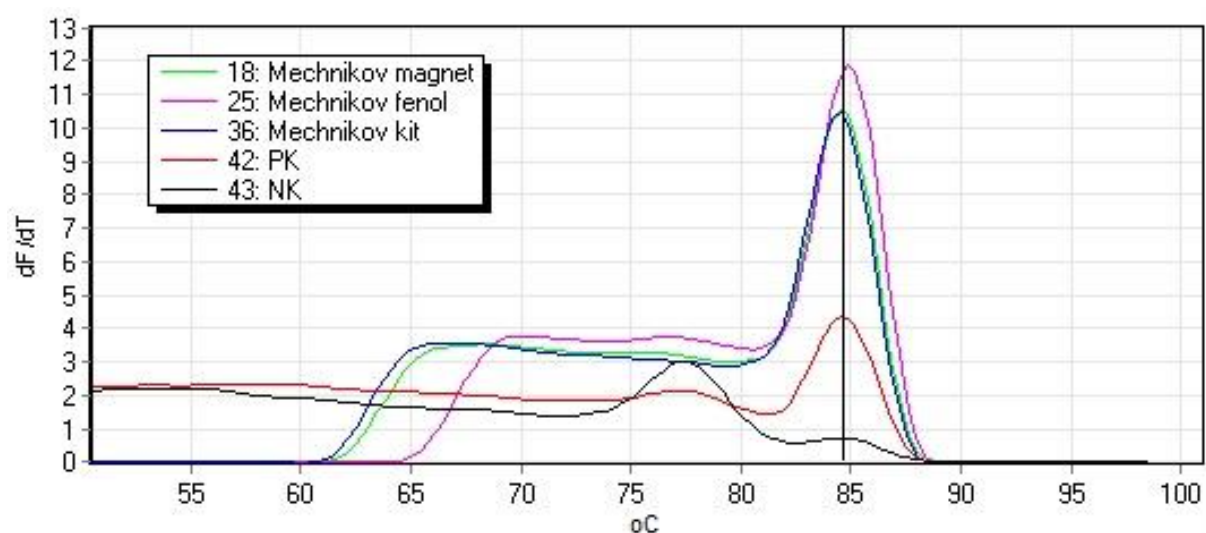
Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Candida glabrata* CCM 8270 vyředěná na $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Amplifikační křivka q-PCR je uvedena na Obrázku 25 a příslušná analýza teploty tání ampliconů na Obrázku 26.

Velikost specifických produktů PCR byla 152 bp. Snímek agarózového gelu s nanesenými produkty PCR je uveden na Obrázku 27.

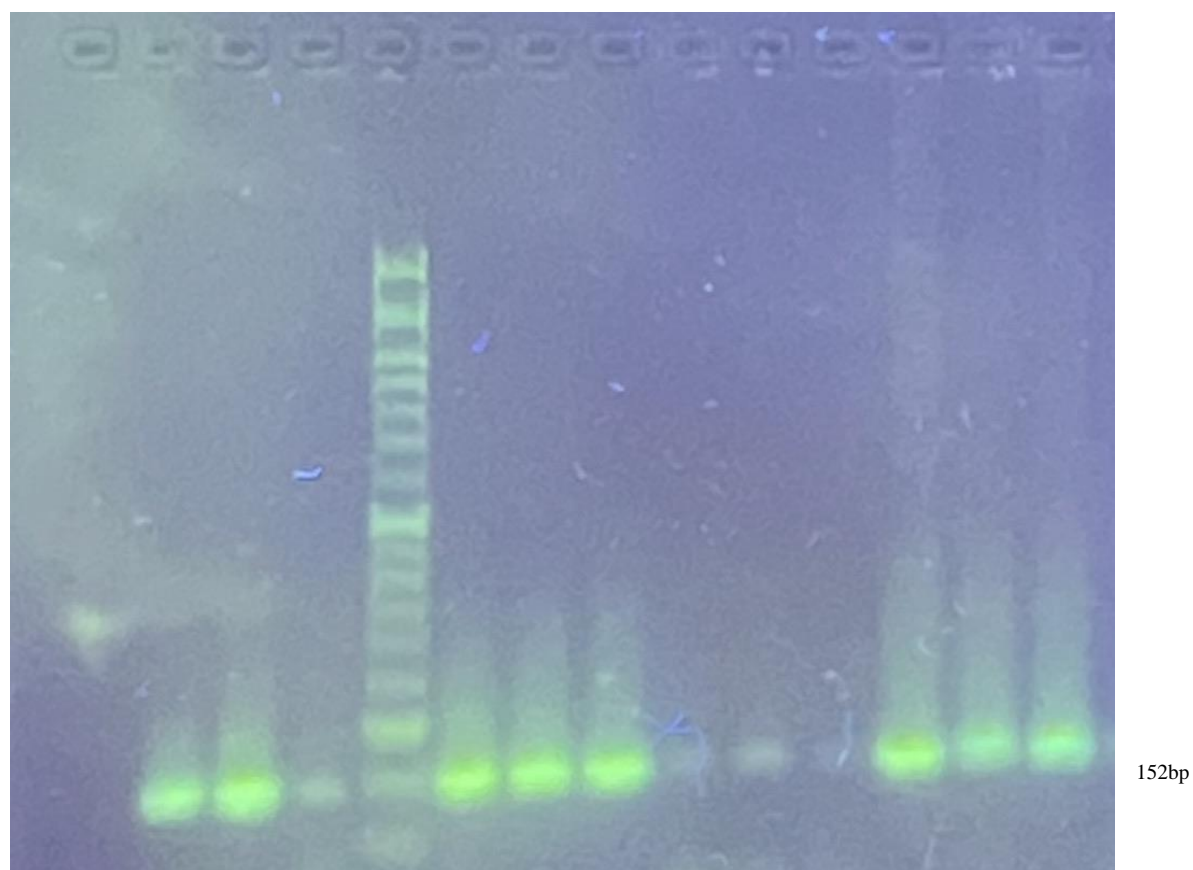


Obrázek 25: Amplifikační křivka kvasinky



Obrázek 26: Analýza křivky tání kvasinky

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt
1	NK		-
2	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+++
3	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+++
4	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+/-
5	DNA standart		

6	Mechnikov	F	+++
7			+++
8			+++
9	Mechnikov	M	+/-
10			+/-
11			+/-
12	Mechnikov	K	+++
13			+++
14			+++

Obrázek 27: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro kvasinky (152 bp) amplifikována byla DNA z výrobku Mechnikov fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K) (- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

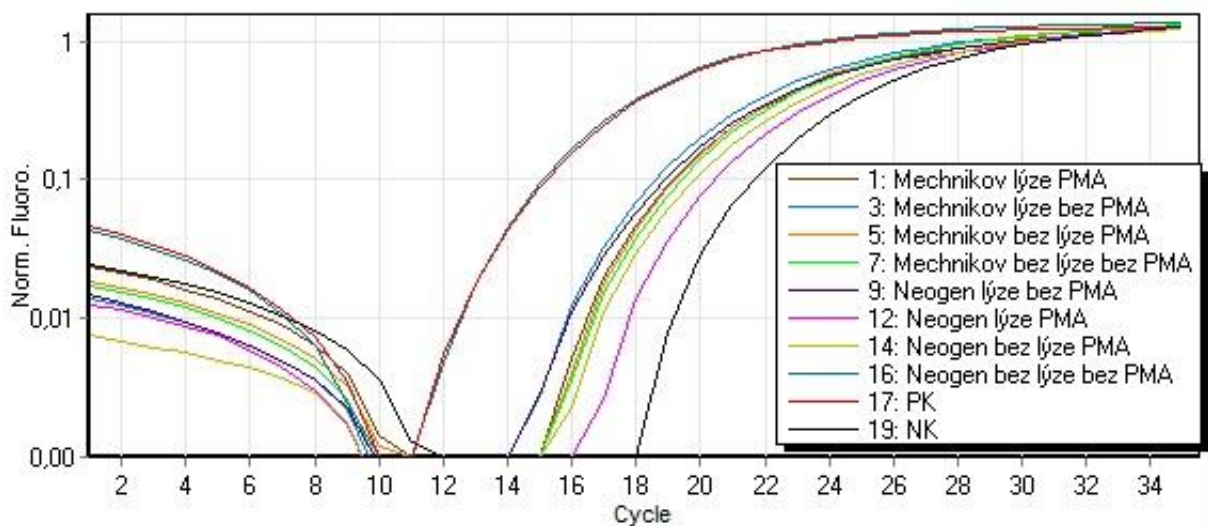
Po amplifikaci DNA kvasinek a tepelné denaturaci amplikonu byla zjištěna hodnota teploty tání amplikonů ($T_m = 84,5 \text{ }^\circ\text{C}$). Tato hodnota je shodná u všech amplikonů (celkem 10) získaných po amplifikaci DNA matrice o různé koncentraci.

Po amplifikaci DNA izolované pomocí magnetických částic byly detekovány produkty PCR slabší intenzity. Po amplifikaci DNA izolované pomocí komerčního kitu a izolované pomocí fenolu byly detekovány produkty PCR vysoké intenzity. Byla prokázána přítomnost DNA kvasinek.

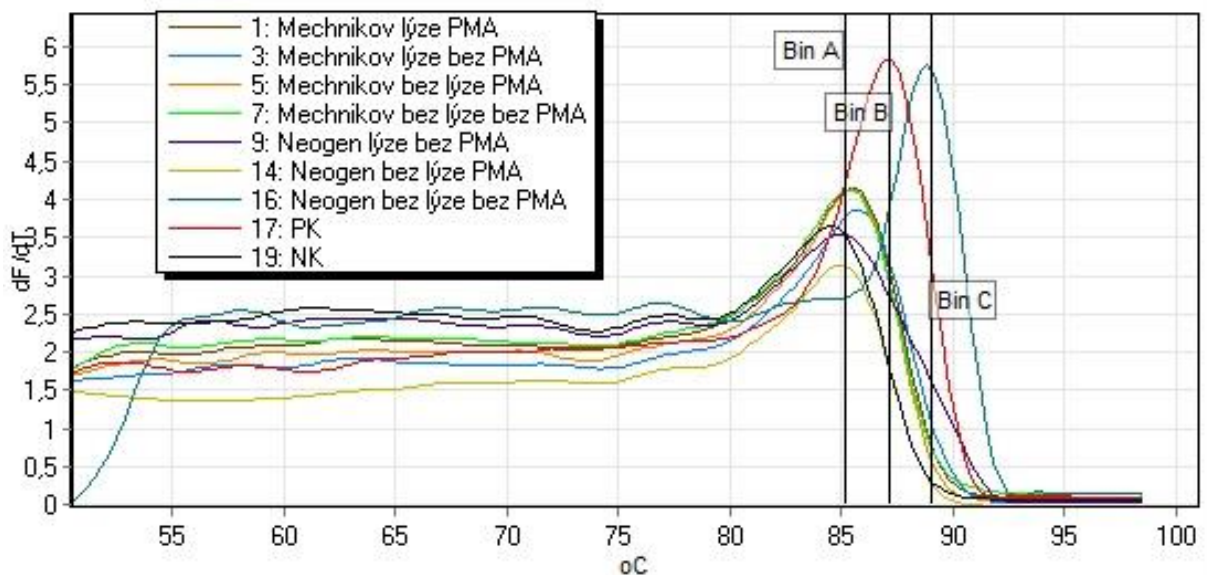
5.8 Průkaz přítomnosti vegetativních buněk metodou PMA-PCR v reálném čase

Byla provedena qPCR, kde jako DNA matrice byly použity vzorky výrobků Mechnikov a Neogen po/bez působení propidium monoazidu (PMA), amplifikace probíhala s primery Feub a Reub [125] specifickými pro doménu *Bacteria*. Polovina vzorků byla před obarvením vystavena teplotní lýzi při $99 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Část vzorků byla obarvena PMA a následně bylo postupováno dle kapitoly 4.3.2. Všechny vzorky byly před přidáním do PCR směsi tepelně lyzovány při $99 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut. Při této reakci byl zvýšen počet cyklů na 35. Amplifikační křivka q-PCR je uvedena na Obrázku 28 a příslušná analýza teploty tání amplikonů na Obrázku 29.

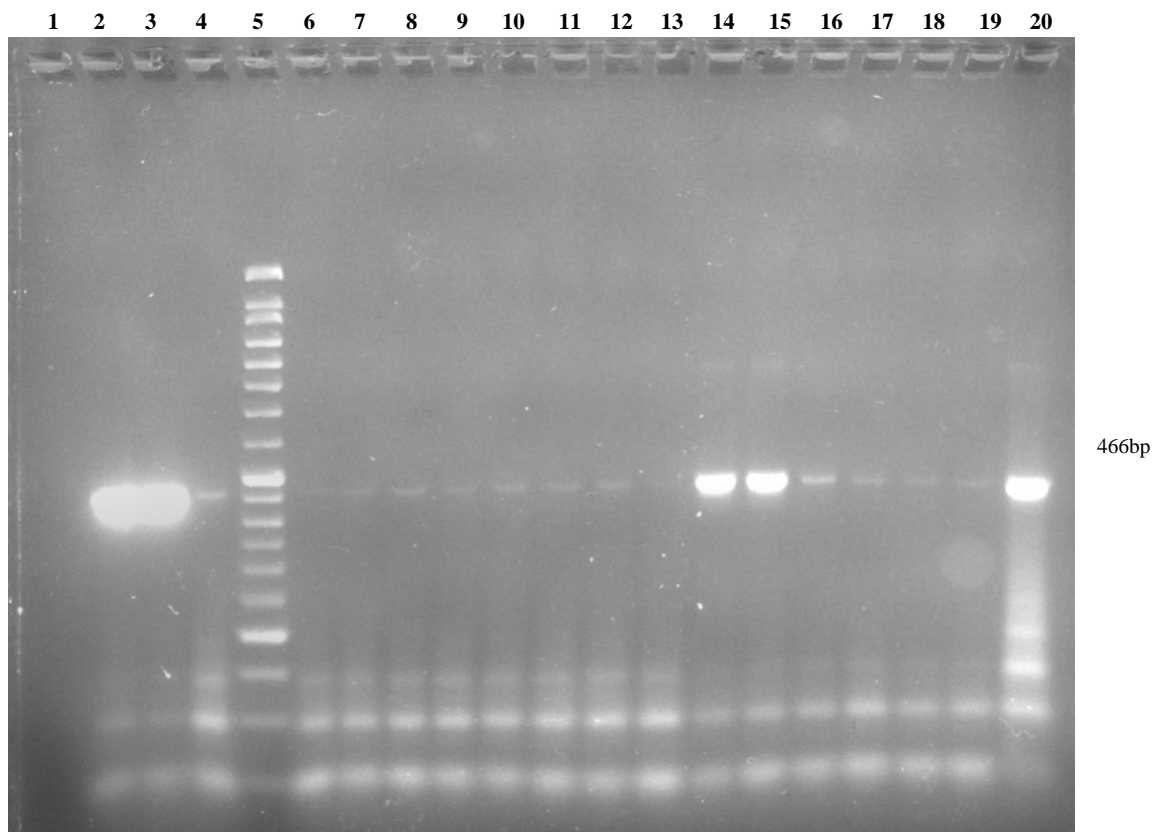
Byly amplifikovány specifické produkty PCR o délce 466 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 7039 vyředěná na $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Snímek agarózového gelu s nanesenými produkty PCR je uveden na Obrázku 30.



Obrázek 28: Amplifikační křivka doména *Bacteria*



Obrázek 29: Analýza křivky tání doména *Bacteria*



Běh č.	DNA	Povařena před barvením	PMA	PCR produkt
1	NK			-
2	PK [10 ng·μl ⁻¹]			+++
3	PK [10 ng·μl ⁻¹]			+++
4	PK [10 ng·μl ⁻¹]			+
5	DNA standart			
6	Mechnikov	ANO	ANO	-
7				+
8		ANO	NE	+
9				-
10		NE	ANO	+
11				+
12		NE	NE	+
13				+
14	Neogen	ANO	NE	+++
15				+++
16		ANO	ANO	+
17				+
18		NE	ANO	+/-
19				+/-
20		NE	NE	+++

Obrázek 30: Agarosová gelová elektroforéza produktů PMA-PCR specifických pro doménu *Bacteria* (466 bp) amplifikována byla DNA z výrobků Mechnikov a Neogen (- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

U vzorků Mechnikov byly detekovány PCR produkty slabé intenzity. PCR produkty nejvyšší intenzity byly detekovány pro vzorky Neogen, které nebyly obarveny PMA.

Slabá intenzita PCR produktu značí přítomnost mrtvých buněk, v důsledku čehož je porušena integrita buněčné stěny a barvivo PMA tedy proniká do buněk čímž dochází k inhibici amplifikace DNA v qPCR. U vzorku Neogen vliv přítomnosti PMA prokázán, DNA amplifikovala normálně a lze tedy usuzovat že ve výrobku jsou obsaženy živé vegetativní buňky s funkční buněčnou stěnou.

5.9 Shrnutí výsledků PCR

Shrnutí výsledků všech PCR je uvedeno v Tabulce 21. DNA izolovaná z výrobků všemi použitými metodami byla shledána vhodnou pro amplifikaci s primery specifickými pro doménu *Bacteria* i pro rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* a kvasinky.

V případě PCR specifické pro doménu *Bacteria* se nejlépe amplifikovala DNA izolovaná pomocí komerčního kitu a to u všech vybraných výrobků. DNA izolovaná magnetickými částicemi a fenolovou extrakcí byla amplifikována za vzniku produktů PCR slabší intenzity.

U PCR specifické pro rod *Lactobacillus* se nejlépe amplifikovala DNA izolovaná pomocí komerčního kitu a to u všech vybraných výrobků. DNA izolovaná magnetickými částicemi a fenolovou extrakcí byla amplifikována za vzniku produktů PCR slabší intenzity.

Při použití druhově specifických primerů, které poskytují delší PCR produkt (250 bp) nedošlo k amplifikaci výrobků.

Stejně tak i při provedení PCR specifické pro rod *Bifidobacterium* se nejlépe amplifikovala DNA izolovaná pomocí komerčního kitu a to u všech vybraných výrobků. DNA izolovaná magnetickými částicemi a fenolovou extrakcí byla amplifikována pouze u málo vzorku, a to za vzniku PCR produktů slabé intenzity.

Při PCR specifické pro rod *Lactococcus* se nejlépe amplifikovala DNA izolovaná komerčním kitem i fenolovou extrakcí u vybraného vzorku. DNA izolovaná magnetickými částicemi byla amplifikována za vzniku produktů PCR slabší intenzity.

V případě PCR specifické pro kvasinky se nejlépe amplifikovala DNA izolovaná komerčním kitem i fenolovou extrakcí u vybraného vzorku. DNA izolovaná magnetickými částicemi byla amplifikována za vzniku produktů PCR slabší intenzity.

V případě q-PCR v kombinaci s barvením PMA byly nejvíce vegetativní buňky vzorku Neogen, u kterým neměla teplotní lýze vliv na amplifikovatelnost. U vzorku Mechnikov byl jen částečný rozdíl v přípravě vzorku na jeho amplifikovatelnost.

Tabulka 21: Shrnutí výsledků PCR, fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K)

(- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

PCR	Výrobek	Metoda izolace DNA		
		F	M	K
Doména <i>Bacteria</i>	Benton krém	++	++	+++
	Mechnikov	++	++	+++
	Neogen	++	+++	+++
	Benton maska	++	+++	+++
Rod <i>Lactobacillus</i> (250bp)	Benton krém	-	-	-
	Mechnikov	-	-	-
	Neogen	-	-	-
	Benton maska	-	-	-
Rod <i>Lactobacillus</i> (92bp)	Mechnikov	+	+/-	++
	Neogen	+	+	+++
	Benton maska	+	+	+++
Rod <i>Bifidobacterium</i>	Benton krém	-	-	++
	Mechnikov	-	-	+++
	Neogen	+	+/-	+
	Benton maska	-	-	+
Rod <i>Lactococcus</i>	Mechnikov	++	+	+++
Kvasinky	Mechnikov	+++	+/-	+++

Lze říci, že amplifikovatelnost DNA v PCR závisí na množství jednotlivých bakterií ve výrobku, na vlivu inhibitorů PCR reakce i na metodě izolace DNA použité jako DNA matrice v PCR.

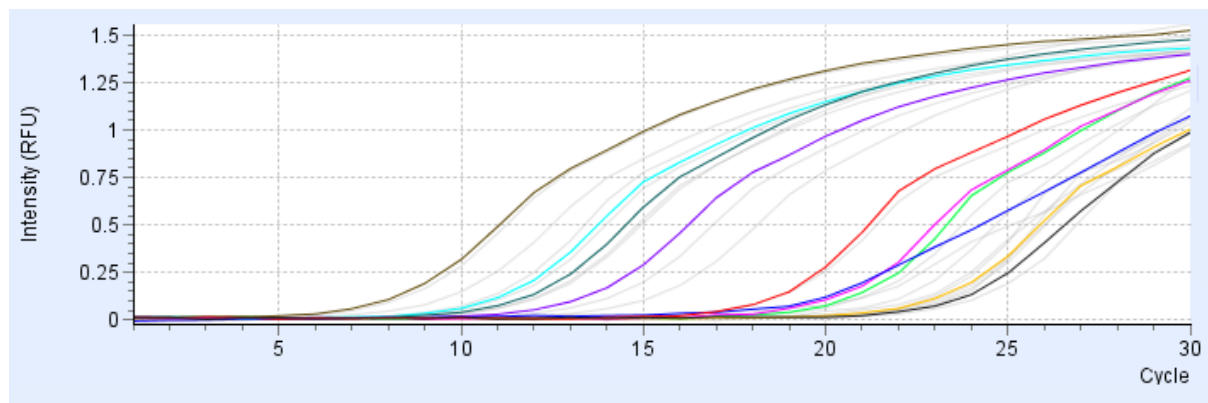
5.10 HRM-PCR

Za účelem ověření přítomnosti různých bakterií v testovaných výrobcích byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání. Byly připraveny směsi pro HRM-PCR a byla provedena reakce dle postupu 4.3.3. s využitím primerů specifických pro doménu *Bacteria* (Feub, Reub). Byla studována přítomnost různé bakteriální DNA ve vzorcích DNA izolované z výrobků (Benton krém, Mechnikov, Neogen a Benton maska) v plné koncentraci (viz. 5.2.1.) [125]. Amplifikační křivka q-PCR je uvedena na Obrázku 31 a příslušná analýza teploty tání ampliconů na Obrázku 32. V tabulce 22 je uvedena legenda k obrázkům 31,32. Výsledky analýzy křivek tání jsou uvedeny Tabulce 23.

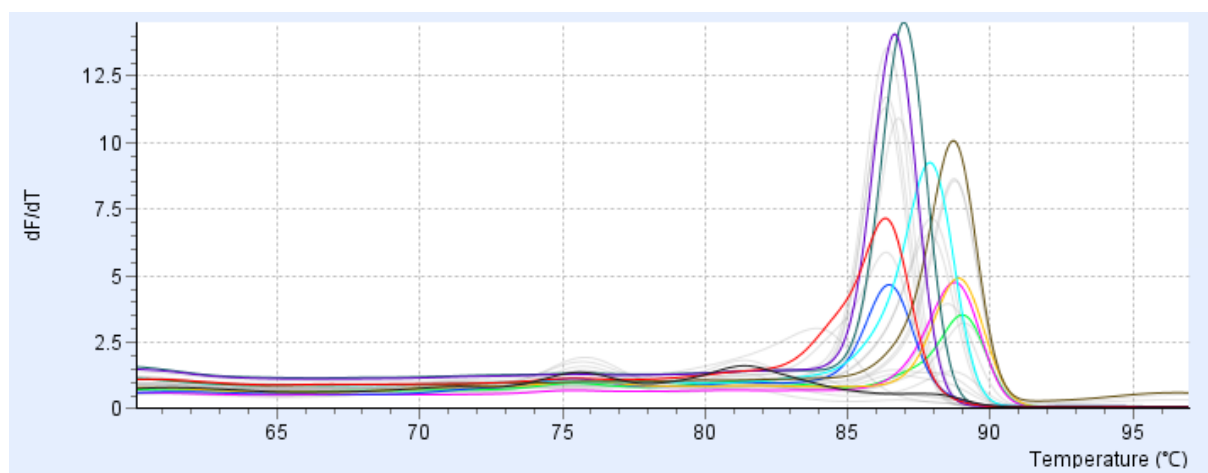
Velikost specifických produktů PCR byla 466 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Lactobacillus plantarum* CCM 7039 vyředěná na 10 ng· μ l⁻¹. Snímek agarózového gelu s nanesenými produkty PCR je uveden na Obrázku 33.

Tabulka 22: Legenda k obrázkům 31 a 32, izolace fenolovou extrakcí (F) a pomocí komerčního kitu (K)

Barva křivky PCR produktu	Výrobek	Způsob izolace DNA	mDNA [ng·μl ⁻¹]
	Benton krém	F	224
	Mechnikov	F	120
	Neogen	F	138
	Benton maska	F	164
	Benton krém	K	155
	Mechnikov	K	540
	Neogen	K	101
	Benton maska	K	61
		PK	
		NK	



Obrázek 31: Amplifikační křivka pro doménu Bacteria

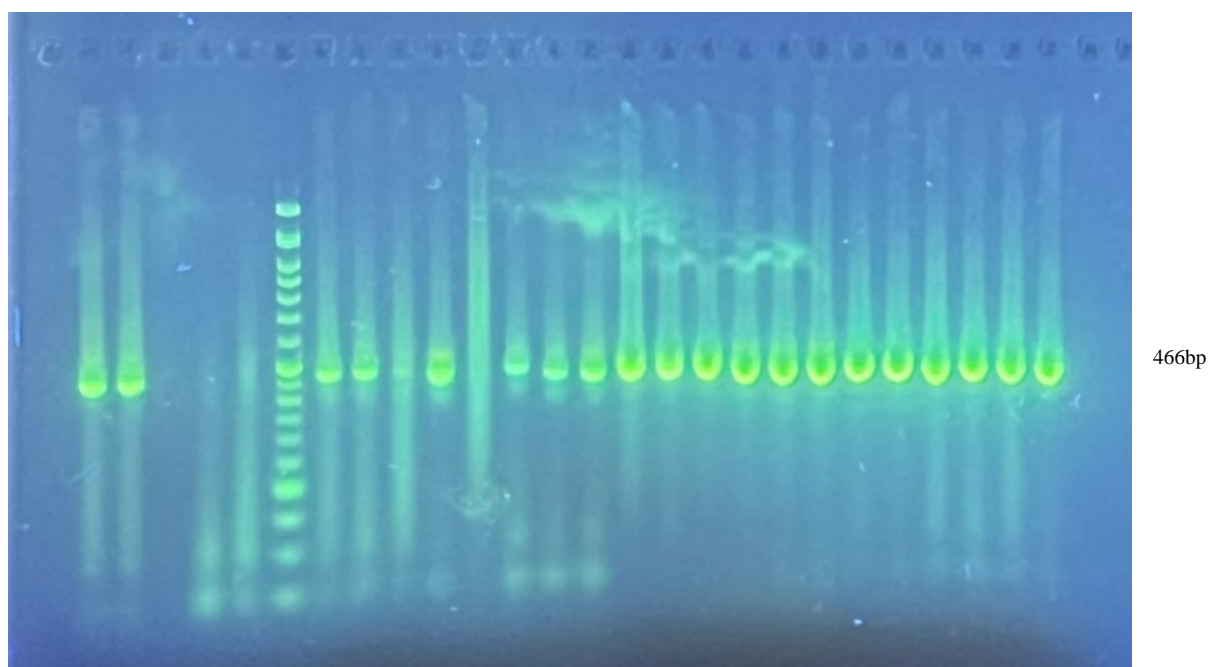


Obrázek 32: HRM analýza křivek tání doména Bacteria

Tabulka 23: Hodnoty T_m specifických PCR produktů pro doménu Bacteria, izolace fenolovou extrakcí (F) a pomocí komerčního kitu (K)

DNA	Způsob izolace	T_m [°C]
Benton krém	F	89,0
	K	88,3
Mechnikov	F	88,8
	K	88,7
Neogen	F	86,4
	K	86,9
Benton maska	F	88,9
	K	86,6

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26



Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt	Běh č.	DNA	Izolace DNA	PCR produkt
1	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+++	15	Benton maska	K	+++
2	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+++	16			+++
3	NK		-	17			+++
4	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+/-	18	Mechnikov	K	+++
5	PK [10 ng·μl ⁻¹]		+/-	19			+++
6	DNA standart			20			+++
7	Benton krém	F	++	21	Neogen	K	+++
8			++	22			+++
9	Mechnikov	F	+	23			Benton maska
10			++	24	+++		
11	Neogen	F	+/-	25			+++

12			++	26			+++
13	Benton maska	F	++				
14			++				

Obrázek 33: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu Bacteria (466 bp) amplifikována byla DNA z výrobků Benron krém, Mechnikov, Neogen a Benton maska fenolovou extrakcí (F), magnetickými částicemi (M) a pomocí komerčního kitu (K) (- nedetekováno, PCR produkt: +/-, +, ++, +++ různá intenzita detekce produktu PCR)

Po amplifikaci DNA a tepelné denaturaci amplikonu byly zjištěny hodnoty teploty tání amplikonů mezi 85 °C-90 °C. Na základě těchto teplot lze usuzovat na přítomnost různých bakterií v testovaném výrobku (testované DNA). Teploty tání produktů PCR Jsou uvedeny v Tabulce 23.

U všech výrobků byly detekovány PCR produkty silné intenzity. Byla prokázána přítomnost bakteriální DNA.

6 ZÁVĚR

Experimentální část práce byla zaměřena na analýzu bakterií a bakteriální DNA v probiotických kosmetických výrobcích Benton krém, Benton maska, Mechnikov, Neogen a La Roche-Posay.

Mikrobiologickými metodami bylo prokázáno, že výrobky obsahují kultivovatelné bakterie. Z těchto vzorků byly následně připraveny hrubé lyzáty buněk. Poté byla izolována DNA pomocí magnetických nosičů, komerčním kitu a také metodou fenolové extrakce. Kvalita izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky.

DNA byla následně amplifikována metodou PCR specifickou pro doménu *Bacteria*, přítomnost bakteriální DNA byla potvrzena. Metodou PCR byla také prokázána přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium* ve všech výrobcích. Dále pro rody *Lactococcus*, *Lactobacillus* a celkové kvasinky byla metodou PCR prokázána přítomnost DNA ve vybraných vzorcích.

Byla provedena PCR v kombinaci s barvivem propidium monoazid a výsledky prokazují životaschopnost nakultivovaných buněk vybraných vzorků.

Výše uvedené výsledky potvrzují, co se přítomností vybraných druhů probiotických mikroorganismů týče, shodu s údaji deklarovanými výrobcem. Byla tedy potvrzena přítomnost deklarovaných probiotických druhů bakterií ve všech testovaných kosmetických výrobcích.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GUPTA, Preeti, Jwala VERMA, Chandan SINGH, Rajendra PRASAD PURVIA a Manoj ADLAKHA. Cosmetology: An Ayurvedic Vision. *International Research Journal of Ayurveda & Yoga* [online]. 2022, **05**(08), 133–137. Dostupné z: doi:10.47223/irjay.2022.5817
- [2] GANDHI, Aditi, Pavel PERESYPKIN a Prakash L HEGDE. Cosmetology in Ayurveda ARIA-Ayurveda Russian Indian Association View project [online]. 2022. Dostupné z: doi:10.37591/RRJoASYN
- [3] LALITHA, C H, P V V PRASADA RAO a P V V Prasada RAO. *IMPACT OF SUPERFICIAL BLENDS ON SKIN MICRO BIOTA*. nedatováno.
- [4] ITA KEVIN. Anatomy of the human skin. In: *Transdermal Drug Delivery* [online]. California, USA: Academic press, 2020, s. 9–18. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-822550-9.00002-8
- [5] NĚMCOVÁ ANDREA. KOSMETOLOGIE a technologie kosmetiky. In: *Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická*. 2022.
- [6] DAVID H. CHU. Development and Structure of Skin. In: SEWON KANG, ed. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* [online]. 1. B.m.: McGraw Hill / Medical, 2018 [vid. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=392§ionid=41138687>.
- [7] KOLARSICK, Paul A. J., Maria Ann KOLARSICK a Carolyn GOODWIN. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [online]. 2011, **3**(4), 203–213. ISSN 1945-760X. Dostupné z: doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98
- [8] SIMPSON PAULA. *Užitečné bakterie pro zdravou pokožku*. 1st vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2022. ISBN 978-80-271-1304-0.
- [9] GUENICHE, Audrey, Olivier PERIN, Amina BOUSLIMANI, Leslie LANDEMAINE, Namita MISRA, Sylvie CUPFERMAN, Luc AGUILAR, Cécile CLAVAUD, Tarun CHOPRA a Ahmad KHODR. *Advances in Microbiome-Derived Solutions and Methodologies Are Founding a New Era in Skin Health and Care* [online]. B.m.: MDPI. 1. leden 2022. ISSN 20760817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens11020121
- [10] FAHLÉN, Annika, Lars ENGSTRAND, Barbara S. BAKER, Anne POWLES a Lionel FRY. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. *Archives of Dermatological Research* [online]. 2012, **304**(1), 15–22. ISSN 03403696. Dostupné z: doi:10.1007/s00403-011-1189-x
- [11] NAKATSUJI, Teruaki a Richard L. GALLO. *The role of the skin microbiome in atopic dermatitis* [online]. B.m.: American College of Allergy, Asthma and Immunology. 1. březen 2019. ISSN 15344436. Dostupné z: doi:10.1016/j.anai.2018.12.003
- [12] MORAN, Mary C., Michael P. CAHILL, Matthew G. BREWER, Takeshi YOSHIDA, Sara KNOWLDEN, Nelissa PEREZ-NAZARIO, Patrick M. SCHLIEVERT a Lisa A. BECK. Staphylococcal Virulence Factors on the Skin of Atopic Dermatitis Patients. *mSphere* [online]. 2019, **4**(6). ISSN 23795042. Dostupné z: doi:10.1128/msphere.00616-19

- [13] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV. Kosmetika a zdraví: úvod. *nzip.cz* [online]. [vid. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/159-kosmetika-a-zdravi-uvod>
- [14] JEONG J, LEE CH a CHUNG D. Probiotic Lactic Acid Bacteria and Skin Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2016, **56**(14), 2331–2337. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2013.834874
- [15] LOPES, E. G., D. A. MOREIRA, P. GULLÓN, B. GULLÓN, A. CARDELLE-COBAS a F. K. TAVARIA. Topical application of probiotics in skin: adhesion, antimicrobial and antibiofilm in vitro assays. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2017, **122**(2), 450–461. ISSN 13652672. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13349
- [16] LLOYD-PRICE, Jason, Galeb ABU-ALI a Curtis HUTTENHOWER. *The healthy human microbiome* [online]. B.m.: BioMed Central Ltd. 27. duben 2016. ISSN 1756994X. Dostupné z: doi:10.1186/s13073-016-0307-y
- [17] FRANZOSA, Eric A., Alexandra SIROTA-MADI, Julian AVILA-PACHECO, Nadine FORNELOS, Henry J. HAISER, Stefan REINKER, Tommi VATANEN, A. Brantley HALL, Himel MALLICK, Lauren J. MCIVER, Jenny S. SAUK, Robin G. WILSON, Betsy W. STEVENS, Justin M. SCOTT, Kerry PIERCE, Amy A. DEIK, Kevin BULLOCK, Floris IMHANN, Jeffrey A. PORTER, Alexandra ZHERNAKOVA, Jingyuan FU, Rinse K. WEERSMA, Cisca WIJMENGA, Clary B. CLISH, Hera VLAMAKIS, Curtis HUTTENHOWER a Ramnik J. XAVIER. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology* [online]. 2019, **4**(2), 293–305. ISSN 20585276. Dostupné z: doi:10.1038/s41564-018-0306-4
- [18] BOUSLIMANI, Amina, Carla PORTO, Christopher M. RATH, Mingxun WANG, Yurong GUO, Antonio GONZALEZ, Donna BERG-LYON, Gail ACKERMANN, Gitte Julie Moeller CHRISTENSEN, Teruaki NAKATSUJI, Lingjuan ZHANG, Andrew W. BORKOWSKI, Michael J. MEEHAN, Kathleen DORRESTEIN, Richard L. GALLO, Nuno BANDEIRA, Rob KNIGHT, Theodore ALEXANDROV a Pieter C. DORRESTEIN. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2015, **112**(17), E2120–E2129. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1424409112
- [19] ŻÓŁKIEWICZ, Jakub, Aleksandra MARZEC, Marek RUSZCZYŃSKI a Wojciech FELESZKO. *Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics* [online]. B.m.: MDPI AG. 1. srpen 2020. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12082189
- [20] ZHENG, Danping, Timur LIWINSKI a Eran ELINAV. *Interaction between microbiota and immunity in health and disease* [online]. B.m.: Springer Nature. 1. červen 2020. ISSN 17487838. Dostupné z: doi:10.1038/s41422-020-0332-7
- [21] ŚLIŻEWSKA, K., P. MARKOWIAK-KOPEĆ a ŚLIŻEWSKA. *Gut Microbiome* [online]. 2021 [vid. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://encyclopedia.pub/entry/6311>
- [22] MENG, X., G. ZHANG, H. CAO, D. YU, X. FANG, W. M. DE VOS a H. WU. *Gut dysbacteriosis and intestinal disease: mechanism and treatment* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd. 1. říjen 2020. ISSN 13652672. Dostupné z: doi:10.1111/jam.14661
- [23] LACH, Gilliard, Harriet SCHELLEKENS, Timothy G. DINAN a John F. CRYAN. *Anxiety, Depression, and the Microbiome: A Role for Gut Peptides* [online]. B.m.:

- Springer New York LLC. 1. leden 2018. ISSN 18787479. Dostupné z: doi:10.1007/s13311-017-0585-0
- [24] DOS REIS, Sandra A., Lisiane L. DA CONCEIÇÃO, Nathane P. SIQUEIRA, Damiana D. ROSA, Letícia L. DA SILVA a Maria do Carmo G. PELUZIO. *Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer* [online]. B.m.: Elsevier Inc. 1. leden 2017. ISSN 18790739. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2016.11.009
- [25] ONTARIO, London. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* [online]. 2002 [vid. 2023-02-21]. Dostupné z: <http://fanus.com.ar/posgrado/10-09-25/fao%20probiotics.pdf>
- [26] PANGHAL, Anil, Chaudhary CHARAN SINGH HARYANA, Jayanta KUMAR PATRA, Adriano GOMES CRUZ, Adriano GOMES DA CRUZ a Manjula SURI. Postbiotics: From emerging concept to application. *Frontiers in Sustainable Food Systems* [online]. 2022, **6**(887642). Dostupné z: doi:10.3389/fsufs.2022.887642
- [27] DRÉNO, B., E. ARAVIISKAIA, E. BERARDESCA, G. GONTIJO, M. SANCHEZ VIERA, L. F. XIANG, R. MARTIN a T. BIEBER. *Microbiome in healthy skin, update for dermatologists* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd. 1. prosinec 2016. ISSN 14683083. Dostupné z: doi:10.1111/jdv.13965
- [28] MUSTHAQ, Shenara, Anna MAZUY a Jeannette JAKUS. The microbiome in dermatology. *Clinics in Dermatology* [online]. 2018, **36**(3), 390–398. ISSN 18791131. Dostupné z: doi: 10.1016/j.clindermatol.2018.03.012
- [29] GALLO, Richard L. *Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes* [online]. B.m.: Elsevier B.V. 1. červen 2017. ISSN 15231747. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jid.2016.11.045
- [30] NAKATSUJI, Teruaki, Hsin I. CHIANG, Shangi B. JIANG, Harish NAGARAJAN, Karsten ZENGLER a Richard L. GALLO. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nature Communications* [online]. 2013, **4**. ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms2441
- [31] COOPER, Alan J., Laura S. WEYRICH, Shreya DIXIT a Andrew G. FARRER. *The skin microbiome: Associations between altered microbial communities and disease* [online]. B.m.: Blackwell Publishing. 1. listopad 2015. ISSN 14400960. Dostupné z: doi:10.1111/ajd.12253
- [32] LOO, Evelyn Xiu Ling, Jordan Zheng Ting SIM, See Ling LOY, Anne GOH, Yiong Huak CHAN, Kok Hian TAN, Fabian YAP, Peter D. GLUCKMAN, Keith M. GODFREY, Hugo VAN BEVER, Bee Wah LEE, Yap Seng CHONG, Lynette Pei chi SHEK, Mark Jean Aan KOH a Seng bin ANG. Associations between caesarean delivery and allergic outcomes: Results from the GUSTO study. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* [online]. 2017, **118**(5), 636–638. ISSN 15344436. Dostupné z: doi:10.1016/j.anai.2017.02.021
- [33] CALLEWAERT, Chris, Katia RAVARD HELFFER a Philippe LEBARON. *Skin Microbiome and its Interplay with the Environment* [online]. B.m.: Adis. 1. září 2020. ISSN 11791888. Dostupné z: doi:10.1007/s40257-020-00551-x

- [34] SCHARSCHMIDT, Tiffany C. a Michael A. FISCHBACH. *What lives on our skin: Ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome* [online]. prosinec 2013. ISSN 17406765. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddmec.2012.12.003
- [35] OH, Julia, Allyson L. BYRD, Morgan PARK, Heidi H. KONG a Julia A. SEGRE. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell* [online]. 2016, **165**(4), 854–866. ISSN 10974172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.04.008
- [36] BYRD, Allyson L., Yasmine BELKAID a Julia A. SEGRE. *The human skin microbiome* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 12. únor 2018. ISSN 17401534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2017.157
- [37] DRÉNO, B., E. ARAVIISKAIA, E. BERARDESCA, G. GONTIJO, M. SANCHEZ VIERA, L. F. XIANG, R. MARTIN a T. BIEBER. *Microbiome in healthy skin, update for dermatologists* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd. 1. prosinec 2016. ISSN 14683083. Dostupné z: doi:10.1111/jdv.13965
- [38] BYRD, Allyson L., Yasmine BELKAID a Julia A. SEGRE. *The human skin microbiome* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 12. únor 2018. ISSN 17401534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2017.157
- [39] LACEY, Noreen, Kevin KAVANAGH a Scheffer C G TSENG. Under the lash: Demodex mites in human diseases. *Biochem (Lond)* [online]. 2009, **31**(4), 2–6 [vid. 2023-02-21]. Dostupné z: doi:10.1042/BIO03104020
- [40] CHRISTENSEN, G. J.M. a H. BRÜGGEMANN. *Bacterial skin commensals and their role as host guardians* [online]. B.m.: Wageningen Academic Publishers. 2014. ISSN 18762891. Dostupné z: doi:10.3920/BM2012.0062
- [41] WANG, Lili, Cécile CLAVAUD, Avner BAR-HEN, Meng CUI, Jun GAO, Yuanyuan LIU, Chen LIU, Nakako SHIBAGAKI, Audrey GUÉNICHE, Roland JOURDAIN, Ke LAN, Chiyu ZHANG, Ralf ALTMAYER a Lionel BRETON. *Characterization of the major bacterial-fungal populations colonizing dandruff scalps in Shanghai, China, shows microbial disequilibrium* [online]. 1. květen 2015. ISSN 16000625. Dostupné z: doi:10.1111/exd.12684
- [42] GIACOMONI, Paolo U., Thomas MAMMONE a Matthew TERI. *Gender-linked differences in human skin* [online]. září 2009. ISSN 09231811. Dostupné z: doi:10.1016/j.jdermsci.2009.06.001
- [43] ZEEUWEN, Patrick L.J.M., Jos BOEKHORST, Ellen H. VAN DEN BOGAARD, Heleen D. DE KONING, Peter M.C. VAN DE KERKHOF, Delphine M. SAULNIER, Iris I. VAN SWAM, Sacha A.F.T. VAN HIJUM, Michiel KLEEREBEZEM, Joost SCHALKWIJK a Harro M. TIMMERMAN. Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. *Genome Biology* [online]. 2012, **13**(11). ISSN 1474760X. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2012-13-11-r101
- [44] PATRA, Vijay Kumar, Scott N. BYRNE a Peter WOLF. The skin microbiome: Is it affected by UV-induced immune suppression? *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7**(AUG). ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01235
- [45] CINQUE, Benedetta, Paola PALUMBO, Cristina LA TORRE, Esterina MELCHIORRE, Daniele CORRIDONI, Gianfranca MICONI, Luisa DI MARZIO, Maria Grazia CIFONE a Maurizio GIULIANI. Probiotics in Aging Skin. In: *Textbook*

- of Aging Skin* [online]. B.m.: Springer Berlin Heidelberg, 2017, s. 1315–1327. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-47398-6_78
- [46] ROUDSARI, M. Rahmati, R. KARIMI, S. SOHRABVANDI a A. M. MORTAZAVIAN. Health Effects of Probiotics on the Skin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2015, **55**(9), 1219–1240. ISSN 15497852. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2012.680078
- [47] STINGLEY, Robin L., Wen ZOU, Thomas M. HEINZE, Huizhong CHEN a Carl E. CERNIGLIA. Metabolism of azo dyes by human skin microbiota. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, **59**(1), 108–114. ISSN 00222615. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.012617-0
- [48] TKACHENKO, N. “Lving” and “probiotic” cosmetics: modern view and defenitions. *Food Science and Technology* [online]. 2017, **11**(4). Dostupné z: doi:10.15673/fst.v11i4.735
- [49] POLAK, Karina, Antal JOBBÁGY, Tomasz MUSZYŃSKI, Kamila WOJCIECHOWSKA, Aleksandra FRĄTCZAK, András BANVÖLGYI, Beata BERGLER-CZOP a Norbert KISS. *Microbiome modulation as a therapeutic approach in chronic skin diseases* [online]. B.m.: MDPI. 1. říjen 2021. ISSN 22279059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9101436
- [50] LAI, Yuping, Anna DI NARDO, Teruaki NAKATSUJI, Anke LEICHTLE, Yan YANG, Anna L. COGEN, Zi Rong WU, Lora v. HOOPER, Richard R. SCHMIDT, Sonja VON AULOCK, Katherine A. RADEK, Chun Ming HUANG, Allen F. RYAN a Richard L. GALLO. Commensal bacteria regulate toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nature Medicine* [online]. 2009, **15**(12), 1377–1382. ISSN 10788956. Dostupné z: doi:10.1038/nm.2062
- [51] NAIK, Shruti, Nicolas BOULADOUX, Jonathan L. LINEHAN, Seong Ji HAN, Oliver J. HARRISON, Christoph WILHELM, Sean CONLAN, Sarah HIMMELFARB, Allyson L. BYRD, Clayton DEMING, Mariam QUINONES, Jason M. BRENCHLEY, Heidi H. KONG, Roxanne TUSSIWAND, Kenneth M. MURPHY, Miriam MERAD, Julia A. SEGRE a Yasmine BELKAID. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* [online]. 2015, **520**(7545), 104–108. ISSN 14764687. Dostupné z: doi:10.1038/nature14052
- [52] ABDULHAMEED, Sabu, N. S. PRADEEP a Shiburaj SUGATHAN. *Bioresources and bioprocess in biotechnology* [online]. B.m.: Springer Singapore, 2017. ISBN 9789811035739. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-3573-9
- [53] GUÉNICHE, Audrey, Philippe BASTIEN, Jean Marc OVIGNE, Michel KERMICI, Guy COURCHAY, Veronique CHEVALIER, Lionel BRETON a Isabelle CASTIEL-HIGOUNENC. Bifidobacterium longum lysate, a new ingredient for reactive skin. *Experimental Dermatology* [online]. 2010, **19**(8). ISSN 09066705. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00932.x
- [54] CINQUE, Benedetta, Cristina LA TORRE, Esterina MELCHIORRE, Giuseppe MARCHESANI, Giovanni ZOCCALI, Paola PALUMBO, Luisa DI MARZIO, Alessandra MASCI, Luciana MOSCA, Paola MASTROMARINO, Maurizio GIULIANI a Maria Grazia CIFONE. Use of Probiotics for Dermal Applications. In: *Probiotics* [online]. 2011, s. 221–241. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-20838-6_9

- [55] KARIMI, Reza, Amir M. MORTAZAVIAN a Atefeh AMIRI-RIGI. *Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese* [online]. únor 2012. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2011.08.008
- [56] GOTO, Kazuo, Daichi IWASAWA, Yuta KAMIMURA, Masahiko YASUDA, Mitsuru MATSUMURA a Tomoko SHIMADA. Clinical and Histopathological Evaluation of Dermatophagoides farinae-Induced Dermatitis in NC/Nga Mice Orally Administered Bacillus subtilis. *J. Vet. Med. Sci* [online]. 2011, **73**(5), 649–654. Dostupné z: doi:10.1292/jvms.10-0457
- [57] WICKENS, Kristin, Peter N. BLACK, Thorsten v. STANLEY, Edwin MITCHELL, Penny FITZHARRIS, Gerald W. TANNOCK, Gordon PURDIE a Julian CRANE. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2008, **122**(4), 788–794. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2008.07.011
- [58] WINKLER, Petra, Darab GHADIMI, Jü RGEN SCHREZENMEIR a Jean-Pierre KRAEHENBUHL. Molecular and Cellular Basis of Microflora-Host Interactions. *The Journal of Nutrition* [online]. 2007, **137**(3), 756–772 [vid. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.756S>.
- [59] BOCKMÜHL, D., C. JASSOY, S. NIEVELER, R. SCHOLTYSEK, A. WADLE a M. WALDMANN-LAUE. Prebiotic Cosmetics: An Alternative to Antibacterial Products. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2007, **29**(1), 63–64. ISSN 0142-5463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-2494.2007.00355_2.x
- [60] SHEN, Qian, Bowen ZHANG, Rihua XU, Yang WANG, Xuelong DING a Pinglan LI. Antioxidant activity in vitro of the selenium-contained protein from the Se-enriched Bifidobacterium animalis 01. *Anaerobe* [online]. 2010, **16**(4), 380–386. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2010.06.006
- [61] PUEBLA-BARRAGAN, Scarlett a Gregor REID. Probiotics in cosmetic and personal care products: Trends and challenges. *Molecules* [online]. 2021, **26**(5). ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26051249
- [62] KLEIN, Günter, Joost P. SCHANSTRA, Janosch HOFFMANN, Harald MISCHAK, Justyna SIWY a Kurt ZIMMERMANN. Proteomics as a Quality Control Tool of Pharmaceutical Probiotic Bacterial Lysate Products. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(6). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0066682
- [63] VILLA, Elisa, Valentina GARELLI, Fulvio BRAIDO, Giovanni MELIOLI a Giorgio Walter CANONICA. May We Strengthen the Human Natural Defenses with Bacterial Lysates? *World Allergy Organization Journal* [online]. 2010, **3**(8), 17–23. Dostupné z: doi:10.1097/WOX.0b013e3181ee0cfd
- [64] KNACKSTEDT, Rebecca, Thomas KNACKSTEDT a James GATHERWRIGHT. *The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd. 1. leden 2020. ISSN 16000625. Dostupné z: doi:10.1111/exd.14032
- [65] YAO, Mingfei, Jiaojiao XIE, Hengjun DU, David Julian MCCLEMENTS, Hang XIAO a Lanjuan LI. *Progress in microencapsulation of probiotics: A review* [online]. B.m.:

- Blackwell Publishing Inc. 1. březen 2020. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12532
- [66] HILL, Colin, Francisco GUARNER, Gregor REID, Glenn R. GIBSON, Daniel J. MERENSTEIN, Bruno POT, Lorenzo MORELLI, Roberto Berni CANANI, Harry J. FLINT, Seppo SALMINEN, Philip C. CALDER a Mary Ellen SANDERS. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2014, **11**(8), 506–514. ISSN 17595053. Dostupné z: doi:10.1038/nrgastro.2014.66
- [67] HUTKINS, Robert W., Janina A. KRUMBECK, Laure B. BINDELS, Patrice D. CANI, George FAHEY, Yong Jun GOH, Bruce HAMAKER, Eric C. MARTENS, David A. MILLS, Robert A. RASTAL, Elaine VAUGHAN a Mary Ellen SANDERS. *Prebiotics: Why definitions matter* [online]. B.m.: Elsevier Ltd. 1. únor 2016. ISSN 18790429. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2015.09.001
- [68] ELY, P. Haines. Is psoriasis a bowel disease? Successful treatment with bile acids and bioflavonoids suggests it is. *Clinics in Dermatology* [online]. 2018, **36**(3), 376–389. ISSN 18791131. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2018.03.011
- [69] RASTOGI, Sonakshi, Vineeta MITTAL a Aditi SINGH. In vitro assessment of antioxidant and antimicrobial potential of lactobacillus gasseri strains isolated from human milk and infant faeces. *Journal of Pure and Applied Microbiology* [online]. 2020, **14**(2), 1305–1315. ISSN 2581690X. Dostupné z: doi:10.22207/JPAM.14.2.26
- [70] NATARAJ, Basavaprabhu H., Syed Azmal ALI, Pradip V. BEHARE a Hariom YADAV. *Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods* [online]. B.m.: BioMed Central. 20. srpen 2020. ISSN 14752859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01426-w
- [71] VLKOVÁ E, Neužil V, Killer J. Probiotika, prebiotika, postbiotika a jiná -biotika. *Výživa a potraviny*. [online]. 2021, **3**, 76–79. Dostupné z: <https://www.vyzivaspol.cz/vyziva-a-potraviny-3-2021/>
- [72] NATARAJ, Basavaprabhu H., Syed Azmal ALI, Pradip V. BEHARE a Hariom YADAV. *Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods* [online]. B.m.: BioMed Central. 20. srpen 2020. ISSN 14752859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-020-01426-w
- [73] DUARTE, Marco, Ana L. OLIVEIRA, Carla OLIVEIRA, Manuela PINTADO, Ana AMARO a Ana Raquel MADUREIRA. *Current postbiotics in the cosmetic market—an update and development opportunities* [online]. B.m.: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. 1. září 2022. ISSN 14320614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-022-12116-5
- [74] WEGH, Carrie A.M., Sharon Y. GEERLINGS, Jan KNOL, Guus ROESELERS a Clara BELZER. *Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond* [online]. B.m.: MDPI AG. 1. říjen 2019. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20194673
- [75] WEGH, Carrie A.M., Sharon Y. GEERLINGS, Jan KNOL, Guus ROESELERS a Clara BELZER. *Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond*

- [online]. B.m.: MDPI AG. 1. říjen 2019. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20194673
- [76] VINDEROLA, Gabriel, Mary Ellen SANDERS a Seppo SALMINEN. *The Concept of Postbiotics* [online]. B.m.: MDPI. 1. duben 2022. ISSN 23048158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11081077
- [77] CIARDIELLO, Tiziana, Daniela PINTO, Laura MAROTTA, Giammaria GIULIANI a Fabio RINALDI. Effects of fermented oils on alpha-biodiversity and relative abundance of cheek resident skin microbiota. *Cosmetics* [online]. 2020, **7**(2). ISSN 20799284. Dostupné z: doi:10.3390/COSMETICS7020034
- [78] WANG, Shaohua, Shokouh AHMADI, Ravinder NAGPAL, Shalini JAIN, Sidharth P. MISHRA, Kylie KAVANAGH, Xuwei ZHU, Zhan WANG, Donald A. MCCLAIN, Stephen B. KRITCHEVSKY, Dalane W. KITZMAN a Hariom YADAV. Lipoteichoic acid from the cell wall of a heat killed *Lactobacillus paracasei* D3-5 ameliorates aging-related leaky gut, inflammation and improves physical and cognitive functions: from *C. elegans* to mice. *GeroScience* [online]. 2020, **42**(1), 333–352. ISSN 25092723. Dostupné z: doi:10.1007/s11357-019-00137-4
- [79] YELIN, Idan, Kelly B. FLETT, Christina MERAKOU, Preeti MEHROTRA, Jason STAM, Erik SNESRUD, Mary HINKLE, Emil LESHO, Patrick MCGANN, Alexander J. MCADAM, Thomas J. SANDORA, Roy KISHONY a Gregory P. PRIEBE. Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. *Nature Medicine* [online]. 2019, **25**(11), 1728–1732. ISSN 1546170X. Dostupné z: doi:10.1038/s41591-019-0626-9
- [80] CENTINI, Marisanna, Mario Roberto TREDICI, Natascia BIONDI, Anna BUONOCORE, Roberto Maffei FACINO a Cecilia ANSELMi. Bioglea as a source of bioactive ingredients: Chemical and biological evaluation. *Cosmetics* [online]. 2020, **7**(4). ISSN 20799284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics7040081
- [81] CAGGIANIELLO, Graziano, Michiel KLEEREBEZEM a Giuseppe SPANO. *Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms* [online]. B.m.: Springer Verlag. 1. květen 2016. ISSN 14320614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-016-7471-2
- [82] LIM, Hye Yeon, Deok JEONG, Sang Hee PARK, Kon Kuk SHIN, Yo Han HONG, Eunji KIM, Yeong Gyeong YU, Tae Rahk KIM, Hun KIM, Jongsung LEE a Jae Youl CHO. Antiwrinkle and antimelanogenesis effects of tyndallized *Lactobacillus acidophilus* KCCM12625P. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(5). ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21051620
- [83] BRANDI, Jessica, Samuele CHERI, Marcello MANFREDI, Claudia DI CARLO, Virginia VITA VANELLA, Federica FEDERICI, Eleonora BOMBIERO, Alda BAZAJ, Eleonora RIZZI, Laura MANNA, Giuseppe CORNAGLIA, Umberto MARINI, Maria Teresa VALENTI, Emilio MARENGO a Daniela CECCONI. Exploring the wound healing, anti-inflammatory, anti-pathogenic and proteomic effects of lactic acid bacteria on keratinocytes. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-68483-4
- [84] VOLZ, Thomas, Yuliya SKABYTSKA, Emmanuella GUENOVA, Ko Ming CHEN, Julia Stefanie FRICK, Carsten J. KIRSCHNING, Susanne KAESLER, Martin RÖCKEN

- a Tilo BIEDERMANN. Nonpathogenic bacteria alleviating atopic dermatitis inflammation induce IL-10-producing dendritic cells and regulatory Tr1 cells. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2014, **134**(1), 96–104. ISSN 15231747. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.291
- [85] ERIN CHEN, Y., Michael A. FISCHBACH a Yasmine BELKAID. *Skin microbiota-host interactions* [online]. B.m.: Nature Publishing Group. 24. leden 2018. ISSN 14764687. Dostupné z: doi:10.1038/nature25177
- [86] ALLHORN, Maria, Sabine ARVE, Holger BRÜGGEMANN a Rolf LOOD. A novel enzyme with antioxidant capacity produced by the ubiquitous skin colonizer *Propionibacterium acnes*. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep36412
- [87] FOURNIÈRE, Mathilde, Thomas LATIRE, Djouhar SOUAK, Marc G.J. FEUILLOLEY a Gilles BEDOUX. *Staphylococcus epidermidis and cutibacterium acnes: Two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics* [online]. B.m.: MDPI AG. 1. listopad 2020. ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8111752
- [88] AMIRI, Saber, Mahmoud Rezazadeh BARI, Mohammad Alizadeh KHALEDABAD, Reza Rezaei MOKARRAM a Mahmoud Sowti KHIABANI. Co-production of conjugated linoleic acids, exopolysaccharides and bacteriocins by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 in supplemented dairy effluents. *Chem Rev Lett* [online]. 2021, **4**, 66–76. ISSN 2676-7279. Dostupné z: doi:10.22034/CRL.2021.253739.1086
- [89] TRIF, Monica, Ann-Kristin SCHWARZE, Malte BETHKE, Berta Alvarez PENEDO a Alexandru RUSU. Individualized Dietary Supplements Enriched with Microbial Propionic Acid for Athletes and the Elderly with Benefits on Gut Microbiota. In: [online]. B.m.: MDPI AG, 2021, s. 23. Dostupné z: doi:10.3390/proceedings2020066023
- [90] DHILLON, Gurpreet Singh, Surinder KAUR a Satinder Kaur BRAR. *Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review* [online]. 2013. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2013.06.046
- [91] CHEN, Gang, Jiakun LI, Hong LV, Sen WANG, Jian ZUO a Lihua ZHU. Mesoporous coxs_n(1 - x)_o2 as an efficient oxygen evolution catalyst support for spe water electrolyzer. *Royal Society Open Science* [online]. 2019, **6**(4). ISSN 20545703. Dostupné z: doi:10.6084/m9.figshare
- [92] BLAZHEVA, D., D. MIHAYLOVA, O. v. AVERINA, A. SLAVCHEV, M. BRAZKOVA, E. U. POLUEKTOVA, V. N. DANILENKO a A. KRASTANOV. Antioxidant Potential of Probiotics and Postbiotics: A Biotechnological Approach to Improving Their Stability. *Russian Journal of Genetics* [online]. 2022, **58**(9), 1036–1050. ISSN 1022-7954. Dostupné z: doi:10.1134/s1022795422090058
- [93] CULLEN, Chad M., Kawalpreet K. ANEJA, Sinem BEYHAN, Clara E. CHO, Stephen WOLOSZYNEK, Matteo CONVERTINO, Sophie J. MCCOY, Yanyan ZHANG, Matthew Z. ANDERSON, David ALVAREZ-PONCE, Ekaterina SMIRNOVA, Lisa KARSTENS, Pieter C. DORRESTEIN, Hongzhe LI, Ananya SEN GUPTA, Kevin CHEUNG, Jennifer Gloeckner POWERS, Zhengqiao ZHAO a Gail L. ROSEN.

- Emerging Priorities for Microbiome Research* [online]. B.m.: Frontiers Media S.A. 19. únor 2020. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.00136
- [94] LI, Yanli, Jing NIE, Jan BEYEA, Carole B. RUDRA, Richard W. BROWNE, Matthew R. BONNER, Lina MU, Maurizio TREVISAN a Jo L. FREUDENHEIM. Exposure to traffic emissions: Associations with biomarkers of antioxidant status and oxidative damage. *Environmental Research* [online]. 2013, **121**, 31–38. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2012.10.003
- [95] AVERINA, Olga v., Elena U. POLUEKTOVA, Mariya v. MARSOVA a Valery N. DANILENKO. *Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic lactobacilli and bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota* [online]. B.m.: MDPI. 1. říjen 2021. ISSN 22279059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9101340
- [96] WANG, Yang, Yanping WU, Yuanyuan WANG, Han XU, Xiaoqiang MEI, Dongyou YU, Yibing WANG a Weifen LI. *Antioxidant properties of probiotic bacteria* [online]. B.m.: MDPI AG. 19. květen 2017. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu9050521
- [97] ŠPANOVÁ A a RITIICH B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vydání. Brno: Brno:VUT,Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80- 214-4004-3.
- [98] TEMMERMAN, Robin, Geert HUYS a Jean SWINGS. Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods. In: *Trends in Food Science and Technology* [online]. 2004, s. 348–359. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2003.12.007
- [99] NAIR, Baboo M. *Methods for isolation characterization and Identification of probiotic bacteria to be used in functional foods* [online]. 2012. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/252322967>
- [100] KWON, Hyuk Sang, Eun Hee YANG, Seung Woo YEON, Byoung Hwa KANG a Tae Yong KIM. Rapid identification of probiotic Lactobacillus species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2004, **239**(2), 267–275. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsle.2004.08.049
- [101] SAMBROOK J. a RUSSEL D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd vyd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0879695773.
- [102] KRÁLOVÁ BLANKA, FUKAL LADISLAV, RAUCH PAVEL a RUML TOMÁŠ. *Bioanalytické metody*. 3rd vyd. B.m.: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. ISBN 80-7080-449-1.
- [103] ŠÁRKA BURSOVÁ, MVDr, Mgr MARTA DUŠKOVÁ, MVDr LENKA NECIDOVÁ, doc MVDR RENÁTA KARPÍŠKOVÁ a Mgr PETRA MYŠKOVÁ. *VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE Ústav hygieny a technologie mléka MIKROBIOLOGICKÉ LABORATORNÍ METODY*. [online]. 2014, Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/files/cela-skripta-bursova-a-kol_mlm-elektronicka-verze_upraveny-logolink.pdf
- [104] KEVIN AHERN, INDIRA RAJAGOPAL a TARALYN TAN. Polymerase chain reaction (PCR). In: *Biochemistry: Free For All*. B.m.: Oregon State University, [online].

- 2018, s. 857–901. Dostupné z: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwichMC8jub-AhVKi_0HHTdBBE8QFnoECA0QAQ&url=https%3A%2F%2Fopen.oregonstate.edu%2Fbiochemfreeforall%2F&usg=AOvVaw3fwX6-Eyri9NJsdoMDd7tC
- [105] BURSOVÁ Š., NECIDOVÁ L a DUŠKOVÁ M. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie*. B.m.: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-741-1.
- [106] ŠMARDA J, DOŠKAŘ J, PANTUČEK R, RŮŽIČKOVÁ V a KOPTÍKOVÁ J. *Metody molekulární biologie*. 1st vyd. B.m.: Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [107] JEONG, Jinuk, Seyoung MUN, Yunseok OH, Chun Sung CHO, Kyeongeui YUN, Yongju AHN, Won Hyong CHUNG, Mi Young LIM, Kyung Eun LEE, Tae Soon HWANG a Kyudong HAN. A qRT-PCR Method Capable of Quantifying Specific Microorganisms Compared to NGS-Based Metagenome Profiling Data. *Microorganisms* [online]. 2022, **10**(2). ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10020324
- [108] TRACHTOVÁ ŠTĚPÁNKA. *Praktikum z molekulární biotechnologie - Identifikace bakterií pomocí PCR* [online]. 2018. Dostupné z: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- [109] BESSETTI JOSEPH. An introduction to PCR inhibitors. *Promega Corporation* [online]. 2007, 9–10 [vid. 2023-04-24]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/285475103_An_introduction_to_PCR_inhibitors
- [110] LORENZ, Todd C. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (63). ISSN 1940087X. Dostupné z: doi:10.3791/3998
- [111] TRACHTOVÁ ŠTĚPÁNKA. *Praktikum z molekulární biotechnologie - PCR v reálném čase*. 2019. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015.
- [112] FUNCTIONAL GENOMICS II. Real-time PCR. *The European Bioinformatics Institute EMBL-EBI*. [online]. [vid. 2023-04-24]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/real-time-pcr/>
- [113] RUDI, Knut, Birgitte MOEN, Signe Marie DRØMTORP a Askild L. HOLCK. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005, **71**(2), 1018–1024. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.2.1018-1024.2005
- [114] HEGE KARIN NOGVA. Ethidium Monoazide for DNA-Based Differentiation of Viable and Dead Bacteria by 5'-Nuclease PCR. *BioTechniques* [online]. 2003, **34**, 804–813 [vid. 2023-02-20]. Dostupné z: doi:10.2144/03344rr02
- [115] CORRY, J. E.L. a H. I. ATABAY. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. In: *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* [online]. 2001. ISSN 02674440. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01358.x

- [116] O'BRIEN, Melissa C. a Wade E. BOLTON. Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilization for combined surface and intracellular staining in flow cytometry. *Cytometry* [online]. 1995, **19**(3), 243–255. ISSN 10970320. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.990190308
- [117] REYNEKE, B., T. NDLOVU, S. KHAN a W. KHAN. Comparison of EMA-, PMA- and DNase qPCR for the determination of microbial cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **101**(19), 7371–7383. ISSN 14320614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8471-6
- [118] SHAKERI, Monir Sadat, Fakhri SHAHIDI, Ali MORTAZAVI, Ahmad R. BAHRAMI a Mohammad R. NASSIRI. Application of PCR technique in combination with DNase treatment for detection of viable lactobacillus acidophilus bacteria. *Journal of Food Quality* [online]. 2014, **37**(4), 291–295. ISSN 17454557. Dostupné z: doi:10.1111/jfq.12093
- [119] FITTIPALDI, Mariana, Andreas NOCKER a Francesc CODONY. *Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification* [online]. listopad 2012. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2012.08.007
- [120] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62). ISSN 1940087X. Dostupné z: doi:10.3791/3923
- [121] SANTALUCIA JR, John a Donald HICKS. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2004, **33**, 415–440.
- [122] ERALI, Maria a Carl T. WITTWER. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* [online]. 2010, **50**(4), 250–261. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.013
- [123] LYON, Elaine a Carl T. WITTWER. LightCycler technology in molecular diagnostics. In: *Journal of Molecular Diagnostics* [online]. B.m.: Association of Molecular Pathology, 2009, s. 93–101. ISSN 15251578. Dostupné z: doi:10.2353/jmoldx.2009.080094
- [124] WITTWER, Carl T. *High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations* [online]. červen 2009. ISSN 10597794. Dostupné z: doi:10.1002/humu.20951
- [125] PORNPRASERT, Sakorn, Arunee PHUSUA, Sudjai SUANTA, Rattika SAETUNG a Torpong SANGUANSEMSRI. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *European Journal of Haematology* [online]. 2008, **80**(6), 510–514. ISSN 09024441. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0609.2008.01055.x
- [126] GRODY W, NAKAMURA R, STROM CH a KIECHLE F. *Molecular Diagnostics* [online]. 2nd vyd. B.m.: Academic Press, 2009. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/C2009-0-00182-2
- [127] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. *High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis* [online]. B.m.: Elsevier Ltd. 1. září 2014. ISSN 18737072. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111

- [128] VOSSSEN, Rolf H.A.M., Emmelien ATEN, Anja ROOS a Johan T. DEN DUNNEN. *High-resolution melting analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening* [online]. červen 2009. ISSN 10597794. Dostupné z: doi:10.1002/humu.21019
- [129] HAARMAN, Monique a Jan KNOL. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, **72**(4), 2359–2365. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006
- [130] ROY, Denis a Stéphanie SIROIS. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2000, **191**(1), 17–24. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09313.x
- [131] GARDE, Sonia, Mar BABIN, Pilar GAYA, Manuel NUÑEZ a Margarita MEDINA. PCR amplification of the gene *acmA* differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1999, **65**(11), 5151–5153. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.65.11.5151-5153.1999
- [132] TOFALO, Rosanna, Maria SCHIRONE, Giorgia PERPETUINI, Giovanna SUZZI a Aldo CORSETTI. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control* [online]. 2012, **23**(2), 356–362. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.032

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

KTJ (CFU)	kolonie tvořící jednotku (colony-forming unit)
MO	mikroorganismus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
GMO	Geneticky modifikovaný organismus
USA	Spojené státy americké
EU	Evropská unie
IL17, IL-6	Interleukin
CD8	Cytotoxické T lymfocyty
TLR2	Toll-like receptor
IgE	imunoglobulin E
IgA	imunoglobulin A
Th1/Th2	Typy imunitní odpovědi
in situ	na svém původním místě
SDS	dodecylsulfát sodný
PEG	polyethylen glykol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
bp	pár bází (base pair)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)