

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ  
PRODUKUJÍCÍCH ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

DIZERTAČNÍ PRÁCE  
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

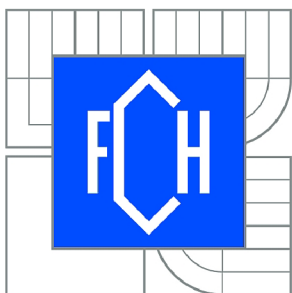
Mgr. KRISTÝNA TURKOVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# STUDIUM PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ PRODUKUJÍCÍCH ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

STUDY OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA PRODUCING ANTIMICROBIAL COMPOUNDS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mgr. KRISTÝNA TURKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2014





Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce: **FCH-DIZ0098/2013** Akademický rok: **2013/2014**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Mgr. Kristýna Turková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (P2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901V021)  
Vedoucí práce **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**  
Konzultanti:

### Název dizertační práce:

Studium probiotických bakterií mléčného kvašení produkujících antimikrobiální látky

### Zadání dizertační práce:

Studium bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* produkujících antimikrobiální látky a charakterisace jejich probiotických vlastností.

### Termín odevzdání dizertační práce: 30.8.2014

Dizertační práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

-----  
Mgr. Kristýna Turková  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Alena Španová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.3.2014

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Soubor 68 kmenů izolovaných ze stolice plně kojených dětí a dalších zdrojů byl identifikován pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*, druhově specifickými primery včetně multiplexní PCR, *pheS* PCR, rep-PCR, RAPD-PCR a srovnáním sekvencí genů pro 16SrRNA. Dále byla sledována produkce antimikrobiálních látek pomocí agarového kapkového testu a agarového difuzního testu. Antimikrobiální bílkovinné látky v dostatečné koncentraci v supernatantu produkovalo 7 kmenů. U vybraných 3 kmenů byl sledován vliv teploty, pH a přítomnosti detergentů na inhibiční vlastnosti supernatantu. Uvedené kmeny produkovaly teplotně stabilní antimikrobiální bílkovinné látky, jejichž antimikrobiální vlastnosti neovlivňovaly testované detergenty s výjimkou SDS.

Skríníng DNA na přítomnost genů pro produkci bakteriocinů pomocí PCR a DNA/DNA hybridizace ukázal jejich přítomnost u 14 kmenů. U 3 kmenů byly identifikovány geny shodné s geny v genových klastrech pro gassericin K7A nebo gassericin K7B. Specifické produkty PCR byly sekvenovány a analyzovány pomocí algoritmu BLAST a programu CLUSTAL W2. U 2 kmenů byla nalezena v databázi GeneBank 100% shoda nukleotidových sekvencí se sekvencemi pro části genových klastrů gassericinu K7B, gassericinu T a acidocinu LF221B.

Kmeny skupiny *Lactobacillus acidophilus* byly dále testovány na odolnost vůči podmínkám gastrointestinálního traktu, na adhezi na Caco-2 buňky a na rezistenci vůči antibiotikům.

Skríníngem DNA všech kmenů pomocí specifických primerů byla zjištěna přítomnost genu pro produkci histidin dekarboxylázy u 7 kmenů, gen pro produkci tyrosin dekarboxylázy byl detegován u 1 kmene a gen pro linoleát izomerázu u 4 kmenů.

Pomocí optimalizovaného postupu imunomagnetické separace buněk s využitím biotinylované protilátky anti-*Lactobacillus* a magnetických nosičů s navázaným streptavidinem byly buňky kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 separovány z tekutého MRS media, UHT mléka a bílého jogurtu v dostatečném množství pro detekci pomocí PCR.

## KLÍČOVÁ SLOVA

*Lactobacillus*, identifikace, PCR, antimikrobiální látky, bakteriociny, probiotické vlastnosti, imunomagnetická separace buněk, DNA/DNA hybridizace

## ABSTRACT

The sixty-eight strains isolated from breastfed full-term infant feces and from another sources were identified using genus-specific polymerase chain reaction (PCR) for *Lactobacillus*, species-specific PCRs, multiplex PCR, *pheS* PCR, rep-PCR, RAPD-PCR and 16S rDNA sequencing into *Lactobacillus* species or group of species. Seven strains produced antimicrobial proteinaceous substances in the supernatants. Antimicrobial proteinaceous substances of three strains were tested on temperature, pH and detergent stability. All tested strains produced temperature-stable antimicrobial proteinaceous substances. Antimicrobial activity was not influenced by detergents with exception of SDS.

Presence of genes for production of bacteriocins (acidocin B, gassericin A, gassericin T, gassericin K7A and gassericin K7B) were detected in DNA of fourteen strains using PCR and DNA/DNA hybridization. Selected PCR products were sequenced and analyzed using BLAST algorithm and CLUSTAL W2 programme. The sequences of specific PCR products in DNA of two strains had 100% similarity with the sequences from the database GeneBank.

Selected strains of *Lactobacillus acidophilus* group were tested for the surveillance in gastrointestinal tract, for the production of antimicrobial substances, for the adhesion on Caco-2 cells and for the presence of genes of antibiotic resistance.

DNA of strains was tested using specific primers on the presence of genes for histidine-decarboxylase, tyrosine-decarboxylase and linoleate isomerase. The gene for histidine-decarboxylase production was detected in DNA of seven strains, for tyrosine-decarboxylase production in DNA of one strain and for linoleate isomerase in DNA of four strains.

Immunomagnetic separation of the cells was optimized. Magnetic particles functionalized with streptavidin and the anti-*Lactobacillus* antibody was used for the separation of the cells of *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 from MRS medium, UHT milk and from the yogurt. The IMS-PCR was used for detection of immunomagnetic separated bacterial cells.

## KEYWORDS

*Lactobacillus*, identification, PCR, probiotic properties, antimicrobial substances, bacteriocins, immunomagnetic separation, DNA/DNA hybridization

TURKOVÁ, K.: Studium probiotických bakterií mléčného kvašení produkujících antimikrobiální látky. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 161 str. Vedoucí dizertační práce: doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis doktoranda

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. a doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi umožnily zpracování dizertační práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře prof. Ireny Rogelj na University of Ljubljana za možnost absolvovat zahraniční stáž v laboratoři specializující se na probiotické bakterie a produkci bakteriocinů. Nemalý dík patří i mému příteli, rodině a kolegům za vždy přítomnou podporu.

## Obsah

<b>1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Využití bakterií mléčného kvašení v potravinářském průmyslu .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	3
<b>2.2 Probiotika .....</b>	<b>4</b>
2.2.1 Probiotika a lidský gastrointestinální trakt.....	5
2.2.2 Identifikace probiotického bakteriálního kmene .....	7
2.2.3 In vitro testování vlastností probiotických kmenů .....	8
2.2.4 In vivo studie potenciálních probiotických kmenů.....	10
2.2.5 Využití probiotických kmenů BMK v potravinářském průmyslu .....	10
<b>2.3 Antimikrobiální látky produkované kmeny BMK.....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Organické kyseliny.....	12
2.3.2 Peroxid vodíku.....	13
2.3.3 Oxid uhličitý.....	14
2.3.4 Antimikrobiální peptidy – bakteriociny .....	14
<b>2.4 Imunomagnetická separace .....</b>	<b>23</b>
<b>3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Materiál .....</b>	<b>26</b>
4.1.1 Bakteriální kmeny .....	26
4.1.2 Magnetické nosiče a protilátky použité pro imunomagnetickou separaci .....	28
4.1.3 Přístroje a pomůcky .....	29
<b>4.2 Metody .....</b>	<b>29</b>
4.2.1 Kultivace bakterií.....	29
4.2.2 Izolace bakteriální DNA .....	30
4.2.3 Stanovení koncentrace DNA.....	30
4.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	31
4.2.5 Příprava amplikonů pro sekvenování .....	38
4.2.6 Bioinformatická analýza .....	38
4.2.7 DNA/DNA hybridizace .....	39
4.2.8 Testy antimikrobiální aktivity .....	40
4.2.9 Kompetice o vazebná místa na Caco-2 buňkách.....	43
4.2.10 Odolnost k podmínkám gastrointestinálního traktu .....	44
4.2.11 Rezistence k antibiotikům .....	44
4.2.12 Imunomagnetická separace buněk .....	45
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Identifikace kmenů rodu <i>Lactobacillus</i> s využitím metod založených na amplifikaci DNA .....</b>	<b>47</b>
5.1.1 Blíže příbuzné druhy skupiny <i>L. casei</i> .....	49
5.1.2 Blíže příbuzné druhy skupiny <i>L. acidophilus</i> .....	52
5.1.3 Porovnání sekvencí genů pro 16S rRNA .....	53
5.1.4 Stanovení příbuznosti pomocí fingerprintových technik .....	54
5.1.5 Shrnutí druhové identifikace kmenů .....	55
<b>5.2 Produkce antimikrobiálních látek kmeny rodu <i>Lactobacillus</i> .....</b>	<b>56</b>
5.2.1 Testování produkce antimikrobiálních látek pomocí agarového kapkového testu .....	56
5.2.2 Testování produkce antimikrobiálních látek pomocí agarového difuzního testu .....	62
5.2.3 Charakterizace antimikrobiálních látek bílkovinného původu .....	64
5.2.4 Stanovení produkce antimikrobiálních látek v supernatantech v průběhu růstu kmenů .....	70
5.2.5 Diluční test .....	73

5.2.6	Skríning přítomnosti genů pro produkci bakteriocinů pomocí DNA/DNA hybridizace a PCR .....	74
5.2.7	Skríning DNA kmenů na přítomnost genetických determinant genových klastrů .....	80
	<b>5.3 Stanovení vybraných probiotických vlastností .....</b>	<b>84</b>
5.3.1	Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik .....	85
5.3.2	Skríning přítomnosti genů pro vybrané probiotické a další vlastnosti .....	89
	<b>5.4 Imunomagnetická separace buněk .....</b>	<b>92</b>
5.4.1	Interference magnetických nosičů v PCR .....	92
5.4.2	IMS buněk <i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900 .....	92
5.4.3	IMS buněk <i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900 přidaných do mléka .....	94
5.4.4	IMS buněk <i>L. rhamnosus</i> LOCK 0900 přidaných do bílého jogurtu .....	95
	<b>6. ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ .....</b>	<b>97</b>
	<b>7. ZKRATKY .....</b>	<b>99</b>
	<b>8. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>100</b>
	<b>9. ŽIVOTOPIS AUTORA .....</b>	<b>114</b>
	<b>10. KOMPLETNÍ SOUHRN PUBLIKACÍ AUTORA .....</b>	<b>116</b>
	<b>11. PŘÍLOHY .....</b>	<b>119</b>



## 1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Bakterie mléčného kvašení (BMK) osidlující lidský gastrointestinální trakt jsou úzce spojeny se zdravím. Jsou důležitým biologickým ochranným faktorem zabraňujícím kolonizaci a následovně proliferaci patogenních bakterií v lidském střevě. Probiotické bakterie mléčného kvašení jsou nyní součástí řady výrobků potravinářského průmyslu. Dříve byly tyto zdraví prospěšné bakterie přidávány pouze do mléčných výrobků (jogurty, jogurtová mléka či sýry). V současné době jsou využívány i v mnoha jiných potravinách a nápojích od cereálií až k ovocným džusům. „Probiotický průmysl“ zaujímá asi 10 % na světovém trhu s potravinami. Nedávno publikované studie ukazují, že množství produktů obsahujících probiotické bakterie mléčného kvašení každoročně vzrůstá napříč všemi kontinenty a „probiotický průmysl“ je tak velkým příslibem i do budoucna. Probiotické výrobky totiž užívají i konzumenti, kteří jsou zdraví. Konzumují je z důvodu, že chtějí redukovat potenciální riziko onemocnění střev, ledvin, respiračního traktu nebo srdce. Konzumace probiotických výrobků však nemůže nahradit zdravý životní styl a vyváženou stravu.

Produkce antimikrobiálních látek probiotickými kmeny může být využívána pro konzervaci potravin, do kterých jsou probiotika přidávána. Především je tak inhibován výskyt nežádoucích a patogenních mikroorganismů, čímž dochází k prodloužení životnosti potravin a k zvýšení jejich bezpečnosti z hlediska konzumenta. Výhodou je, že se jedná o konzervaci potravin bez přidání exogenních chemických konzervantů a o způsob přijatelný pro stále náročnější spotřebitele. Mimo to lze také nahradit intenzivní zahřívání některých potravin, což má pozitivní vliv na organoleptické a nutriční vlastnosti potravinářských výrobků.

Narůstající rezistence bakterií vůči antibiotikům je ve světě čím dál tím větším problémem, a to nejen v klinické mikrobiologii, ale také ve veterinární mikrobiologii a potravinářství. Obava z toho, že v budoucnu nebude možné inhibovat některé patogenní kmeny antibiotickými preparáty a léčit tak některé infekce, se stává velmi reálnou. Na nadužívání antibiotických preparátů či jejich nesprávné používání upozorňuje i Evropská Komise. Proto je nutné hledat účinné alternativy. Produkce bakteriocinů by mohlo být využito nejen v potravinářském průmyslu, ale především v klinické mikrobiologii jako alternativa k antibiotickým preparátům. Navzdory mnoha výsledkům vědy, nalezení efektivní léčby infekčních onemocnění zůstává globálním problémem, přičemž nedostatečné řešení způsobuje ztrátu miliónů životů každý rok.

Z výše uvedených důvodů je velmi důležitá a žádaná izolace, identifikace a studium vlastností u nových potenciálních probiotických kmenů bakterií mléčného kvašení, které produkují antimikrobiální substance.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Využití bakterií mléčného kvašení v potravinářském průmyslu

Bakterie mléčného kvašení (BMK) netvoří jednotnou fylogenetickou skupinu, ale skupinu bakterií patřící do kmene *Firmicutes*, které mají podobné metabolické vlastnosti. Do této skupiny jsou řazeny rody *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Ke skupině BMK jsou často z historických důvodů na základě podobných biochemických a fyziologických vlastností řazeny i rody *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Scardovia* a *Parascardovia*, ačkoliv fylogeneticky patří do kmene *Actinobacteria* (Pot a Tsakalidou 2009).

Některé druhy BMK jsou po staletí používány k fermentaci nejrůznějších potravin. Proto jim byl přidělen status GRAS (Generally Recognized As Safe) tzn., že jsou považovány za zcela bezpečné. Řada druhů BMK je využívána v mlékárenském průmyslu při výrobě jogurtů jako startovací kultury (*Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*) nebo při výrobě a zrání sýrů (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* a mnohé další). Svou přítomností a fermentací substrátu ovlivňují organoleptické a reologické vlastnosti výsledného mléčného výrobku. Například během fermentačního procesu se v jogurtech zvyšuje koncentrace folátů (kyselina listová a její deriváty, které jsou důležité v mnoha metabolických drahách např. při biosyntéze nukleotidů). Vybrané druhy BMK, které produkují zvýšené množství folátů, mohou být využity jako startovací kultury při fermentaci mléčných výrobků a tím zvýšit jejich nutriční hodnotu (Smid a Wood 2011).

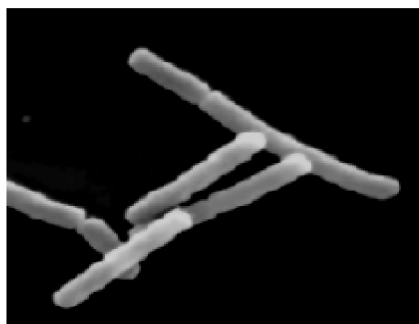
Vybrané druhy BMK jsou také používány při výrobě fermentovaných masných výrobků. Je využíváno vlastnosti BMK produkovat kyselinu mléčnou, která spolu s přítomnými solemi chrání čerstvé maso (především ryby) a masné výrobky před kažením. Nevýhodou jejich aplikace je výsledná kyselá chuť masa. Při fermentaci klobás se především používají druhy *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus sakei*. Ty sice sami o sobě neutvářejí typické organoleptické vlastnosti této potraviny, ale slouží k ochraně před nežádoucí bakteriální mikrobiotou. BMK jsou využívány i při fermentaci zelí, oliv či okurek a patří mezi dominantní mikroorganismy vyskytující se v těchto substrátech (Smid a Wood 2011). Výše popsané využití BMK při zpracování různých fermentovaných potravin je jen malou ukázkou velké rozmanitosti v aplikacích druhů BMK a ani zdaleka není úplné. Vzhledem k bezpečnosti a schopnosti produkovat nejrůznější antimikrobiální látky lze na některé kmeny s příslibem pohlížet jako na potenciální probiotika. Pozornost je především zaměřena na kmeny různých druhů rodu *Lactobacillus*.

### 2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* patří fylogeneticky do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*. Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou gram-pozitivní nesporulující pravidelné tyčky či kokotyčky, které tvoří krátké řetízky či palisády (Obr. 1). Jsou kataláza negativní, zřídka pohyblivé peritrichálními bičíky, fakultativně anaerobní, mikroaerofilní či anaerobní. Rostou na bohatých komplexních médiích a jejich růst podporuje atmosféra s 5 % oxidu uhličitého. Na základě konečných produktů fermentace je možné laktobacily rozdělit do tří skupin (Sedláček 2007):

- obligátně homofermentativní (fermentují hexózy výhradně na kyselinu mléčnou),
- fakultativně heterofermentativní (fermentují hexózy na kyselinu mléčnou nebo na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a ethanolu; pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou),
- obligátně heterofermentativní (fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, octovou či ethanol a oxid uhličitý; pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou).

Bakterie rodu *Lactobacillus* se přirozeně nacházejí v lidském i zvířecím těle, na rostlinách, v rostlinných materiálech a ve fermentovaných potravinách (sýry, jogurty, fermentované mléko, maso, zelenina). Laktobacily patří k běžné mikroflóře gastrointestinálního traktu zdravého člověka; jsou přítomny v ústní dutině, v koncové části tenkého střeva, v tlustém střevě a jsou dominantními mikroorganismy ve vagině (Bernardeau a kol. 2008). Pouze vzácně jsou některé kmeny patogenní (Sedláček 2007). Z celkového množství bakterií detegovaných ve stolici dospělého člověka, je zastoupení bakterií rodu *Lactobacillus* velmi nízké (0,01 - 0,6 %)(Leeber a kol. 2008). Mají řadu vlastností, které pozitivně ovlivňují zdraví hostitele (Kirtzalidou a kol. 2011, Vesterlund a kol. 2005). Druhy rodu *Lactobacillus* patří mezi jedny z nejvíce studovaných bakterií izolovaných z lidského těla.



**Obr. 1: Morfologie buněk bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* (zvětšení neuvedeno)**  
(převzato a upraveno dle [www.cals.ncsu.edu/food\\_science/KlaenhammerLab/Project.html](http://www.cals.ncsu.edu/food_science/KlaenhammerLab/Project.html))

## 2.2 Probiotika

Termín probiotika je odvozen z řeckého „pro bios“ což znamená „pro život“. Probiotika jsou definována jako živé organismy, které pokud jsou konzumovány v adekvátním množství, pozitivně ovlivňují zdraví hostitele (Quigley 2011). Ačkoliv bylo prokázáno, že mrtvé bakterie, části bakteriálních buněk, bakteriální DNA a uvolňované substance mají antibakteriální, protizánětlivý, imunomodulační a další efekty podobné těm, které vykazují živé bakteriální buňky, omezení termínu probiotický je dosud vyhrazeno výhradně pro živé buňky (Quigley 2011). Otázka životnosti probiotických bakterií je však v současné době často diskutována. Mnoho prospěšných účinků bylo připsáno také UV-inaktivovaným nebo mrtvým probiotickým kmenům (Ishikawa a kol. 2010, Kataria a kol. 2009, Lopez a kol. 2008).

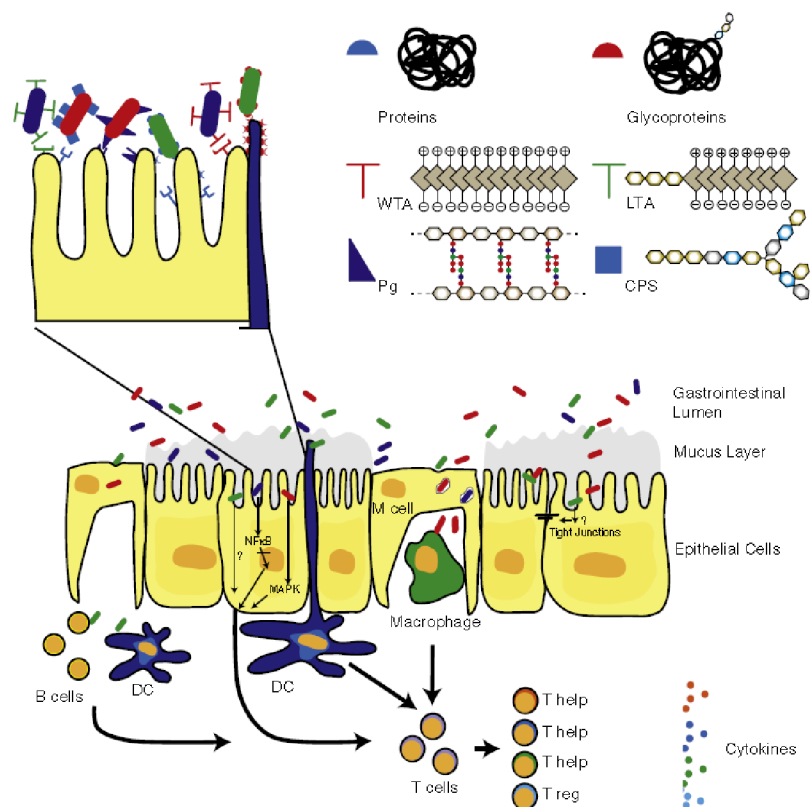
Probiotika a jejich pozitivní účinek na lidské zdraví je znám již od počátku dvacátého století, přesto však jsou dosud málo prostudované. Bylo zjištěno, že probiotické druhy jsou schopny rozpoznávat, syntetizovat a uvolňovat nízkomolekulární bioaktivní látky různého chemického složení, které mohou penetrovat do intestinálního traktu, přilehlých tkání a buněk a modifikovat fyziologické nebo metabolické procesy v lidském těle vyúsťující ve zdraví prospěšný efekt. Probiotické kmeny mohou také spouštět kaskádu událostí spojenou s expresí různých genů, jejichž produkty mohou ovlivňovat interakce mezi bakteriemi navzájem nebo mezi bakteriemi a buňkami lidského těla. Mechanismus je u různých probiotických kmenů odlišný (Shenderov 2011).

### **2.2.1 Probiotika a lidský gastrointestinální trakt**

Před narozením je lidský gastrointestinální trakt (GIT) sterilní. Hned po narození se začíná osídlovat okolními mikroorganismy nebo mikroorganismy z potravy. Mikroorganismy vyskytující se v GIT se nazývají mikrobiota (termín dnes nahrazuje dřívější označení mikroflóra). Mikrobiota se s věkem vyvíjí a stává se stabilní. Pokud je narušena třeba užíváním antibiotik, má schopnost se rychle obnovit (Quigley 2011).

Intestinální mikrobiota je v lumenu střeva oddělena od hostitelských tkání epiteliální výstelkou, která tvoří bariéru mezi střevním lumenem a lamina propria (vrstva nacházející se pod epitelem a obsahující různé typy imunitních buněk)(Wells a kol. 2011). Gastrointestinální epiteliální výstelka se skládá z mnoha druhů buněk, z nichž nejdůležitější jsou střevní buňky - enterocyty, které jsou navzájem propojeny a komunikují mezi sebou pomocí tzv. těsných spojů (tight junction) (Snoeck a kol. 2005).

Mikrobiota je v úzkém kontaktu se střevní mukózou a epiteliální výstelkou střeva, jejíž povrch měří kolem 250-400 m<sup>2</sup> v závislosti na daném jedinci. Mikroorganismy tvořící mikrobiotu (mimo jiné i různé druhy BMK) jsou nepravidelně rozloženy v celém trávicím traktu a jsou rozpoznávány buňkami GIT, které odpovídají na podněty sekrecí chemokinů a cytokinů (Obr. 2)(O'hara a Shanahan 2006).



**Obr. 2: Interakce BMK a hostitelských buněk v GIT (převzato a upraveno dle Remus a kol. 2011)**

Kmeny různých druhů BMK jsou schopné interagovat s epiteliálními buňkami vazbou na specifické receptory. Receptory rozpoznávají specifické molekulární struktury, včetně kapsulárních polysacharidů (CPS), teichoových kyselin (WTA, LTA), peptidoglykanu (PG), proteinů a glykoproteinů. Interakce ovlivňují expresi proteinů a podporují diferenciaci T buněk, čímž dochází k produkci cytokinů. DC - dendritické buňky; M – M buňky; MAPK- mitogenem aktivované proteinkinázy; NFκB - transkripční faktory ovlivňují expresi genů.

Počet bakterií ve střevech je asi desetkrát větší než celkový počet buněk lidského těla. V komplexním ekosystému GIT se nachází asi 1000-1150 bakteriálních druhů;  $10^{13}$  -  $10^{14}$  buněk mikroorganismů s největší denzitou a diverzitou se nachází v tlustém střevě (Lee a Mazmanian 2010). Složení střevní mikrobioty není u všech jedinců stejné. Pomocí DNA sekvenování bylo ukázáno, že bakteriální komunita GIT se liší v závislosti na regionu a mění se v průběhu života každého jedince (Dominguez-Bello a kol. 2011). Bylo také zjištěno, že existuje asi 57 bakteriálních druhů, které jsou pro všechny společné. Mezi nejvíce zastoupené patří bakterie taxonomicky řazené do kmenů *Bacteroides* a *Firmicutes*. Bakterie patřící do těchto dvou kmenů pak tvoří zhruba 90 % podíl všech bakterií detegovaných v lidském GIT (Arakawa a kol. 2009).

Mikroorganismy vyskytující se v GIT umožňují mimo jiné zpracování některých nestravitelných živin (například umožňují hydrolýzu některých, jinak nevstřebatelných sacharidů), chrání před kolonizací střeva nežádoucími patogenními bakteriemi, udržují integritu epitelální bariéry a významně ovlivňují vývoj imunitního systému (Arakawa a kol. 2009, Quigley 2011).

Pro charakterizaci nových probiotických kmenů bakterií je nutné dobře pochopit procesy probíhající v GIT na molekulární úrovni, včetně interakcí mezi potenciálními probiotickými kmeny laktobacilů a střevními buňkami (Kleerebezem a kol. 2010).

### **2.2.2 Identifikace probiotického bakteriálního kmene**

Velký zájem o probiotika vyústil na počátku 21. století v obrovský počet nově popisovaných probiotických kmenů. Řada nově izolovaných kmenů BMK s potencionálními probiotickými vlastnosti byla izolována z GIT (Tulumoglu a kol. 2013). Z tohoto důvodu bylo nutné stanovit pravidla pro popis nových probiotických kmenů využívaných v potravinách a krmivech. Tato kritéria spolu s doporučenou metodikou byla sestavena a schválena pracovní skupinou při FAO (2006) a dále rozšířena a upřesněna (Pineiro a Stanton 2007).

Probiotické vlastnosti jsou kmenově specifické, a proto musí být molekulární výzkum laktobacilů a jejich probiotických vlastností zaměřen na kmen. To znamená, že výsledky dosažené pro jeden kmen nelze generalizovat a přisuzovat celému druhu. Pouze jeden určitý probiotický kmen určitého druhu rodu *Lactobacillus* může být spojován s daným efektem, s daným množstvím a expresí určité molekuly nebo se sekrecí určitého proteinu a metabolitu přímo interagujícího s hostitelskou buňkou (Lebeer a kol. 2008). Proto je k přiřazení specifických zdravotních efektů velmi důležitá identifikace kmene. Pro identifikaci probiotického kmene je třeba použít více metod, a to jak metod fenotypových (fyziologických a biochemických), tak metod genotypových – tzv. polyfázní přístup.

Z fenotypových metod se využívá především biochemický test API50CH (Pot a Tsakalidou 2009). Ačkoliv rozsáhlá charakteristika fyziologických a biochemických vlastností má důležitý význam v praktických aplikacích těchto bakterií, je méně významná pro klasifikační a identifikační účely, zejména u blízce příbuzných druhů. K taxonomickým účelům se využívají především molekulárně-biologické metody (Ehrmann a Vogel 2005). Přesto je nutné zdůraznit, že existuje celá řada kultivačních medií, která jsou selektivní pro dané rody (Rada a kol. 2000).

Genotypové techniky se dělí na metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) a metody nevyužívající PCR. Mezi molekulárně-biologické metody založené na PCR patří standardní PCR (rodově či druhově specifická), interrepetitivní polymerázová řetězová reakce (rep-PCR), náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD), denaturační gradientová gelová elektroforéza produktů PCR (DGGE), teplotní gradientová gelová elektroforéza produktů PCR

(TGGE), polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) nebo restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA (ARDRA)(Ehrmann a Vogel 2005, McCartney 2002). Mezi molekulárně-biologické techniky nevyužívající PCR patří především ribotypizace, polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) a pulzní gelová elektroforéza (PFGE)(Singh a kol. 2009).

Sekvenování genu pro 16S rRNA (asi 1500 párů bází) je v současné době jednou z nejpoužívanějších metod pro identifikaci mikroorganismů. Vzhledem k jeho univerzální přítomnosti ve všech buňkách a konzervativnímu složení je gen vhodný pro studium fylogenetických vztahů. Gen kódující 16S rRNA může být sekvenován přímo po amplifikaci v PCR s využitím univerzálních 16S primerů. Veřejně dostupné databáze obsahují relativně velké množství částečných sekvencí genu pro 16S rRNA (Pot a Tsakalidou 2009).

V poslední době se rychle rozvíjí metoda sekvenování bakteriálních genomů (Singh a kol. 2009). Analýza genomu může poskytnout informace o vlastnostech daného mikroorganismu, jeho metabolických funkcích, fyziologii, biochemických vlastnostech a schopnostech adaptace na různé podmínky a prostředí. Sekvenování celého genomu a srovnávání genomů jednotlivých kmenů umožňuje určit odlišnosti či podobnosti mezi kmeny a objevení genových funkcí, unikátních pro daný kmen (Klaenhammer a kol. 2005). Vzhledem k tomu, že existuje velké množství molekulárně-biologických metod, lze vybrat vhodnou metodu s ohledem na vybavení laboratoře, náročnost a rychlost metody (Wall a kol. 2007).

### **2.2.3 *In vitro* testování vlastností probiotických kmenů**

Využití probiotického kmene závisí mimo jiné na jeho schopnosti přežít v dostatečném množství průchod GIT. Všeobecně se udává, že  $10^9$  CFU/g je dostatečná dávka pro projevení se probiotického efektu (Tannock 2003). Tyto testy jsou prováděny *in vitro* (Marianelli a kol. 2010). Řada autorů se snažila simulovat co nejméně podmínky GIT použitím reaktorů, ve kterých byla kontrolována teplota, doba průchodu, míchání, pH a koncentrace žlučových solí (Mainville a kol. 2005, Molly a kol. 1993).

Pro studium probiotických kmenů jsou nejvíce používanými následující testy *in vitro* (FAO 2006):

- rezistence k žaludečním kyselinám (nízkému pH)
- rezistence k žlučovým solím a schopnost je hydrolyzovat
- adherence k lidským epiteliálním buňkám (buněčným liniím)
- inhibice patogenních kmenů - antimikrobiální aktivita
- schopnost redukovat adhezi patogenů k povrchu epiteliálních buněk

Kritickým krokem infekce je pro patogenní bakterie adheze na enterocyty, což jim umožní uvolnění enzymů a toxinů, které jsou nutné k započatí nekrotizujících procesů (Jankowska a kol. 2008). Jako experimentální model studií zabývajících se interakcí enterocytů a bakteriálních buněk lze využít linie epiteliálních Caco-2 buněk (human colon carcinoma cell line), které po třítydenní diferenciaci v laboratorních podmínkách exprimují několik markerů charakteristických pro enterocyty. Důležitá je jejich schopnost adheze na povrch epiteliálních buněk lidského gastrointestinálního traktu, které zabraňují adhezi patogenních mikroorganismů (Jepson a kol. 1996).

Navzdory vysoké vědecké hodnotě těchto *in vitro* testů je převedení výsledků na situaci *in vivo* značně obtížné, protože není zahrnuta komunikace mezi buňkami navzájem, komunikace mezi buňkami a hostitelem a vliv mikrobiální komunity jedince (Remus a kol. 2011). Proto je snaha data z *in vitro* testů doplnit informacemi o chování probiotického kmene *in vivo* (Marianelli a kol. 2010).

I když bakterie rodu *Lactobacillus* jsou považovány za bezpečné (mají status GRAS) u potenciálních probiotických kmenů je přesto doporučeno, před jejich použitím v potravinářství či jiných oblastech, provést následující testy (FAO 2006):

- stanovení rezistence k vybraným antibiotikům
- zhodnocení všech nežádoucích projevů u konzumentů daného výrobku
- zhodnocení zda kmen patří k druhu, který je znám produkcí toxinů
- zhodnocení zda kmen patří k druhu, který je známý hemolytickou aktivitou

Existuje totiž několik studií, které naznačují, že některé probiotické kmeny různých druhů rodu *Lactobacillus* mohou být potenciálně patogenní a zodpovědné za některé systémové infekce a nadměrné stimulační imunity u citlivých jedinců (Marteau 2001). Je však pouze několik zdokumentovaných případů a všechny byly pozorovány u jedinců dlouhodobě nemocných nebo u jedinců s oslabenou imunitou (FAO 2006).

V potravinářském průmyslu je také důležité zabezpečit, aby použité probiotické kmeny netvořily v potravinách biogenní aminy. V nízkých koncentracích jsou biogenní aminy přirozenou složkou především fermentovaných potravin. Mezi nejčastěji se vyskytující biogenní aminy patří histamin, tyramin, fenylalanin, putrescin a kadaverin (Coton a kol. 2010). Biogenní aminy (histamin, tyramin) vznikají v důsledku aktivity dekarboxyláz produkovaných gram-pozitivními bakteriemi. Běžně neznamenají biogenní aminy pro zdravé osoby žádný problém. Při nadměrnému příjmu může však docházet k poruchám centrálního nervového systému, poruchám krevního oběhu, zhoršené funkci jater, bolestem hlavy, bušení srdce, zvracení a průjmům (Shalaby 1996, Coton a Coton 2005). Česká a evropská legislativa stanovuje limity pro



potraviny, které by mohly znamenat největší riziko (např. limit pro tyramin v sýrech nebo histamin v rybách).

Velmi zajímavým tématem je produkce konjugovaných kyselin linoleových (CLA), které jsou směsí pozičních a geometrických izomerů linoleových kyselin o 18 uhlících. Běžně se nacházejí v hovězím mase, jehněčím mase či v mléčných výrobcích. Zdravotní efekty kongujovaných linoleových kyselin byly prokázány a jsou to například prevence vůči atheroskleróze, různým typům rakoviny, vysokému krevnímu tlaku a také zlepšují imunitní funkce. Celkem bylo popsáno 28 různých CLA izomerů, přičemž nejčastěji se vyskytují izomery *cis-9* a *trans-11* (příjem z potravy více než 90% ) (Bhattacharya a kol. 2006).

#### **2.2.4 In vivo studie potenciálních probiotických kmenů**

Studie *in vivo* jsou prováděny především na zvířecích modelech, následně pak probíhají klinické studie (Snel a kol. 2010). Hlavním cílem těchto studií je prokázání prospěšného efektu na zdraví lidí (např. snížení rizika určitých nemocí nebo rychlejší zotavení z nemoci). Zdravotní efekt se většinou týká onemocnění spojených s GIT (akutní průjmy bakteriálního i virového původu, průjmy způsobené nozokomiálním druhem *Clostridium difficile* a průjmy po terapii antibiotiky). Mimo jiné byly prokázány i efekty redukující výskyt alergií či naopak stimulační imunitní systém (Pineiro a Stanton 2007). Pro potvrzení zdravotního efektu se dělají náhodné tzv. dvojitě-zaslepené placebem kontrolované (DBPC) testy. Studie musí zohlednit i případnou potravinu, ve které by se potenciální probiotický kmen mohl v budoucnu používat (FAO 2006).

Molekulární mechanismy způsobující většinu zdraví prospěšných efektů, nejsou zcela známy. Je jasné, že se liší od jednoho probiotického kmene k druhému a mohou být kombinací mnoha faktorů. Některé mechanismy jsou však definovány dobře, např. schopnost jistých kmenů probiotik zmírnit laktózovou intoleranci produkcí enzymu  $\beta$ -galaktosidázy, který hydrolyzuje laktózu (Pineiro a Stanton 2007).

#### **2.2.5 Využití probiotických kmenů BMK v potravinářském průmyslu**

Nejvýznamnější zdrojem probiotických kmenů bakterií jsou pro spotřebitele mléčné výrobky (Champagne a kol. 2011). Pro samotnou fermentaci pasterizovaného mléka při přípravě fermentovaných mléčných výrobků nejsou tyto probiotické kmeny vyžadovány, ale jsou přidávány aby „kofermentovaly“ sacharidy spolu se startovacími kulturami (Ng a kol. 2011). Ačkoliv se udává, že mléčné výrobky jsou nejlepší matrice, jejich nevýhodou je skutečnost, že nemohou být konzumovány osobami s laktózovou intolerancí (Heenan a kol. 2004). Proto se pozornost obrací i na možnosti využití probiotických potravin vyrobených z jiných než mléčných

matric. Jedná se o masné výrobky, cereálie, sóju, ovocné džusy, zeleninu a další)(Champagne a kol. 2011, Giraffa a kol. 2010, Rivera-Espinoza a kol. 2010).

Ačkoliv nejdůležitější charakteristikou probiotických bakterií je jejich pozitivní efekt na zdraví hostitele, je také nesmírně důležité zhodnocení jejich technologických vlastností (Vinderola a kol. 2002). Mezi nejdůležitější vlastnosti patří schopnost probiotické kultury zachovat si životnost během zpracování a uchování potraviny (Kanmani a kol. 2011). Životnost probiotických kmenů v potravní matrix závisí na celé řadě faktorů (Kataria a kol. 2009, Mattila-Sandholm a kol. 2002, Rivera-Espinoza a kol. 2010, Tannock 2003):

- fyziologický stav probiotického kmene (ve které fázi životního cyklu byl do výrobku přidán)
- koncentrace buněk v čase konzumace daného výrobku (optimální množství přijatých buněk pro projevení zdraví prospěšného efektu je  $10^9$  CFU/g)
- fyzikální podmínky během skladování výrobku s probiotickým kmenem (teplota skladování, hladina kyslíku)
- chemické složení produktu, ke kterému je probiotický kmen přidán (pH, přítomnost inhibitorů růstu a aktivity probiotického kmene)
- interakce probiotického kmene s původní mikroflórou potraviny

Probiotické potravinové výrobky v současnosti dostupné na trhu jsou většinou ve stavu tekutém. Pozornost je však věnována i sušeným formám, které umožňují vyšší přežití bakteriální probiotické kultury při průchodu GIT (Klayraung a kol. 2009). Mezi na trhu dostupné potravinové výrobky se sušenými probiotiky patří cereálie, dětská výživa a sušené mléko.

Dnes jsou dostupné následující formy výrobků obsahující sušené probiotické kmeny (Champagne a kol. 2011):

- mikrokapsle (produkty obsahují částice o velikosti 50 až 250  $\mu\text{m}$ )
- tablety

Mikroenkapsulace se používá pro balení bakteriálních buněk do miniaturních kapslí, které mohou uvolňovat svůj obsah kontrolovanou rychlostí za specifických podmínek (Anal a Singh 2007). K vytvoření mikrokapslí mohou být použity různé polymery a gelové matrice biologického původu jako je škrob, kyselina alginová, karagenan a xanthan (Semyonov a kol. 2010). Životnost probiotického kmene *L. rhamnosus* E-97800 enkapsulovaného do škrobových granulí, který byl skladován při pokojové teplotě a za normální atmosférické vlhkosti, byla nejméně šest měsíců, při zmražení 18 měsíců. Použití těchto kapslí při průchodu GIT ukázalo, že materiál kapslí byl rezistentní k horní části GIT, čili nízkému pH a žlučovým solím (Mattila-Sandholm a kol. 2002).

Z testů je patrné, že enkapsulované buňky jsou uvolňovány z kapslí na konci ilea a na začátku tlustého střeva (Chan a Zhang 2005). Výhodou mikroenkapsulace je také zakomponování kryoprotektivních a osmoprotektivních komponent do kapslové matrice, které zvyšuje přežití buněk během zpracování a uskladnění výrobku (Anal a Singh 2007).

Kromě kapslí mohou být probiotické kmeny podávány ve formě tablet, které však nedosahují ochranného potenciálu kapslí obsahujících probiotický kmen (Klayaung a kol. 2009). Je doporučeno, aby na obalu potraviny obsahující probiotický kmen byl vyznačen minimální počet živých buněk na konci trvanlivosti potraviny, zdravotní účinek, doporučený způsob skladování a především rodové a druhové jméno a označení kmene probiotické bakterie (Pineiro a Stanton 2007).

### **2.3 Antimikrobiální látky produkované kmeny BMK**

Bakteriální antagonismus je znám již dlouhá staletí. Průkopníkem laboratorních studií bakteriálního antagonismu byl Louis Pasteur na konci devatenáctého století. Mezi nejvýznamnější antimikrobiální látky, produkované kmeny různých druhů rodu *Lactobacillus*, patří organické kyseliny, peroxid vodíku, antimikrobiální peptidy - bakteriociny (Ghanbari a kol. 2013) a oxid uhličitý (Lebeer a kol. 2008). Produkce je závislá na kultivačních podmínkách, druhu metabolismu BMK a také na substrátu (Álvarez-Martín a kol. 2008).

Zpočátku byla věnována pozornost především schopnosti bakteriálních buněk inhibovat patogeny. S nástupem antibiotik se dostaly další antimikrobiální látky do pozadí. V současné době se pozornost opět obrací na produkci antimikrobiálních látek BMK (Lacroix 2011). Většina bakterií mléčného kvašení vykazuje antimikrobiální aktivitu proti řadě patogenů v nízkých koncentracích (Chahad a kol. 2012, Belguesmia a kol. 2011, Messaoudi a kol. 2013). Některé kmeny BMK mohou inhibovat methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a vankomycin rezistentní enterokoky (VRE) (Karska-Wysocki a kol. 2010). Vliv na viry nebyl dosud spolehlivě dokumentován na molekulární úrovni (Lebeer a kol. 2008).

#### **2.3.1 Organické kyseliny**

Druhy rodu *Lactobacillus* produkují během fermentace substrátu různé typy organických kyselin. Antimikrobiální efekt je způsoben tím, že nedisociované organické kyseliny způsobují kolaps elektrochemického gradientu, narušují integritu membrány, což vede k poruše transportního systému. Samotné snížení pH okolního prostředí je inhibiční pro bakterie citlivé k nízkému pH (Lacroix 2011, Podolak a kol. 1996, Snijders a kol. 1985).

Kyselina mléčná je klíčová antimikrobiální sloučenina produkovaná všemi rody BMK a především pak druhy rodu *Lactobacillus*. Kyselina mléčná snižuje pH a v nedisociované formě způsobuje permeabilizaci vnější membrány gram-negativních bakterií a umožňuje tak přístup

dalších antimikrobiálních látek k cytoplazmatické membráně bakteriální buňky. Kromě narušení membrány může kyselina mléčná porušovat homeostázu vnitřního prostředí bakteriální buňky (Salam a kol. 2008). Popsán byl i synergický efekt dalších antimikrobiálních sloučenin s kyselinou mléčnou. Kromě toho může kyselina mléčná vázat prvky esenciální pro růst mikroorganismů, jako je například železo. Tím zabraňuje nebo zpomaluje jejich růst (Alakomi a kol. 2000, Lebeer a kol. 2008). Kombinace kyseliny mléčné a měďnatých iontů v určité koncentraci inhibuje růst potravinových patogenů (Salam a kol. 2008). Bylo zjištěno, že kmeny rodu *Lactobacillus* izolované z ústní dutiny produkují méně kyseliny mléčné než kmeny izolované ze stolice. Všeobecně bylo prokázáno, že kmeny produkují méně kyseliny mléčné, pokud jsou kultivovány za přítomnosti kvasničného extraktu a sacharózy; více pak za přítomnosti glukózy, fruktózy a laktózy (Bosch a kol. 2012).

Vždy je důležité zvážit budoucí aplikaci kmene. Produkce kyselin ve zvýšeném množství snižuje pH a tím může redukovat množství patogenů. Na druhou stranu při aplikaci probiotického kmene v ústní dutině (redukce výskytu onemocnění jako jsou periodontitida, gingivitida či zubní kaz) je vysoká produkce kyselin nežádoucí kvůli jejich vlivu na zubní sklovinu (Bosch a kol. 2012).

### **2.3.2 Peroxid vodíku**

Peroxid vodíku je produkován v přítomnosti kyslíku jako výsledek činnosti flavoproteinových oxidáz nebo nikotinamidadeninukleoidových peroxidáz. Antimikrobiální efekt peroxidu vodíku je založen na oxidaci sulfyhydroylových skupin způsobujících denaturaci mnoha enzymů (tvorba disulfidických skupin) a na peroxidaci membránových lipidů, což vede k zvýšení membránové permeability (Kong a Davison 1980). Přesný molekulární mechanismus však není úplně znám (Lebeer a kol. 2008). Peroxid vodíku může být taktéž prekurzorem produkce superoxidových ( $O_2^-$ ) a hydroxylových ( $OH\cdot$ ) radikálů, které mohou poškozovat DNA (Byczkowski a Gessner 1988).

Peroxid vodíku patří mezi klíčové antimikrobiální látky, které se tvoří především u bakterií rodu *Lactobacillus* ve vagině zdravých žen. Bylo prokázáno, že u zdravých žen v produktivním věku je procento producentů peroxidu vodíku velmi vysoké (96-98%) (Dimitonova a kol. 2007). Mnoho *in vitro* studií ukazuje, že laktobacily produkující peroxid vodíku mají toxický a inhibiční efekt na patogeny vyskytující se ve vagině, jenž způsobují bakteriální vaginózy (Mijač a kol. 2006), vulvovaginální kandidózy nebo trichomoniázy (zodpovědné za více než 90% infekčních vaginitid). Inhibice patogenních kmenů kvasinek ve vagině žen však často není výsledkem pouze produkce peroxidu vodíku, ale jedná se o kombinovaný inhibiční efekt více antimikrobiálních látek (Tomás a kol. 2011).

### **2.3.3 Oxid uhličitý**

Oxid uhličitý je produkován především heterofermentativními laktobacily a podílí se na tvorbě anaerobního prostředí, které inhibuje některé enzymy. Také akumulace oxidu uhličitého ve fosfolipidové dvojvrstvě může způsobit disfunkci v permeabilitě membrány (Eklund 1984). Oxid uhličitý může efektivně inhibovat růst mnoha patogenů v potravinách, hlavně gram-negativních bakterií. V koncentraci 10 % může snížit růst některých patogenů až o 50 %, a v koncentraci 20-50 % má silnou antifungální aktivitu (Lindgren a Dobrogosy 1990). Kombinací bakteriocinu nisinu a 100 % atmosféry oxidu uhličitého byl zvýšen antilisteriální efekt bakteriocinu (Nilsson a kol. 1997).

Oxid uhličitý za vysokého tlaku se používá k ochraně potravin před nežádoucími mikroorganismy. Tato aplikace nevyžaduje vysokou teplotu. Z tohoto důvodu je minimalizován vliv vysoké teploty na kvalitu potravin. Přesný mechanismus antimikrobiálního účinku oxidu uhličitého za vysokého tlaku není plně znám. Nejspíše se jedná o ireverzibilní modifikaci membrány, změnu konformace bakteriální DNA a inaktivaci klíčových enzymů bakteriálního metabolismu (Garcia-Gonzalez a kol. 2010).

### **2.3.4 Antimikrobiální peptidy – bakteriociny**

V posledních dvou desetiletích vzrostl zájem o produkci antimikrobiálních peptidů a proteinů jako alternativy k chemickým konzervačním látkám a antibiotikům. Mezi nejstudovanější producenty antimikrobiálních peptidů patří především kmeny rodu *Lactobacillus* (Mkrtchyan a kol. 2010, Delavenne a kol. 2013).

Bakteriociny jsou přírodní antimikrobiální peptidy nebo proteiny o velikosti 30 až 60 aminokyselinových zbytků ribozomálně syntetizované některými bakteriemi. Jsou uvolňovány extracelulárně. Obvykle inhibují bakteriální druhy blízce příbuzné k producentovi (Arakawa a kol. 2009, Todorov 2009). Produkce bakteriocinů je důležitou charakteristikou pro probiotický kmen.

Pro některé antimikrobiální proteinové látky se používá termín bakteriocinům podobné substance. Tyto substance nejsou kompletně definované a neodpovídají kritériím pro bakteriociny, ale mají inhibiční vlastnosti a jsou bílkovinné povahy. Často jsou produkovány kmeny rodu *Lactobacillus* (Atanassova a kol. 2003).

Fáze růstového cyklu buněk, kdy jsou bakteriociny produkovány, se liší mezi kmeny i samotnými bakteriociny. Bylo zjištěno, že některé bakteriociny rodu *Lactobacillus* jsou produkovány během exponenciální fáze (Pringsulaka a kol. 2012). Na druhou stranu existují studie, ve kterých jsou některé bakteriociny produkovány během stacionární fáze růstu nebo v pozdní stacionární fázi růstu (Castro a kol. 2011, Jiang a kol. 2012).

Bylo také zjištěno, že kmeny různých druhů BMK mohou produkovat stejné bakteriociny. Přesto, že jsou totožné, jsou produkovány v jiné fázi životního cyklu producenta. Příkladem

mohou být bakteriociny sakacin A a curvacin A, produkované kmeny *Lactobacillus sakei* Lb706 a *Lactobacillus curvatus* LHT1174. Sakacin A je produkován během celé exponenciální fáze růstu, naproti tomu curvacin A je produkován v pozdní exponenciální fázi růstu (Lacroix 2011).

#### 2.3.4.1 Klasifikace bakteriocinů BMK

Klasifikace bakteriocinů BMK je složitá a byla několikrátě pozměněna. Pascual a kol. (2008) uvádí rozdělení bakteriocinů do pěti tříd; Todorov (2009) je dělí na tři hlavní třídy, které jsou dále členěny do podtříd a Lacroix (2011) pak na čtyři hlavní třídy rozdělené do podtříd. Dále budou podrobněji probrány jen první dvě třídy, do kterých patří většina bakteriocinů BMK a je na ně zaměřen výzkum (Lacroix 2011), protože mají největší potenciál pro využití v potravinářském průmyslu (Nes a kol. 1996).

##### 2.3.4.1.1 Třída I: Lanthibiotika

Lanthibiotika (lanthionine-containing antibiotic peptides) jsou malé (méně než 5 kDa) peptidy složené z 19 až 38 aminokyselin (O'Shea a kol. 2012, Sahl a Birbau 1998). Zahrnují řadu unikátních sloučenin, včetně posttranslačně modifikovaných peptidů obsahujících neobvyklé aminokyseliny lanthionin a  $\beta$ -methyllanthionin. Dříve byly členěny podle struktury na typ A, což jsou vláknité peptidy a typ B, což jsou více kompaktní a globulární peptidy. Nedávno byla rozdělena lantibiotika do šesti podskupin, založených na primárních sekvencích aminokyselin (Tabulka 1) (O'Connor a kol. 2005).

**Tabulka 1: Třída I bakteriocinů BMK a její podtřídy, včetně příkladů mikroorganismů, které je produkuje**  
(převzato a upraveno dle O'Connor a kol. 2005)

Podtřída	Příklad bakteriocinu	Producent
I	Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
II	Plantaricin C	<i>Lactobacillus plantarum</i>
III	Plantaricin plwa	<i>Lactobacillus plantarum</i>
IV	Plantaricin plwb	<i>Lactobacillus plantarum</i>
V	Cytolysin CyILL a CyILS	<i>Enterococcus faecalis</i>
VI	Laktocin S	<i>Lactobacillus sake</i>

Mezi nejvýznamnější lanthibiotika a rovněž mezi nejvýznamnější bakteriociny BMK, patří pediocin PA-1 a nisin (Nes a Tagg 1996). Nisin je produkován kmeny *Lactococcus lactis* a je dnes schválen jako potravinové aditivum ve více než 50 zemích světa (Lacroix 2011).

#### 2.3.4.1.2 Třída II: malé, teplotně stabilní bakteriociny

Třída II zahrnuje teplotně stabilní peptidy (menší než 10 kDa), které jsou rezistentní k teplotě nad 100°C nebo jsou autoklávovatelné. Nikdy neobsahují lanthionin a dále jsou děleny do tří podtříd (Todorov 2009, O'Shea a kol. 2012).

Nejvíce známé bakteriociny jsou řazeny do podtřídy IIA a jsou taktéž nazývané bakteriociny podobné pediocinu. Skládají se ze dvou domén: N-terminální doména, která zprostředkovává vazbu bakteriocinu na povrch cílové buňky; C-terminální doména, která penetruje do hydrofobní části membrány cílové buňky. Obě domény jsou spojeny tak, že je umožněn pohyb domén (Johnsen a kol. 2005). Bakteriociny podtřídy IIA navzdory vysoké strukturální podobnosti, vykazují značně se lišící antimikrobiální účinky. Ve srovnání s jinými bakteriociny mají velmi úzké spektrum aktivity a jsou účinné mimo jiné i proti *Listeria monocytogenes* (Dridler a kol. 2006).

Dvoupeptidové bakteriociny řazené do podtřídy IIB jsou většinou malé (5-10 kDa) a teplotně stabilní. Jedná se o membránově aktivní proteiny. Aktivita dvou-peptidového bakteriocinu často závisí na synergickém působení obou komplementárních peptidů, které samostatně buď nemají, nebo mají velmi nízkou aktivitu (gassericin K7A, gassericin K7B)(Majhenič a kol. 2004, Peternel a kol. 2010). Na druhou stranu některé dvou-peptidové bakteriociny mají aktivní buď jeden nebo druhý peptid samostatně (např. plantaricin S). Kombinace obou peptidů však působí synergicky a výsledný inhibiční účinek je větší než u každého peptidu zvlášť (Cintas a kol. 1998).

Strukturální geny obou komplementárních peptidů jsou umístěny často vedle sebe na stejném operonu, následovány imunitním genem tvořící genový klastr. Oba peptidy jsou syntetizovány jako inaktivní prepeptidy s krátkou N-terminální sekvencí (14-24 aminokyselin). Vedoucí sekvence typu dvou glycinů je odštěpena během sekrece peptidových molekul z buněk producenta. Dále je přítomen ABC (ATP-binding cassette) transportérový protein spolu s přidaným (připojeným) proteinem, které jsou vyžadovány pro transport a sekreci biologicky aktivního bakteriocinu (Peternel a kol. 2010).

Mezi nejznámější bakteriociny této podtřídy patří laktacin F a plantaricin NC8. Laktacin F, produkováný kmenem *Lactobacillus johnsonii* VP11088 (CCM 2935), má relativně úzké spektrum účinku a je baktericidní pouze proti blízkce příbuzným bakteriím. Plantaricin NC8 je produkováný kmenem *Lactobacillus plantarum* NC8. K jeho produkci dochází pouze tehdy, když je kmen

*Lactobacillus plantarum* NC8 současně kultivovaný s jinými gram pozitivními bakteriemi, jako jsou druhy rodu *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Listeria* (O'Connor a kol. 2005).

Poslední podtřída IIC obsahuje rozličnou řadu bakteriocinů, zahrnující všechny nelanthibiotika, které nepatří do podtřídy IIA a IIB. Do této skupiny patří např. acidocin B (O'Connor a kol. 2005).

#### 2.3.4.1.3 Třída III a Třída IV

Třída III bakteriocinů zahrnuje velké (>30 kDa) (Drider a kol. 2006), termolabilní bakteriociny. Příkladem může být helvecin J produkovaný kmenem *Lactobacillus helveticus* 481; helvecin V produkovaný kmenem *Lactobacillus helveticus* 1829 a laktacin B produkovaný kmenem *Lactobacillus acidophilus* N2 (O'Connor a kol. 2005).

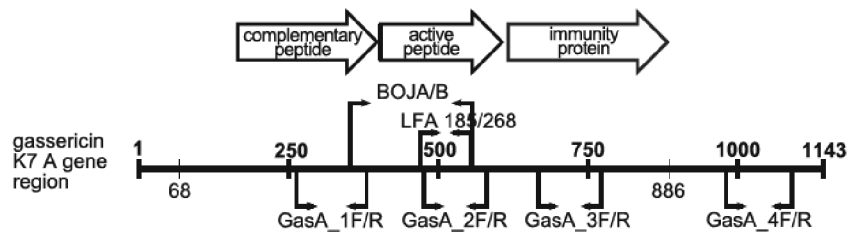
Třída IV zahrnuje tzv. cirkulární bakteriociny. Tyto peptidy jsou schopné cirkularizace a mechanismus jejich účinku je permeabilizace membrány citlivých bakterií, čímž následně dochází k ztrátě iontů. Mezi nejznámější a jako první popsany cirkulární bakteriocin patří enterocin AS-48 (van Belkum a kol. 2011).

#### 2.3.4.2 Geny pro produkci bakteriocinů

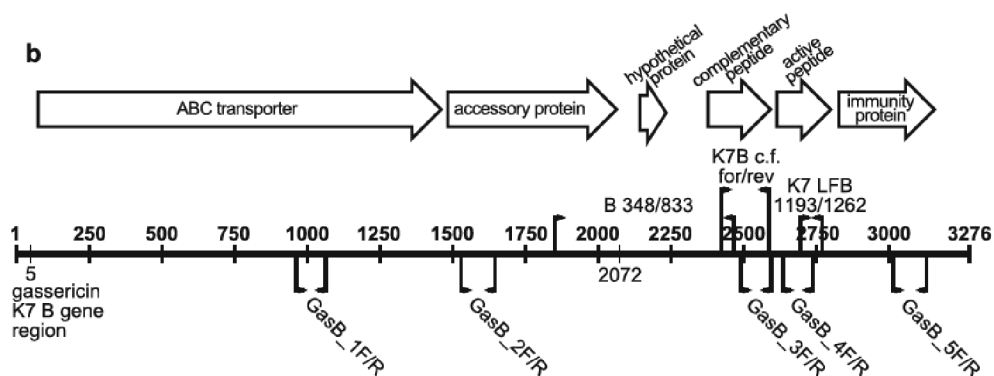
Geny pro produkci bakteriocinů u BMK jsou často lokalizovány na mobilních genetických elementech, jako jsou plazmidy či konjugativní transpozóny. Mohou být horizontálně přenášeny mezi bakteriálními kmeny (O'Shea a kol. 2012). V případě lokalizace genu pro produkci bakteriocinu na plazmidu bývá na plazmidu umístěn i imunitní protein (Sabia a kol. 2014). Některé geny pro produkci bakteriocinů však byly detegovány také na chromozomu. Tak je tomu například u gassericinů K7A a gassericinů K7B produkovaných kmenem *Lactobacillus gasseri* K7 (Majhenič a kol. 2004, Peternel a kol. 2010).

Bakteriociny gassericin K7A a gassericin K7B patří mezi jedny z prvních, dobře charakterizovaných bakteriocinů produkovaných probiotickým kmenem lidského původu - *L. gasseri* K7. Jejich sekvence je dostupná v GenBank (Peternel a kol. 2010). Jedná se o bakteriociny s širokým spektrem inhibičních účinků vůči gram-pozitivním bakteriím, včetně kmenů druhu *Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens* (Matijašić a Rogelj 2000). Oba bakteriociny jsou klasifikovány jako dvoupeptidové bakteriociny a podle klasifikace jsou řazeny do podtřídy IIB bakteriocinů (Peternel a kol. 2010). Podrobný popis genových klastrů obou bakteriocinů je uveden na Obr. 3 pro gassericin K7A a na Obr. 4 pro gassericin K7B.





**Obr. 3: Genový klaster pro produkci gassericinu K7A (1143bp)** Genový klaster se skládá ze tří otevřených čtecích rámců kódujících domnělý komplementární peptid, aktivní peptid a domnělý imunitní protein. Vše organizované v jednu transkripční jednotku (převzato a upraveno Treven a kol. 2013).



**Obr. 4: Genový klaster pro produkci gassericinu K7B (3276bp)** Je organizován v jednu transkripční jednotku a skládá se ze šesti otevřených čtecích rámců kódující domnělý ABC transportér, domnělý přídatný protein, hypotetický protein, domnělý komplementární protein, aktivní protein a domnělý imunitní protein (převzato a upraveno Treven a kol. 2013).

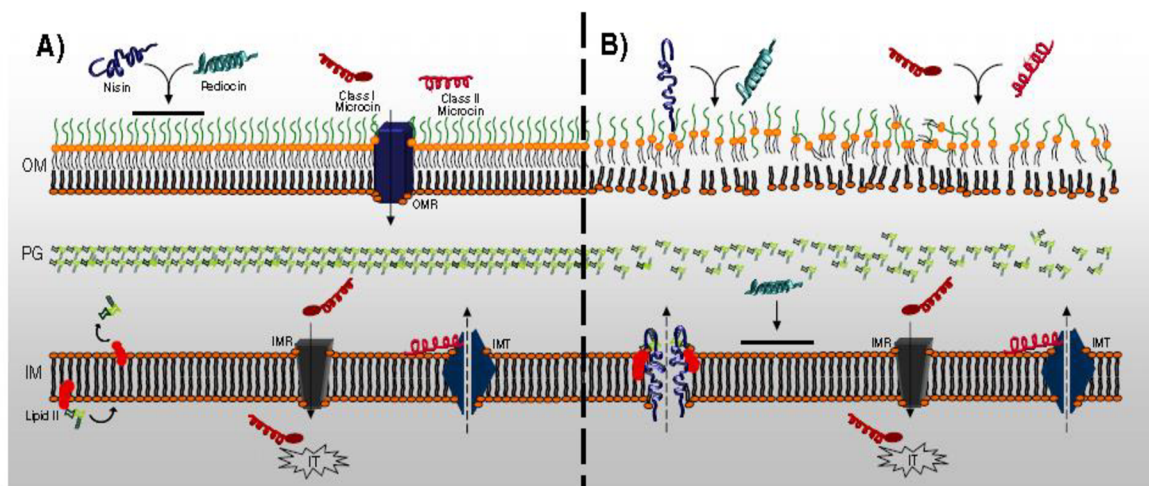
Gen pro imunitní protein kóduje protein chránící producenta bakteriocinu před jeho účinkem (Todorov 2009). Je známo mnoho variací tohoto genu včetně variací v expresi, velikosti (51-150 aminokyselin) a umístění v genomu BMK. Samotný mechanismus účinku imunitního proteinu je znám poměrně málo. Pravděpodobně interakce mezi imunitním proteinem a jeho receptorem na cytoplazmatické membráně chrání producenta vůči účinku bakteriocinu (Nes a Tagg 1996).

Bakteriociny, podobně jako další molekuly, které jsou syntetizovány v cytoplazmě a sekretovány z buňky, musí být přeneseny přes cytoplazmatickou membránu do vnějšího prostoru (Nes a Tagg 1996).

#### 2.3.4.3 Mechanismus účinku bakteriocinů produkovaných BMK

Všeobecně se udává, že bakteriociny BMK by měly být účinné především na blízce příbuzné druhy BMK (či další gram-pozitivní bakterie) a nejsou efektivní proti gram-negativním bakteriím vzhledem k přítomnosti vnější membrány (Pascual a kol. 2008). Bakteriociny gram-pozitivních bakterií nejsou schopné rozpoznávat specifický receptor (OMR) ve vnější membráně a tím nemají žádný efekt vůči gram-negativním bakteriím. Mnoho z nich působí na cytoplazmatickou membránu cílových bakteriálních buněk tím, že narušují proton-motivní sílu tvorbou pórů ve fosfolipidové dvojvrstvě. Byly však popsány i další mechanismy účinku, např. inhibice proteosyntézy a interference s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  transportem (Lacroix 2011). Pokud dojde k vystavení gram-negativní bakterie subletálním stresovým podmínkám, může se stát vnější membrána bakterií propustná pro bakteriociny BMK (Lacroix 2011). Je-li vnější membrána u gram-negativních bakterií narušena nějakým fyzikálním nebo chemickým zásahem, inhibují bakteriociny BMK i gram-negativní bakterie (Obr. 5)(Chalón a kol. 2012). Také byl prokázán synergický efekt bakteriocinu a EDTA, který byl účinný pouze vůči gram-pozitivním bakteriím. EDTA narušuje vnější membránu a umožňuje tak přístup bakteriocinu k cytoplazmatické membráně (Castro a kol. 2011).

Mnoho z lanthibiotik (viz 2.3.4.1.1) má společný způsob účinku - narušují v cílovém organismu přenos protonů vytvářením pórů v cytoplazmatické membráně (O'Shea a kol. 2012). Některé z těchto bakteriocinů užívají mechanismus, který nejprve vede k vazbě na prekurzor buněčné stěny - lipid II (O'Connor a kol. 2005).



**Obr. 5: Účinek narušení vnější membrány na schopnost interakce bakteriocinů s cytoplasmatickou membránou**  
(převzato a upraveno dle Chalón a kol. 2012).

A- bakteriociny a jejich účinek na intaktní buňku gram-negativních bakterií; B- na buňku s permeabilizovanou vnější membránou; nisin a pediocin – bakteriociny produkované gram-pozitivními bakteriemi; mikrocin – bakteriociny produkované gram-negativními bakteriemi; PG- peptidoglykan; OM – vnější membrána; OMR – vnější membránový receptor; IM- vnitřní membrána; IMR – vnitřní membránový receptor; IT- intracelulární cíl

#### 2.3.4.4 Využití bakteriocinů v potravinářském průmyslu

V potravinářském průmyslu se s výhodou používají kmeny, které byly izolovány ze stejné potravinové matrice, protože jsou už na podmínky dané potraviny adaptovány (Castro a kol. 2011). Při procesu výroby potravinových produktů lze využít tři způsoby přidání bakteriocinů jako přírodních konzervantů:

- inokulace potravinové matrice mikroorganismy definovanými jako ochranná kultura, která produkuje inhibiční antimikrobiální látky (Gálvez a kol. 2010),
- přidat mikrobiální metabolity, především bakteriociny v semipurifikované nebo purifikované formě (Gálvez a kol. 2010),
- pro výrobu daného potravinářského výrobku lze použít suroviny, které byly dříve fermentované bakteriální kulturou produkující bakteriocin (Castro a kol. 2011).

Nevýhodou použití semipurifikovaných nebo purifikovaných bakteriocinů je skutečnost, že se mohou vázat na některé složky potravy (tuk, proteinové částice). Nicméně jeden z neznámějších bakteriocinů – nisin (produkovaný *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) je používán jako přírodní konzervant ve formě bílkovinného preparátu (Gaggia a kol. 2011, Parisien a kol. 2007). Využití ochranné mikrobiální kultury je však výhodnější. Některé kmeny producentů bakteriocinů mohou mít probiotické vlastnosti, a tak mohou být prospěšné konzumentům

potravinářského výrobku ve více směrech. Neméně důležitý je fakt, že mikroorganismy mohou ovlivňovat strukturu, sensorické vlastnosti a nutriční hodnotu potravin (Gaggia a kol. 2011).

Využití bakteriocinů produkovaných BMK v potravinách je výhodné z několika následujících důvodů (Gálvez a kol. 2007):

- prodlužuje trvanlivost potraviny
- snižuje riziko přenosu potravinových patogenů
- snižuje ekonomické ztráty vzniklé kažením potravin
- redukuje aplikaci chemických konzervantů
- snižuje nutnost teplotního ošetření potraviny teplotou a tím ztrátu některých vitaminů a změnu organoleptických vlastností potravin
- jsou to látky všeobecně považované za bezpečné
- nejsou toxické pro eukaryotní buňky
- jsou inaktivovány proteázami v GIT
- jejich účinek je cílen na cytoplazmatickou membránu bakterií
- mohou být kódovány plazmidy, což umožňuje genetickou manipulaci

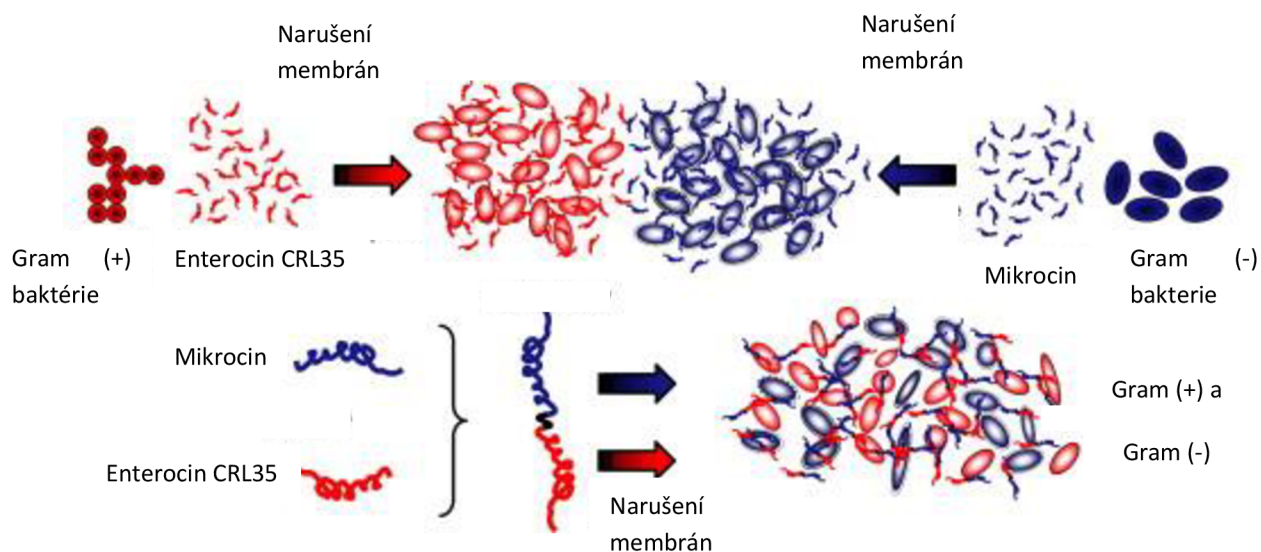
U mnoha bakteriocinů byl detegován synergický efekt s dalšími antimikrobiálními látkami využívanými v potravinářském průmyslu (např. přírodní fenolové sloučeniny a další antimikrobiální proteiny). Jako užitečné se jeví simultánní podání dvou a více bakteriocinů, protože lze použít bakteriociny v nižších dávkách. Také se vyhneme přerůstání bakteriocin-rezistentních buněk nebo buněk adaptovaných (Gálvez a kol. 2007). Kombinace použití bakteriocinů a fyzikálního ošetření potraviny (vysoký tlak nebo pulzní elektrické pole) zvyšuje ochranu potraviny proti patogenním bakteriím, především proti bakteriálním endosporám (Arqués a kol. 2011, Gálvez a kol. 2007).

I když většina studií se týká aplikací antimikrobiálních peptidů jako konzervačních látek v potravinách, některé práce poukazují na potenciálně významnou roli bakteriocinů v bakteriální kompetici při kontrole komplexních ekosystémů, jakými je například lidský GIT (Kleerebezem a kol. 2010, Parisien a kol. 2007).

#### 2.3.4.5 Hybridní bakteriociny

Bakteriociny produkované BMK mají většinou velmi úzké spektrum aktivity a jsou aktivní hlavně vůči gram-pozitivním bakteriím (mimo BMK jsou to především kmeny *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile*), což je limituje pro aplikaci v klinické mikrobiologii a veterinární mikrobiologii (Pinto a kol. 2009, Charlier a kol. 2009). Pro jejich účinné využití by bylo vhodné, aby spektrum aktivity bylo rozšířeno i na gram-negativní patogenní mikroorganismy (Chalón a kol. 2012). Mezi nejznámější gram-negativní patogeny potravinového řetězce, jejichž rezervoárem jsou hospodářská zvířata, patří kmeny druhu *Campylobacter jejuni* (kuřecí maso, čerstvé mléko) nebo toxigenní kmen *Escherichia coli* O157:H7 (hovězí maso). Především kmeny druhu *Campylobacter jejuni* jsou dnes považovány za nejběžnějšího původce bakteriálních průjmů (EFSA 2010, Zhao a kol. 1998). Stresové prostředí na farmách, změny ve výživě jednotlivých hospodářských zvířat nebo terapie antibiotiky mohou silně ovlivňovat složení gastrointestinální mikrobioty a tím zvyšovat náchylnost k infekcím (Oliver a kol. 2009). Také v klinické mikrobiologii je mnoho gram-negativních patogenních kmenů, např. kmeny druhu *Salmonella* Enteritidis a *Salmonella* Typhimurium (Chalón a kol. 2012) a kmeny druhu *Escherichia coli* způsobující onemocnění od gastroenteritid až po selhání ledvin a krvácivé průjmy (Acuña a kol. 2012).

Rozšíření spektra účinnosti bakteriocinů by umožnilo zkonstruování hybridního bakteriocinu kombinací genů již zmíněných bakteriocinů BMK (aktivní především proti gram-pozitivním bakteriím) a mikrocinu (produkovaného kmeny *E. coli* a aktivní vůči gram-negativním bakteriím) (Obr. 6). Omezila by se tak možnost dalšího rozšíření genů rezistence na antibiotika (Gaggia a kol. 2011). Například hybridní bakteriocin Ent35-MccV vykazoval inhibiční účinek proti enterohemoragické *Escherichia coli* a dalším patogenním kmenům gram-negativních bakterií. Potenciál hybridních bakteriocinů však musí být nejdříve prostudován, jejich použití šířeji posouzeno a poté by v budoucnu mohl být využit v mnoha odvětvích, včetně potravinářství (Acuña a kol. 2012).



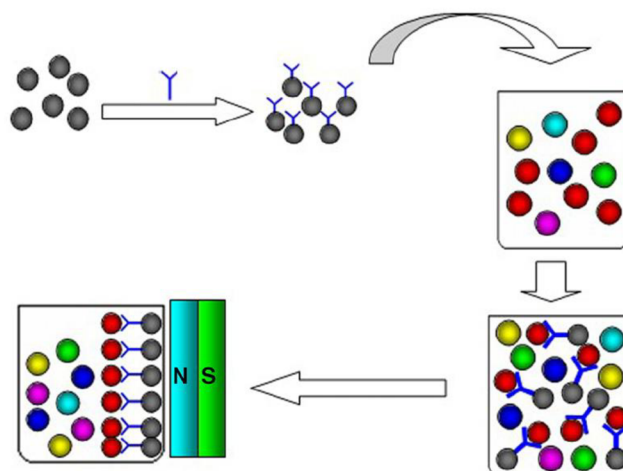
**Obr. 6: Schéma účinku hybridního bakteriocinu (převzato a upraveno dle Acuña a kol. 2012)**

## 2.4 Imunomagnetická separace

Magnetické částice jsou v biologických vědách (molekulární diagnostika, biochemie, lékařství apod.) využívány v následujících aplikacích (Liu a kol. 2004, Šafařík a Šafaříková 1999):

- jako nosiče enzymů pro katalytické účely ve vsádkových systémech nebo jako mikroreaktory
- při izolaci a purifikaci cílových molekul (proteinů, nukleových kyselin apod.) a buněk
- v senzorech a biosenzorech

Jednou z výše uvedených aplikací je izolace cílových buněk s využitím interakce buňka – protilátka. Protilátky jsou specifické biologické rozpoznávací reagens a z tohoto důvodu jsou používány v mnoha analytických metodách (např. ELISA – enzyme-linked immunosorbent assays, imunosenzory aj.) (Pappert a kol. 2010). Magnetický nosič je funkcionalizován protilátkou – s výhodou pomocí vazby streptavidin – biotin (konstanta asociace,  $K_a \approx 10^{-15}$ ). Silná a specifická vazba mezi biotinem a streptavidinem, je využívána v mnoha oblastech biotechnologie (Waner a Mascotti 2008, González a kol. 1997, Rittich a kol. 2009). Na specifickou protilátku se naváže jen určitý typ buněk. Ze směsi je pak komplex odseparován pomocí magnetu (Chen a kol. 2006) (Obr. 7).



**Obr. 7: Schéma imunomagnetické separace bakteriálních buněk ze směsi pomocí specifické protilátky (převzato a upraveno Chen a kol. 2006)**

S pomocí imunomagnetické separace (IMS) mohou být separovány cílové buňky přímo ze směsi buněk. Uvedeného postupu lze s výhodou použít při identifikaci mikroorganismů pomocí molekulárně biologických metod založených na amplifikaci DNA. V některých případech buňky, ze kterých je izolovaná DNA, mohou být přítomny v matrici ve velmi nízké koncentraci. V tomto případě může být IMS použita k jejich nabohacení místo kultivace, která navíc neumožňuje kvantifikaci buněk ve výchozí matrici. Magnetické částice s navázaným komplexem protilátka-buňka mohou být přímo použity v PCR (IMS-PCR) (Rittich a kol. 2009). DNA je uvolněna z buněk během prvního kroku PCR – denaturace dsDNA. Imunomagnetické částice jsou komerčně dostupné a při vhodně zvolené protilátce lze nabohatit některé patogenní bakterie (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. a *Staphylococcus aureus*) nebo protozoa (*Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*) (Ma a kol. 2014, Xiong a kol. 2014). Aplikace IMS pro izolaci bakterií mléčného kvašení jsou vzácné.



### 3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo studium bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* produkujících antimikrobiální látky a charakterizace jejich probiotických vlastností. V rámci dizertační práce byla řešena následující problematika:

- 1) Identifikace kmenů izolovaných ze stolice plně kojených dětí, siláže a mléčných výrobků deponovaných ve Sběrce mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM; Tábor, ČR) pomocí molekulárně biologických metod (rodově a druhově specifických PCR, včetně multiplexní PCR, rep-PCR a RAPD-PCR) a sekvenování genu pro 16S rRNA.
- 2) Kmeny identifikované do druhů byly testovány na produkci antimikrobiálních látek proti souboru indikátorových kmenů pomocí agarového kapkového testu a agarového difuzního testu.
- 3) U vybraných kmenů byly charakterizovány produkované antimikrobiální látky. Bylo zjišťováno, zda jde o bílkovinné antimikrobiální substance nebo antimikrobiální látky jiného původu (organické kyseliny, peroxid vodíku). Byl sledován vliv teploty, pH a přítomnosti EDTA a detergentů na inhibiční vlastnosti antimikrobiálních bílkovinných látek u vybraných kmenů.
- 4) Pomocí PCR a DNA/DNA hybridizace byl proveden skrínig DNA kmenů na přítomnost genů pro produkci bakteriocinů a genů kódujících probiotické a další vlastnosti. Vybrané produkty PCR byly sekvenovány a porovnány se sekvencemi v databázi GeneBank.
- 5) Vybrané kmeny byly testovány na další probiotické vlastnosti - schopnost přežití při průchodu GIT (rezistence k nízkému pH, rezistence k žlučovým solím), kompetice o vazebná místa na střevním epitelu (Caco-2 buňky) a rezistence na antibiotika.
- 6) Byla provedena imunomagnetická separace buněk *Lactobacillus rhamnosus* pomocí magnetických nosičů funkcionalizovaných streptavidinem a biotinylovanou protilátkou anti-*Lactobacillus*.



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální kmeny

##### 4.1.1.1 Sbírkové a typové kmeny

Sbírkové a typové kmeny rodu *Lactobacillus* použité v disertační práci jsou uvedeny v Tabulce 2.

**Tabulka 2: Sbírkové a typové kmeny**

Kmen	Označení kmene	Kmen	Označení kmene
<i>L. rhamnosus</i>	CCM 1825 <sup>T</sup>	<i>L. sakei</i>	IM 398
<i>L. rhamnosus</i>	CCM 7091	<i>Escherichia coli</i>	IM 429
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	CCM 1735 <sup>T</sup>	<i>Escherichia coli</i>	IM 430
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	CCM 7092 <sup>T</sup>	<i>Enterococcus faecalis</i>	IM 435
<i>L. fermentum</i>	CCM 7192 <sup>T</sup>	<i>Enterococcus faecalis</i>	IM 436
<i>L. zeae</i>	CCM 7069 <sup>T</sup>	<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium	IM 318
<i>L. casei</i>	CCM 4791	<i>Staphylococcus aureus</i>	IM 353
<i>L. casei</i>	CCM 4798	<i>L. gasseri</i>	K7
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	CCM 7088 <sup>T</sup>	<i>Escherichia coli</i>	O157:H7 tox-*
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	CCM 7089	<i>L. helveticus</i>	CCDM 81
<i>L. salivarius</i>	CCM 7274	<i>L. helveticus</i>	CCDM 82
<i>L. plantarum</i>	CCM 7039 <sup>T</sup>	<i>L. helveticus</i>	CCDM 92
<i>L. gasseri</i>	CCM 7009 <sup>T</sup>	<i>L. helveticus</i>	CCDM 98
<i>L. johnsonii</i>	CCM 2935	<i>L. helveticus</i>	CCDM 102
<i>L. johnsonii</i>	CCM 4384 <sup>T</sup>	<i>L. acidophilus</i>	CCDM 109
<i>L. acidophilus</i>	CCM 4833	<i>L. acidophilus</i>	CCDM 149
<i>L. sakei</i>	10/1 **	<i>L. gasseri</i>	CCDM 214
<i>L. salivarius</i>	IM 124	<i>L. gasseri</i>	CCDM 215
<i>L. fermentum</i>	IM 351	<i>L. gasseri</i>	CCDM 332
<i>L. gasseri</i>	IM 340	<i>L. gasseri</i>	CCDM 335
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	IM 348	<i>L. gasseri</i>	CCDM 340
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	IM 349	<i>L. gasseri</i>	CCDM 377

CCM Česká sbírka mikroorganismů (Brno, ČR); CCDM Sbírká mlékařských mikroorganismů (Tábor, ČR); IM Sbírká Institute of Dairy Science and Probiotics (University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Slovenia); \* kmen poskytnutý laboratoří Bacteriological Diagnostics of Intestinal Infections, University of Ljubljana, Slovenia; \*\* kmen poskytnutý prof. I. Rogelj (Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia)

#### 4.1.1.2 Analyzované kmeny

V experimentech byly použity bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus* izolované z různých zdrojů. Soubor kmenů je uveden v Tabulce 3.

**Tabulka 3A: Analyzované bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus***

Kmen	Původ	Izolát poskytl	Izolát přečistil
<i>Lactobacillus</i> sp. RL1-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL2-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL3-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL4-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL4-bile7-5A			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL4-bile7-5B			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL5-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL6-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL7-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL8-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL9-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL10-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL10-bile7-5A			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL10-bile7-5B			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL11-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL12-PA			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL12-PB			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL13-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL13-57L3-7AP	Stolice plně kojených a zdravých dětí	Prof. Ing. V. Rada, CSc.	Ing. V. Dráb
<i>Lactobacillus</i> sp. RL13-57L3-8AP			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL14-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL15-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL16-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL17-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL18-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL19-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL20-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL21-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL22-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL23-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL24-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL25-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL26-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL27-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL27-VGA-7A2			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL28-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL29-P			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL30-P			

**Tabulka 3B: Analyzované bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus***

Kmen	Původ	Izolát poskytl	Izolát přečistil
<i>Lactobacillus</i> sp. RL1			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL2			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL3			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL4			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL5			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL6			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL7			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL8			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL9			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL10	Stolice plně kojených a zdravých dětí	Prof. Ing. V. Rada, CSc.	doc. RNDr. A. Španová, CSc.
<i>Lactobacillus</i> sp. RL11			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL12			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL13			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL14			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL15			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL16			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL17			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL18			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL19			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL20			
<i>Lactobacillus</i> sp. RL22			
<i>Lactobacillus</i> sp. CCDM 83/00			*
<i>Lactobacillus</i> sp. CCDM 148/00	Mléčné výrobky	Sbírka mlékařských mikroorganismů (CCDM), Tábor, ČR	*
<i>Lactobacillus</i> sp. CCDM 154/02	Siláž		*
<i>Lactobacillus</i> sp. CCDM 158/00			*
<i>Lactobacillus</i> sp. CCDM 821/00	Mléčné výrobky		*
<i>Lactobacillus</i> sp. CCDM 963/00			*
<i>Lactobacillus</i> sp. LOCK 0900	Stolice plně kojených a zdravých dětí		Technical University of Lodz, Polsko
<i>Lactobacillus</i> sp. LOCK 0908			
<i>Lactobacillus</i> sp. LOCK 0919			

\*přečištěno v rámci disertační práce; CCDM Sbírka mlékařských mikroorganismů (Tábor, ČR); LOCK Centre of Industrial Microorganisms Collection (Lodz, Polsko)

#### 4.1.2 Magnetické nosiče a protilátky použité pro imunomagnetickou separaci

Magnetické nosiče byly využity pro přečištění produktů PCR, z nichž byly připraveny sondy pro následnou DNA/DNA hybridizaci a pro imunomagnetickou separaci buněk. K přečištění DNA byly použity magnetické částice Fkol 135ox – P(HEMA-co-GMA) (připravené Ing. D. Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze) o průměru 1 µm, s obsahem železa v magnetickém jádře 6,6%, pokryté karboxylovými funkčními skupinami (2,61 mM/g). Pro imunomagnetickou separaci buněk byly použity komerčně dodávané částice MPG®streptavidin (PureBiotech, Middlesex, USA) s průměrem 5 µm, dodávané v koncentraci 10 mg/ml; 4-6 x 10<sup>7</sup> částic/ml).

Pro funkcionalizaci magnetických nosičů s navázaným streptavidinem byly použity biotinylované polyklonální králičí protilátky anti-*Lactobacillus* (purifikované IgG frakce) připravené firmou Apronex (Vestec, ČR). Pro imunizaci králíků byla použita směs 8 kmenů rodu *Lactobacillus*: *L. plantarum* NCIMB 8826, *L. rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 (Lakcid L, Biomed, Lublin, Polsko), *L. paracasei* CCDM 211 (CCDM, Tábor, ČR), *Lactobacillus* sp. LOCK 900, LOCK 908, LOCK 919 (Technical University of Lodz, Polsko).

#### **4.1.3 Přístroje a pomůcky**

Anaerostat OXOID (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie), centrifuga EBA 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo), centrifuga mini Spin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo), digitální fotoaparát Olympus FE-4050 (Olympus, Malajsie), hybridizační inkubátor Micro Hybridization Incubator 2000 (Sci Gene, Sunnyvale, USA), magnetický separátor DynaMag-2 (Life Technologies, Oslo, Norsko), mikropipety Discovery Comfort HTL celá sada (PZ HTL, Varšava, Polsko), mikropipeta Biohit Proline 1-5 ml (Proline, Helsinky, Finsko), UV/Vis NanoPhotometer (Implen, Mnichov, Německo), pH metr MPH 372 (Monokrystaly, Turnov, Česká republika), termocykler DNA engine, Peltier thermal Cykler-200 (Bio-Rad Lab., Philadelphia, USA), thermocykler PTC-100 (MJ Research, Watertown, USA), termostat – Mini Incubator (Labnet International, Woodbridge, USA), termostat FTC 901 (Vel Scientifica, Miláno, Itálie), transiluminátor TVR-312A (Spectroline, Albany, USA), vývěva KNF Neuberger Mini Laboport Diaphragm Pump (KNF Neuberger, New Jersey, USA), zařízení pro elektroforézu Easy-cast, B1 (Owl Scientific, Rochester, USA), zařízení pro elektroforézu Mini gel unit (Hoefler, Holliston, USA), zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300V (Labnet International, Woodbridge, USA), pH metr (Orion 3 Star laboratorní, Thermoscientific), běžné laboratorní sklo, plastový materiál, pomůcky a další běžné laboratorní vybavení.

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Kultivace bakterií**

Lyofilizáty bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus* byly sterilně otevřeny a naočkovány do 10 ml tekutého MRS media (de Mann, Rogosa, Sharpe) (Oxoid, Hampshire, Velká Británie); pH 6,5; sterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut. Kultivace probíhala při 37°C po dobu 48 hodin aerobně nebo anaerobně. Kmeny narostlé v tekutém MRS mediu byly přeočkovány (1 % inokulum) a kultivovány při 37°C po dobu 48 hodin. Pro ověření čistoty bakteriální kultury byl proveden křížový roztěr na Petriho misce s MRS agarem (Oxoid, Hampshire, Velká Británie); sterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut. Po kultivaci na Petriho misce byl zkontrolován vzhled kolonií. Pro další práci byly kmeny uchovány v 50 % glycerolu při -70°C.

Mimo indikátorových kmenů rodu *Lactobacillus* (kultivace v MRS mediu po dobu 48 hodin při 37°C nebo 30°C - kmeny *L. sakei*) byly jako indikátorové kmeny pro testy antimikrobiální aktivity použity bakteriální kmeny rodu *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella* a *Escherichia* (viz Tabulka 2). Tyto kmeny byly kultivovány aerobně v BHI mediu (Brain-heart infusion) (Merck, Darmstadt, Německo) při 37°C po dobu 18 hodin. Kmen *Escherichia coli* O157:H7 použitý pro kompetitivní test na Caco-2 buňkách byl kultivován aerobně na VRB mediu (Violet Red Bile medium) (Merck, Darmstadt, Německo) při 37°C po dobu 18 hodin.

#### **4.2.2 Izolace bakteriální DNA**

Bakteriální buňky narostlé v tekutém mediu byly centrifugovány při 14000 g/3 minuty. Supernatant byl slit a sediment resuspendován v 1 ml roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Suspenze byla dobře promíchána a centrifugována při 14000 g/3 minuty. K sedimentu bylo přidáno 500 µl roztoku B (lysozym 3 mg/ml; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Inkubace byla provedena při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. K suspenzi bylo připipetováno 12,5 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml). Inkubace proběhla při 55°C do druhého dne. Tyto hrubé lyzáty buněk byly použity pro izolaci DNA.

K lyzátům byl přidán stejný objem fenolu (pH 7,8) a směs byla kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minut. Po centrifugaci při 14000 g/3 minuty byla horní vodná fáze s DNA odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky. K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 µl CIZ (chloroform – isoamylalkohol v poměru 24:1). Směs byla promíchávána 4 minuty a centrifugována při 14 000 g/3 minuty. Vodní fáze byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky.

Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného (pH 5,2) a 2,5 násobek 96% ethanolu. Směs byla promíchána a DNA srážena při -20°C po dobu 30 minut. Poté byla směs centrifugována při 14 000 g/15 minut. Supernatant byl opatrně slit a pelet s DNA byl usušen v exikátoru. DNA byla následně rozpuštěna v 200 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0) a uchována při 5°C (Sambrook a Russel 2001).

#### **4.2.3 Stanovení koncentrace DNA**

Koncentrace a čistota bakteriální DNA, která byla izolována fenolovou extrakcí, byla stanovena pomocí NanoPhotometru. Byly odečteny hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230 nm (absorpční maximum fenolu), 260 nm (absorpční maximum nukleových kyselin), 280 nm (absorpční maximum proteinů) a 320 nm (korekce pozadí). Dále byla stanovena čistota DNA (poměr absorbancí 260 nm/280 nm) (Španová a Rittich 2010).

#### **4.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

##### **4.2.4.1 Konvenční PCR**

Konvenční PCR byla využita pro zařazení analyzovaných bakteriálních kmenů do domény, rodu a druhů. DNA o koncentraci 10 ng/μl byla amplifikována pomocí specifických primerů pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druhy *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus zae*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus fermentum*. Sekvence primerů a velikosti specifických produktů PCR jsou uvedeny v Tabulce 4, složení směsí pro PCR v Tabulce 5 a amplifikační programy v Tabulce 6. Specifické produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

**Tabulka 4: Specifity reakcí, názvy a sekvence primerů, velikosti produktů PCR a reference primerů použitých při identifikaci kmenů**

PCR specifická pro	Primer	Sekvence (5'-3')	Produkt PCR (bp)	Reference
Doména <i>Bacteria</i>	Feub	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	466	Haarman a Knol 2006
	Reub	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		
Rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMA 1rev	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	asi 250	Dubernet a kol. 2002
	R16-1	CTTGACACACCCGCCGCTCA		
<i>L. casei/paracasei</i>	Pr I	CAGACTGAAAGTCTGACGG	400,200*	Walter a kol. 2000
	Cas II	GCGATGCGAATTTCTTTTTC		
<i>L. paracasei</i>	Y2	CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	290	Ward a Timmins 1999
	paracasei	CACCGAGATTCACATGG		
<i>L. salivarius</i>	LactoR	GTCCATTGTGGAAGATTCCC	332	Buyn a kol. 2004
	LsaliF	CGAAACTTTCTTACACCGAAT		
<i>L. rhamnosus</i>	Pr I	CAGACTGAAAGTCTGACGG	400,200*	
	Rha II	GCGATGCGAATTTCTATTATT		
<i>L. fermentum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	600, 490, 290*	
	Ferm II	CTGATCGTAGATCAGTCAAG		
<i>L. gasseri</i>	Gas I	GAGTGCGAGAGCACTAAAG	400, 200*	
	Gas II	CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT		
<i>L. plantarum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	500, 300*	Walter a kol. 2000
	Plan II	TTACCTAACGGTAAATGCGA		
<i>L. acidophilus</i>	Aci 16SI	AGCTGAACCAACAGATTCAC	750*	
	16SII	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
<i>L. johnsonii</i>	Joh 16SI	GAGCTTGCTAGATGATTTTA	750*	
	16SII	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
<i>L. zeae</i>	ZaeI	TGTTTAGTTTTGAGGGGACG	350, 190*	
	ZaeII	ATGCGATGCGAATTTCTAAATT		
Multiplexní PCR	PAR	GAC GGT TAA GAT TGG TGA C	540, 200 <sup>a</sup> 540, 350 <sup>b</sup> 540 <sup>c</sup>	Sisto a kol. 2009
	CAS	ACT GAA GGC GAC AAG GA		
	RHA	GAG TCA GGT TGG TGT TG		
	CPR	CAA NTG GAT NGA ACC TGG CTT T		
<i>pheS</i>	LjpheSFW	AAC TTA CTT AGA ACG CAA AC	394	Grillová 2012
	LjpheSRW	CTA AAA CAT TTG GGT GAA CC		
Rep-PCR	(GTG) <sub>5</sub>	GTG GTG GTG GTG GTG	**	Gevers a kol. 2001
RAPD-PCR	M13	GAG GGT GGC GGT TCT	**	Rossetti a Giraffa 2005

\*velikosti produktů PCR byly vypočteny pomocí standardů a s využitím programu BioNumerics; <sup>a</sup>*L. paracasei*; <sup>b</sup>*L. casei*; <sup>c</sup>*L. rhamnosus*; \*\* výsledkem jsou fingerprintové profily kmenů

**Tabulka 5: Složení směsi pro PCR pro doménu Bacteria, rod Lactobacillus a druhově specifické PCR**

Komponenta	Primery/( $\mu$ l)											
	Feub Reub	LbLMA -1rev R16-1	PrI CasII	Y2 paracasei	LactoR LsaliF	Zeaee I ZeaeII	PrI Rhall	Lfpr PlanII	Lfpr FermII	JohSI 16SII	Aci16SI 16SII	GasI GasII
voda pro PCR	17,5	19,0	15,5	14,5	18,5	15,5	15,5	15,5	14,5	18,0	19,0	15,0
10x reakční pufr	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP směs (10 mM)	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	-	-	2,0	3,0	-	2,0	2,0	2,0	3,0	1,0	-	2,5
primery (10 pmol/ $\mu$ l)	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
Taq DNA polymeráza (1U/ $\mu$ l)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
matrice DNA (10 ng/ $\mu$ l)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

**Tabulka 6: Amplifikační programy pro doménu Bacteria, rod Lactobacillus a druhově specifické PCR**

Doména Bacteria rod Lactobacillus	<i>L. casei/paracasei</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. plantarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. fermentum</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. zeae</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. acidophilus</i>
95°C/5min	95°C/5min	95°C/5min	95°C/5min
95°C/30s	95°C/30s	95°C/30s	95°C/30s
55°C/30s	55°C/30s	57°C/30s	58°C/30s
72°C/30s	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/1 min
30x krok 2-5	30x krok 2-5	30x krok 2-5	30x krok 2-5
72°C/5min	72°C/5min	72°C/5min	72°C/5min

#### 4.2.4.2 Multiplexní PCR

Multiplexní PCR byla použita pro odlišení blízkce příbuzných druhů *L. casei*, *L. paracasei* a *L. rhamnosus*. Pro amplifikaci DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l byly použity 4 primery PAR, CAS, RHA a CPR (Sisto a kol. 2009). Primery a velikosti specifických produktů PCR jsou uvedeny v Tabulce 4, složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 7 a amplifikační program je uveden v Tabulce 8. Specifické produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

#### 4.2.4.3 Amplifikace genu pro fenylalanin-tRNA syntetázu

Amplifikace genu pro fenylalanin-tRNA syntetázu (*pheS*), která byla navržena pro odlišení druhů *L. johnsonii* a *L. gasseri*, byla provedena pomocí primerů LjpheSFW a LjpheSRW (Grillová 2012). Primery a velikost specifického produktu PCR jsou uvedeny v Tabulce 4; složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 7 a amplifikační program je uveden v Tabulce 8. Specifické produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.



#### 4.2.4.4 Interrepetitivní PCR a náhodně amplifikovaná polymorfni DNA

Pro stanovení příbuznosti mezi analyzovanými kmeny byla využita interrepetitivní PCR (rep-PCR). DNA o koncentraci 10 ng/μl byla amplifikována pomocí primeru (GTG)<sub>5</sub> (Tabulka 4) (Gevers a kol. 2001). Složení PCR směsi je uvedeno v Tabulce 7 a amplifikační program je uveden v Tabulce 8.

Dále byla pro stanovení příbuznosti mezi kmeny použita náhodně amplifikovaná polymorfni DNA (RAPD-PCR). DNA o koncentraci 10 ng/μl byla amplifikována pomocí primeru M13 (Tabulka 4) (Rossetti a Giraffa 2005). Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 7 a amplifikační program je uveden v Tabulce 8. Produkty PCR byly detegovány pomocí agaróзовé gelové elektroforézy. Vyhodnocení příbuznosti kmenů z výsledných fingerprintů a sestavení příbuzenských dendrogramů bylo provedeno pomocí programu BioNumerics 6.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgie).

**Tabulka 7: Složení směsi pro multiplexní PCR, PCR pro *pheS*, rep-PCR a RAPD-PCR (μl)**

Komponenta	Multiplexní PCR	PCR pro <i>pheS</i>	Rep-PCR	RAPD-PCR
voda pro PCR	19,4	19,0	7,5	7,5
10x reakční pufr bez MgCl <sub>2</sub>	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP směs (10 mM)	0,5	0,5	1,0	1,0
DMSO	-	-	0,5	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	-	-	5,0	5,0
primer (10 pmol/μl)	0,2 (PAR, CAS, RHA); 0,5 (CPR)	0,5	2,0	2,0
<i>Taq</i> DNA polymeráza (1 U/μl)	0,5	1,0	1,5	1,5
matrice DNA (10 ng/μl)	1,0	1,0	5,0	5,0

**Tabulka 8: Amplifikační programy pro multiplexní PCR, PCR pro *pheS*, rep-PCR a RAPD-PCR**

Multiplexní PCR	PCR pro <i>pheS</i>	Rep-PCR	RAPD-PCR
95°C/5min	95°C/5min	95°C/5min	95°C/5min
95°C/30s	95°C/1min	95°C/1min	95°C/1min
54°C/30s	54°C/1min	49,8°C/1min	45°C/1min
72°C/1min	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/1 min
30x krok 2-5	30x krok 2-5	35x krok 2-5	40x krok 2-5
72°C/5min	72°C/5min	72°C/10min	72°C/10min

#### 4.2.4.5 Detekce genů pro probiotické a další vlastnosti pomocí PCR

DNA analyzovaného souboru kmenů o koncentraci 10 ng/μl byla testována na přítomnost genů kódujících probiotické a další vlastnosti. Jednalo se o následující geny: gen pro linoleát izomerázu, histidin dekarboxylázu a tyrosin dekarboxylázu. Primery použité pro amplifikaci DNA jsou uvedeny v Tabulce 9, složení směsí pro PCR je uvedeno v Tabulce 10 a amplifikační programy v Tabulce 11. Specifické produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

**Tabulka 9: Názvy a sekvence primerů, velikost specifického produktu PCR a reference primerů pro detekci genů kódujících probiotické a další vlastnosti**

PCR specifická pro	Primer	Sekvence (5'-3')	Produkt PCR (bp)	Reference
linoleát izomeráza	LaliF4	AGGCGTGGACAAGAAATCTG	1378	Macouzet a kol. 2010
	LaLiR4	ATCACGACGAGGCATGAAG		
histidin dekarboxyláza	HD3	GATGGTATTGTTTCKTATGA	440	Coton a Coton 2005
	HD4	CAAACACCAGCATCTTC		
tyrosin dekarboxyláza	TD2	ACATAGTCAACCATRTTGAA	1100	
	TD5	CAAATGGAAGAAGAAGTAGG		

**Tabulka 10: Složení PCR směsí pro detekci genů pro probiotické a další vlastnosti**

Komponenta	Primery/(μl)		
	LaliF4 LaLiR4	HD3 HD4	TD2 TD5
voda pro PCR	15,5	19	19,5
10x reakční pufr	2,5	2,5	2,5
dNTP směs (10 mM)	1,0	0,5	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0	-	-
primer (10 pmol/μl)	1,0*	0,5	0,5
Taq DNA polymeráza (1 U/μl)	1,0	1,0	0,5
matrice DNA (10 ng/μl)	2,0	1,0	1,0

\*koncentrace primerů 15 pmol/μl

**Tabulka 11: Amplifikační programy pro detekci genů pro probiotické a další vlastnosti**

Linoleát izomeráza	Histidin dekarboxyláza	Tyrosin dekarboxyláza
95°C/5min	95°C/5min	95°C/5min
95°C/1min	95°C/45s	95°C/45s
65°C/45s	52°C/30s	52°C/30s
72°C/3min	72°C/75s	72°C/75s
30x krok 2-5	30x krok 2-5	30x krok 2-5
72°C/7min	72°C/5min	72°C/5min

#### 4.2.4.6 Detekce genů pro produkci bakteriocinů pomocí PCR

DNA analyzovaného souboru kmenů o koncentraci 10 ng/μl byla dále testována na přítomnost genu pro laktacin F, gassericin K7A, gassericin K7B, gassericin A, gassericin T, acidocin A a acidocin B. Primery použité pro amplifikaci DNA jsou uvedeny v Tabulce 12, složení směsí pro PCR je uvedeno v Tabulce 13 a amplifikační programy jsou uvedeny v Tabulce 14. Specifické produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforózy.

**Tabulka 12: Názvy a sekvence primerů, velikosti produktů PCR a reference primerů pro detekci bakteriocinů**

PCR specifická pro	Primer	Sekvence (5'-3')	Produkt PCR (bp)	Reference
laktacin F	laF 828	ACC TGC ATG TGC TGT A	70	Muriana a Klaenhammer 1991
	laF 897	ACC TGT TGC AGC TGT A		
gassericin K7A	LFA 185	GTT GCA GGA TCA TGT G	84	Majhenič a kol. 2003
	LFA 268	TGT TGC AGC TCC GTT A		
gassericin K7B	K7B c.f. F	TGG GAG AAA TAA TTG GGC TG	165	Majhenič a kol. 2003
	K7B c.f. R	TTT CCG AAT CCA CCA GTA GC		
gassericin A	gaA 515	GAC CAC AGC GAA CAT T	102	Kawai a kol. 2000
	gaA 616	AAT GAG GCA CCA GAA G		
gassericin T	gaT 950	GGA GTA GGT GGA GCG ACA GT	126	Kawai a kol. 2000
	gaT 1075	TCC ACC AGT AGC TGC CGT TA		
acidocin A	acA 231	TGG TGT GCA TTG TAC T	96	Kanatani a kol. 1995
	acA 326	TTG ATC GGC AAC GAT T		
acidocin B	acB 1308	AGA TGC AGT GGC TTG T	73	van der Vossen a kol. 1994
	acB 1380	CCA TGC AGG TAA TGT C		

**Tabulka 13: Složení PCR směsí pro detekci genů pro produkci bakteriocinů**

Komponenta	Primery/( $\mu$ l)						
	laF 828 laF 897	LFA 185 LFA 268	K7B c.f. F K7B c.f. R	gaA 515 gaA 616	gaT 950 gaT 1075	acA 231 acA 326	acB 1308 acB 1380
voda pro PCR	16,6	9,8	9,8	10,7	8,7	10,7	10,7
10x reakční pufr	2,5*	2,0	2,0	2,0*	4,0*	2,0*	2,0*
dNTP směs (10 mM)	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	-	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq DNA polymeráza(1 U/ $\mu$ l)	0,4*	1,0	1,0	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*
matrice DNA (10 ng/ $\mu$ l)	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

\*Místo Taq polymerázy byla použita LA polymeráza (5 U/ $\mu$ l) a příslušný pufr

**Tabulka 14: Amplifikační programy pro detekci genů kódujících produkci bakteriocinů**

Acidocin A Acidocin B Gassericin A	Gassericin T	Gassericin K7B	Gassericin K7A	Laktacin F
95°C/3min	95°C/3min	95°C/5min	95°C/5min	95°C/5min
95°C/1min	95°C/1min	95°C/30s	95°C/30s	95°C/30s
45°C/30s	58°C/30s	56°C/30s	55°C/30s	45°C/30s
72°C/30s	72°C/30s	72°C/20s	72°C/20s	72°C/20s
35x krok 2-5	35x krok 2-5	30x krok 2-5	30x krok 2-5	35x krok 2-5
72°C/5min	72°C/5min	72°C/5min	72°C/5min	72°C/5min

#### 4.2.4.7 Detekce genetických determinant gassericinu K7A a gassericinu K7B pomocí PCR

Primery pro detekci genetických determinant gassericinu K7A a gassericinu K7B jsou popsány v Tabulce 15. Složení PCR směsí je následující 17,5  $\mu$ l vody pro PCR; 2,5  $\mu$ l 10x LA pufru kompletního; 1  $\mu$ l dNTP; 1  $\mu$ l primerů (10 pmol/ $\mu$ l); 1  $\mu$ l LA polymerázy (5 U/ $\mu$ l) a 1  $\mu$ l DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l. Amplifikace probíhala následovně: 95°C/5 minut, třicet cyklů 95°C/30 sekund, 60°C/30 sekund a 72°C/40 sekund. Závěrečné doamplifikování bylo provedeno při 72°C/10 minut. Specifické produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

**Tabulka 15: Názvy, sekvence primerů pro amplifikaci DNA a detekci genetických determinant gassericinů K7A a gassericinů K7B a velikosti specifických produktů PCR (Treven a kol. 2013)**

PCR specifická pro	Primer	Sekvence (5'-3')	Produkt PCR (bp)
gassericin K7A komplementární protein	GasA_1F	TGCATGGAGAGGTGCACG	118
	GasA_1R	CCAGCCCACACATTGTACTGAT	
gassericin K7A aktivní protein	GasA_2F	GGATCATGTGGTAAAGGTGCAGTA	105
	GasA_2R	TCCACTAGCAGTTTGTAGAACCAAT	
gassericin K7A imunitní protein	GasA_3F	CACCAATATAGTAGCTCTAATACAGACAC	106
	GasA_3R	ATATTTTGGATTATTTTACCTGCATAGGC	
gassericin K7B komplementární protein	GasB_3F	GAAATGCAGTTTGCAGTCCT	105
	GasB_3R	TTCTTATCTTTCCGAATCCACCAAGTAG	
gassericin K7B aktivní protein	GasB_4F	GAATTAAGAAATGTAATGGGTGGAAACAAG	102
	GasB_4R	TGGTCCGAATCCTCTGCACCAA	
gassericin K7B imunitní protein	GasB_5F	TTGTAATTGGCCAATTTATGTTTTTGAAGT	116
	GasB_5R	CCTATTACAAACGATATGGCCAAAATTAGT	

#### 4.2.5 Příprava amplikonů pro sekvenování

Pro sekvenování genu pro 16S rRNA byla DNA kmenů (10 ng/μl) amplifikována pomocí primerů P0 (5'- GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG – 3') a P6 (5'- CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA – 3') (Verdenelli a kol. 2009). Amplifikace probíhala s použitím následujícího programu: inkubace při 95°C/3 minuty; následovalo 5 cyklů (95°C/30 sekund; 60°C/30 sekund; 72°C/4 minuty), dále 5 cyklů (95°C/30 sekund; 55°C/30 sekund; 72°C/4 minuty), dále 20 cyklů (95°C/30 sekund; 50°C/30 sekund; 72°C/4 minuty). Na závěr byla prodloužena syntéza při 72°C/10 minut a 60°C/10 minut. Získané produkty PCR (rovněž i produkty PCR získané v PCR pro detekci bakteriocinů nebo genů pro probiotické a další vlastnosti) byly přečištěny kitem (QIAquick PCR purification kit, Qiagen, Německo) a poslány na sekvenování (Microsynth, Baldach, Švýcarsko).

#### 4.2.6 Bioinformatická analýza

Při vyhodnocení DNA fingerprintových profilů a stanovení velikosti specifických produktů PCR na agarózových gelech byl použit software BioNumerics 6.5 (Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgie) (Rittich a kol. 2014). Fingerprintové profily byly porovnány a analyzovány s pomocí Pearsonových korelačních koeficientů a UPGMA analýzy (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Ishii a kol. 2009), který popisuje míru lineárního vztahu mezi

dvěma proměnnými (Kimmel a Oliver 2006). Podmínky použití této metody jsou uvedeny v práci Legendre a Legendre (1998).

Pro bioinformatickou analýzu nukleotidových sekvencí byl použit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dostupný na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Algoritmus umožňuje porovnání nukleotidových (případně aminokyselinových) sekvencí se sekvencemi uloženými v databázi (Maddad, 2002). Dále byl použit program Clustal W2 pro mnohonásobné přiřazení sekvencí (což je důležité pro porovnávání většího počtu sekvencí a hledání konzervativních oblastí) (Larkin a kol. 2007).

#### **4.2.7 DNA/DNA hybridizace**

DNA/DNA hybridizace byla provedena podle návodu výrobce kitu (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche) a práce Dušková a kol. (2009). Celý postup zahrnuje denaturaci DNA, její uchycení na membránu ve formě kapek (dot-blot) a přípravu značeného fragmentu DNA pomocí PCR a speciální směsi nukleotidů (směs dNTP s alkalicky stabilním DIG-dUTP). Po hybridizaci DNA na membráně (dvě stringence – při 68°C vysoká stringence; 57°C nízká stringence) se značenou jednořetězcovou sondou byla provedena imunologická detekce hybridizačního produktu s využitím substrátu NBT/BCIP tetrazoliová violeť (4-nitromodř tetrazolium chlorid - [2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chlorid]) a nitrotetrazoliová modř(5-brom-4-chlor-3-indolyl-fosfát p-toluidinová sůl)(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

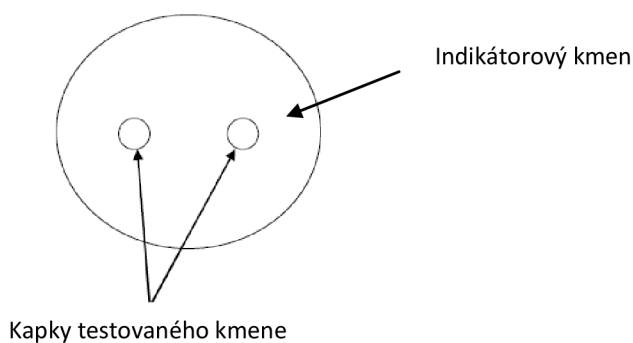
Před provedením DNA/DNA hybridizace byly produkty PCR, ze kterých byly denurací připraveny DNA sondy, přečištěny pomocí magnetického nosiče Fkol 135ox- P(HEMA-co-GMA) (kapitola 4.1.2). Byla připravena směs 400 µl 5 M NaCl, 100 µl produktu PCR, 400 µl 40% PEG 6000 a 100 µl nosiče o koncentraci 2 mg/ml. Směs byla inkubována 20 minut při laboratorní teplotě. Separace v magnetickém separátoru proběhla po dobu 15 minut. Poté byl supernatant slit a k separátu byl přidán 1 ml 70% ethanolu, vše promícháno a odseparováno magnetem po dobu 2 minut (opakováno 2x). DNA adsorbovaná na magnetických částicích byla sušena v exsikátoru po dobu 15 minut. Poté byl přidán TE pufr (50 µl) (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0). Eluce přečištěného produktu PCR probíhala přes noc při 5°C.

## 4.2.8 Testy antimikrobiální aktivity

### 4.2.8.1 Agarový kapkový test

Testované kmeny byly kultivovány v tekutém MRS mediu po dobu 18 hodin při 37°C aerobně. Byl připraven speciální MRS agar pro detekci antimikrobiální aktivity (snížená koncentrace glukózy; 0,2% glukózy) (Matijašić 2012). Testované kmeny byly nakapány na Petriho misky se speciálním MRS agarem v objemu 2  $\mu$ l a inkubovány aerobně při 37°C po dobu 18 hodin.

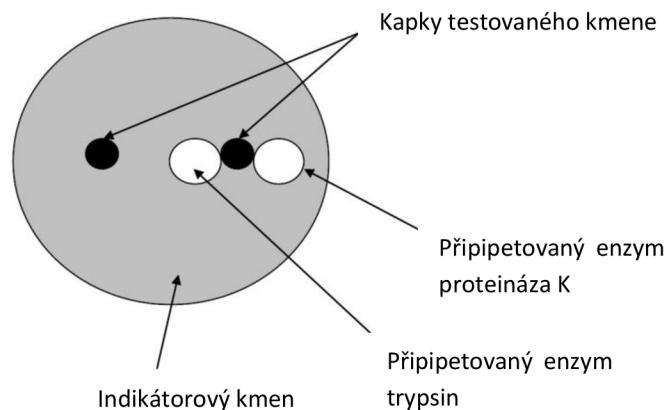
Indikátorové kmeny byly kultivovány ve vhodném mediu pro každý indikátorový kmen (kapitola 4.2.1). Agar na přelití Petriho misek byl připraven z 5 ml polotekutého média s 0,75% agarem a 100  $\mu$ l indikátorového kmene kultivovaného přes noc. Po přelití Petriho misek s bakteriálními kapkami indikátorovým kmenem v polotekutém mediu, byly misky kultivovány přes noc za podmínek, které jsou optimální pro indikátorové kmeny. Výsledné inhibiční zóny byly změřeny (mm) a vizuálně vyhodnoceny, zda je inhibiční zóna jasná (C) nebo matná (UC). Udává se, že jasná inhibiční zóna je způsobena produkcí antimikrobiálních bílkovinných látek – bakteriocinů nebo bakteriocinům podobných peptidů. Matná inhibiční zóna je většinou způsobena produkcí kyseliny mléčné (Matijašić, 2012). Schématické znázornění agarového kapkového testu je uvedeno na Obr. 8.



**Obr. 8 : Schématické znázornění agarového kapkového testu**

#### 4.2.8.2 Agarový kapkový test s využitím proteolytických enzymů

Postup přípravy bakteriálních kapek a provedení agarového kapkového testu je popsán v kapitole 4.2.8.1. Po přelití Petriho misek s bakteriálními kapkami indikátorovým kmenem, byly po stranách kapek připipetovány proteolytické enzymy proteináza K (10 mg/ml)(3-15U/mg, Sigma-Aldrich) a trypsin (10 mg/ml)(7500U/mg, Sigma-Aldrich) (3  $\mu$ l, dvakrát). Misky byly kultivovány přes noc za podmínek definovaných pro indikátorové kmeny. Schématické znázornění agarového kapkového testu s proteolytickými enzymy je uvedeno na Obr. 9.



**Obr. 9: Schématické znázornění agarového kapkového testu s připipetovanými enzymy**

#### 4.2.8.3 Agarový difuzní test

Testované kmeny byly kultivovány aerobně při 37°C po dobu 18 hodin ve speciálním MRS mediu (0,2% glukózy). Supernatanty byly získány centrifugací (6000 g/10 minut) a jejich alikvoty (1ml) byly:

- A) neutralizovány pomocí 1 M NaOH na pH 6,5-7,0 (vyloučen antimikrobiální účinek kyseliny mléčné)
- B) ošetřeny 10  $\mu$ l katalázy (10 mg/ml; vyloučen antimikrobiální účinek peroxidu vodíku) (2000-5000U/mg, Sigma-Aldrich). Inkubace 5 hodin při 30°C.
- C) ošetřeny 10  $\mu$ l proteinázy K (10 mg/ml; vyloučen antimikrobiální účinek látek bílkovinné povahy). Inkubace 2 hodiny při 37°C.



Ošetřené supernatanty byly sterilizovány pomocí filtru (0,20 µm CA Membrane) a nakapány (3 µl, třikrát) na povrch vhodného polotekutého agaru (0,75% agaru; 5 ml) s indikátorovým kmenem (100 µl). Všechny misky byly inkubovány za podmínek vhodných pro indikátorové kmeny.

#### *4.2.8.4 Test vlivu účinku teploty, pH a detergentů na inhibiční vlastnosti antimikrobiálních látek v supernatantu*

Testované kmeny byly kultivovány aerobně při 37°C po dobu 18 hodin ve speciálním MRS mediu (0,2% glukózy). Supernatanty byly získány centrifugací (6000 g/10 minut). Získaný supernatant (10ml) byl neutralizován 1 M NaOH (na pH 6,5-7,0) a poté ošetřen 100µl katalázy (10 mg/ml). Inkubace 5hodin při 30°C.

Takto připravený supernatant byl sterilizován pomocí filtru (0,20 µm CA Membrane) a rozdělen do alikvotů (100 µl), které byly podrobeny teplotnímu ošetření (121°C/15 minut, 80°C/60 minut, 55°C/60 minut, 37°C/60 minut, 5°C/týden, -21°C/týden a -70°C/týden). Supernatanty byly nakapány (3 µl, třikrát) na povrch polotekutého média (0,75 % agar; 5 ml) s indikátorovým kmenem (100 µl). Všechny misky byly inkubovány za podmínek vhodných pro indikátorové kmeny (Nespolo a Brandelli 2010).

Dále byl neutralizovaný a katalázou ošetřený supernatant rozdělen do alikvotů (1 ml) a pH bylo upraveno na požadované hodnoty (pH 2-10) pomocí 1 M NaOH nebo 1M HCl. Takto upravený supernatant byl inkubován po dobu 2 hodin. Poté byla hodnota pH supernatantu upravena zpět na 6,5 – 7,0 a supernatant byl sterilizován pomocí filtru (0,20 µm CA Membrane). Supernatanty byly nakapány (3 µl, třikrát) na povrch 0,75 % polotekutého média (0,75% agar; 5 ml) s indikátorovým kmenem (100 µl). Všechny misky byly inkubovány za podmínek vhodných pro indikátorové kmeny (Nespolo a Brandelli 2010).

Neutralizovaný a katalázou ošetřený supernatant byl rozdělen do alikvotů (100 µl), které byly ošetřeny 10% dodecylsulfátem sodným (SDS); 20% SDS; 1% Tween 20 anebo 0,5 M EDTA (pH 8,0). Takto upravený supernatant byl inkubován po dobu 5 hodin a sterilizován pomocí filtru (0,20 µm CA Membrane) (Ghanbari a kol. 2013). Supernatanty byly nakapány (3 µl, třikrát) na povrch 0,75% polotekutého média (0,75% agar; 5 ml) s indikátorovým kmenem (100 µl). Všechny misky byly inkubovány za podmínek vhodných pro indikátorové kmeny.

#### *4.2.8.5 Stanovení růstové křivky a detekce produkce antimikrobiálních látek v průběhu růstu*

Růstové křivky testovaných kmenů byly stanoveny v průběhu aerobní kultivace buněk ve speciálním tekutém MRS mediu (0,2% glukózy) při 37°C. V určitých časových intervalech byl odebrán 1 ml media s bakteriálními buňkami, které byly ředěny a vysety na Petriho misky s MRS

agarem (vždy na dvě misky pro každé ředění). Misky byly kultivovány aerobně při 37°C po dobu 48 hodin. Poté byly počítány kolonie a stanoven počet CFU/ml.

V každém časovém intervalu bylo měřeno pH supernatantu, který byl získán po sedimentaci buněk centrifugací (6000 g/10 minut). Byla sledována změna pH na čase.

Detekce produkce antimikrobiálních látek byla stanovena následovně: v průběhu kultivace byl v časových intervalech odebírán 1 ml kultury do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek. Kultura byla stočena (6000 g/10 minut) a získaný supernatant byl ošetřen 1 M NaOH (neutralizován na hodnotu pH 6,5-7,0), 10 µl katalázy (10 mg/ml), inkubován 5h při 30°C a rozdělen do dvou shodných alikvotů. Jeden alikvot byl ošetřen přidáním proteinázy K 5 µl (10 mg/ml) pro inhibici antimikrobiálních bílkovinných látek (kontrola), druhý alikvot ošetřen nebyl. Takto připravené supernatanty byly sterilizovány pomocí filtru (0,20 µm CA Membrane) a použity pro agarový difuzní test (kapitola 4.2.8.3).

#### **4.2.8.6 Diluční test supernatantu**

Kmeny byly kultivovány aerobně v MRS mediu po dobu 24 hodin při 37°C. Kultury byly stočeny (6000 g/10 minut) a supernatant (10 ml) byl ošetřen 1 M NaOH (neutralizován na pH 6,5-7,0) a 10 µl katalázy (10 mg/ml). Připravený supernatant byl sterilizován pomocí filtru (0,20 µm CA Membrane) a vyředěn desítkovým ředěním v PBS pufru (Phosphate buffered saline) (pH 7,6; NaCl 7,75 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,50 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,20 g/l). Vyředěný supernatant byl použit pro provedení agarového difuzního testu (kapitola 4.2.8.3). Diluční test byl proveden dvakrát v nezávislých pokusech.

#### **4.2.9 Kompetice o vazebná místa na Caco-2 buňkách**

Kompetice o vazebná místa na Caco-2 buňkách byla testována u vybraných kmenů rodu *Lactobacillus* podle postupu publikovaného v práci Matijašić a kol. (2003). Linie Caco-2 buněk byla kultivována v DMEM mediu (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) s přidavkem fetálního bovinního séra (Hyclone, Německo) a 0,1% gentamicinu (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA). Caco-2 buňky byly přidány na koncentraci 10<sup>5</sup> buněk na jamku v 24 jamkové mikrotitrační destičce a kultivovány 3 týdny do úplného porostu na povrchu jamky (koncentrace buněk 3x10<sup>5</sup> na jamku). Nejméně 24 hodin před testem kompetice bylo DMEM medium s gentamicinem nahrazeno mediem bez antibiotika.

Testované kmeny byly kultivovány při 37°C po dobu 18 hodin v MRS mediu. Po centrifugaci (3500 g/10 minut) byla optická denzita nastavena na hodnotu 0,5 změřením absorbance při 660 nm. Počet buněk (CFU/ml) byl stanoven plotnovou metodou (kultivace Petriho misek při 37°C po dobu 48 hodin na MRS agaru). Test kompetice byl proveden v mikrotitračních destičkách s 24

jamkami. Caco-2 buňky byly promyty dvakrát v PBS (pH 7,4) a potom k nim byla přidána směs 1 ml bakteriálních buněk *Lactobacillus*, 0,5 ml DMEM a 10  $\mu$ l bakteriální kultury *E. coli* O157:H7. Kultivace probíhala po dobu 30 minut v atmosféře 10% CO<sub>2</sub>. Nenavázané bakterie byly odmyty pomocí PBS. Poté byl přidán do jamek 1 ml 0,05% Tritonu X-100. Po 10 minutách inkubace byla směs lyzovaných Caco-2 buněk s navázanými bakteriemi vyseta na VRB agar (Merck, Darmstadt, Německo) pro stanovení počtu buněk (CFU/ml) u kmene *E. coli* O157:H7 tox- (kultivace misek 18 hodin při 37°C aerobně). Test kompetice byl proveden ve dvou nezávislých experimentech. Každý kmen byl testován v 5 jamkách. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Studentova t testu s hladinou významnosti P<0,05.

#### **4. 2. 10 Odolnost k podmínkám gastrointestinálního traktu**

Přežití kmenů v simulovaných podmínkách gastrointestinálního traktu bylo provedeno podle práce Fernandéz a kol. (2003). Všechny testované kmeny byly kultivovány v MRS mediu při 37°C po dobu 18 hodin. Po centrifugaci (3 500 g/5 minut) a promytí ve fyziologickém roztoku (0,85% NaCl) byly bakteriální buňky resuspendovány v 20 ml žaludeční šťávy s následujícím složením: NaCl (125 mM), NaHCO<sub>3</sub> (45 mM), KCl (7 mM) (vše Merck, Darmstadt, Německo), pepsin (3 g/l) (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA). pH bylo nastaveno na hodnoty 2,0 a 3,0. Kmeny laktobacilů byly inkubovány v žaludeční šťávě při 37°C. Alikvoty (100  $\mu$ l) byly odebrány po 0, 1 a 3 hodinách a byly vysety na misky s MRS agarem pro stanovení počtu buněk (CFU/ml). Misky byly kultivovány 48 hodin při 37°C. Po 3 hodinách inkubace v žaludeční šťávě byly bakterie separovány centrifugací (3500 g/5 minut) a resuspendovány ve střešní šťávě o složení: NaCl (125 mM), NaHCO<sub>3</sub> (45 mM), KCl (7 mM) (vše Merck, Darmstadt, Německo), 0,3% nebo 1,0 % žlučových solí (Biolife, Miláno, Itálie) a 0,1% pankreatinem (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA). Hodnota pH byla nastavena na 8,0. Buňky byly inkubovány po dobu 3 hodin při 37°C. Alikvoty (100  $\mu$ l) byly odebrány po 1 a 3 hodinách a vysety na Petriho misky s MRS agarem. Byl stanoven počet buněk (CFU/ml). Experiment byl proveden dvakrát.

#### **4. 2. 11 Rezistence k antibiotikům**

Kmeny byly kultivovány v MRS mediu při 37°C po dobu 18 hodin aerobně. Po centrifugaci (3500 g/5 minut) byl pelet s bakteriálními buňkami resuspendován ve fyziologickém roztoku (0,85% NaCl). Zákal bakteriální suspenze byl stanoven na 1 v McFarlandově řadě. Pro testování rezistence k antibiotikům byly připraveny Petriho misky s 25 ml tekutého média, které obsahovalo 90 % MHA (Mueller-Hinton agar)(Merck, Darmstadt, Německo) a 10 % MRS agarem (pH 6,5). Misky byly vysušeny a na povrch byly rozetřeny bakteriální suspenze testovaných kmenů. Poté byly na povrch položeny pinzetou proužky – E-testy (dle doporučení výrobce AB Biodisk, Solna, Švédsko). Misky s E-testy byly kultivovány při 37°C po dobu 48 hodin anaerobně

dnem dolů. Po této době byly odečteny inhibiční zóny dle pokynů výrobce (AB Biodisk, Solna, Švédsko).

#### **4. 2. 12 Imunomagnetická separace buněk**

Imunomagnetická separace (IMS) byla provedena pomocí nosičů funkcionalizovaných streptavidinem s navázanou biotinylovanou protilátkou anti-*Lactobacillus* (kapitola 4.1.2). Pro IMS byly použity bakteriální buňky *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900, které byly kultivovány aerobně v MRS mediu při 37°C po dobu 18 hodin. Narostlá kultura byla promyta 3x v 1ml PBS. Počet buněk (CFU/ml) byl stanoven výsevem na Petriho misky s MRS agarem plotnovou metodou (kultivace při 37°C po dobu 48 hodin).

Promytá bakteriální kultura kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 (100 µl) byla smíchána se sterilním PBS puřrem (900 µl). Takto připravená bakteriální kultura byla použita pro IMS.

Magnetické nosiče funkcionalizované streptavidinem (50 µl) o koncentraci 5 mg/ml byly 3x promyty v 1 ml PBS. Poté byla přidána 10x ředěná biotinylovaná protilátka anti-*Lactobacillus* (50 µl) (koncentrace protilátky 0,131 mg/ml). Komplex byl inkubován 60 minut v inkubátoru při laboratorní teplotě za neustálého míchání. Po tomto časovém intervalu byl komplex magnetického nosiče s navázanou protilátkou odseparován pomocí magnetického separátoru, dvakrát promyt v 1 ml PBS a přepipetován do sterilní Eppendorfovy zkumavky. Ke komplexu bylo přidáno 50 µl připravené bakteriální kultury. Celý komplex (magnetický nosič+protilátka+bakteriální buňky) byl inkubován 60 minut při 5°C (občas jemně protřepán), odseparován pomocí magnetického separátoru a promyt v 2000 µl PBS. Při promývání byl komplex několikrát přenesen do čisté Eppendorfovy zkumavky. Po posledním promytí byl v resuspendován 50 µl PBS.

##### **4.2.12.1 Imunomagnetické separace buněk z mléka a mléčných výrobků**

Bakteriální buňky kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 promyté v PBS dle postupu v kapitole 4. 2. 12 byly přidány k UHT mléku (100 µl + 900 µl mléka) nebo k bílému jogurtu (100 µl + 900 µl jogurtu). Postup IMS byl dále stejný jako v kapitole 4. 2. 12. Komplex magnetického nosiče s navázanou protilátkou a bakteriálními buňkami byl resuspendován v 50 µl PBS.

##### **4.2.12.2 Detekce imunomagneticky separovaných buněk**

Separovaný komplex (30 µl) byl lyzován při 99°C/30 minut v thermocycleru. Po lyzi komplexu byla provedena PCR (IMS-PCR) specifická pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *Lactobacillus rhamnosus*. PCR byly provedeny dle návodu uvedeného v kapitole 4.2.4.1. Do

směsí pro PCR bylo přidáno 5  $\mu$ l lyzovaného komplexu. Detekce specifických produktů PCR byla provedena pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Separované komplexy byly vysety na misky s MRS agarem v množství 20  $\mu$ l na misku. Kultivace misek proběhla aerobně při 37°C po dobu 48 hodin. Poté byl stanoven počet buněk (CFU/ml).

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky jsou tématicky rozděleny a diskutovány v rámci jednotlivých kapitol. Jednotlivé dílčí závěry byly publikovány jednak na konferencích formou posterů nebo přednášek a jednak formou článků v impaktovaných časopisech. Souhrn publikací je uveden v kapitole 10. *Kompletní souhrn publikací autora*. Plné znění článků publikovaných v recenzovaných časopisech je uvedeno v kapitole 11. *Přílohy*.

### 5.1 Identifikace kmenů rodu *Lactobacillus* s využitím metod založených na amplifikaci DNA

DNA sbírkových a typových bakteriálních kmenů (Tabulka 2) a 68 analyzovaných bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus* (Tabulka 3A a 3B) byla izolována pomocí fenol-chloroformové extrakce (kapitola 4.2.2). Koncentrace izolovaných DNA byly stanoveny spektrofotometricky (kapitola 4.2.3). Všechny DNA byly izolovány v potřebné čistotě (hodnoty poměru absorbancí  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  se pohybovaly v rozmezí 1,8-2,0) a v koncentracích vhodných pro jejich další použití v amplifikačních technikách. Agarózová gelová elektroforéza byla použita pro kontrolu kvality izolované DNA. DNA byla intaktní a obsahovala RNA. DNA analyzovaných bakteriálních kmenů byla amplifikována v PCR pro doménu *Bacteria*, v rodově specifické PCR pro *Lactobacillus* a v druhově specifických PCR pro *L. paracasei*, *L. casei/paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. zaeae*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius* a *L. plantarum*. DNA izolované ze sbírkových a typových kmenů sloužily jako pozitivní kontroly (kapitola 4.2.4).

V PCR pro doménu *Bacteria* byl po amplifikaci DNA u všech kmenů detegován specifický produkt PCR o velikosti 466 bp - DNA všech kmenů byla amplifikovatelná a mohla být použita v dalších identifikačních technikách. Dále byla DNA všech kmenů amplifikována pomocí primerů LbLMA 1rev a R16-1, které ohraničují oblast mezerníku 16S-23S rDNA a jsou specifické pro rod *Lactobacillus* (kapitola 4.2.4.1) (Dubernet a kol. 2002). U všech kmenů (s výjimkou kmene RL27-VGA-7A2) byl detegován specifický produkt PCR o velikosti asi 250 bp značící příslušnost k rodu *Lactobacillus*. Velikost specifického produktu PCR (počet bází) se liší v rámci rodu *Lactobacillus* u jednotlivých druhů, protože některé druhy rodu *Lactobacillus* jsou v oblasti mezerníku 16S-23S rDNA polymorfní (Dubernet a kol. 2002). Kmen RL27-VGA-7A2 byl vyřazen ze souboru testovaných kmenů na základě jeho nepřislušnosti k rodu *Lactobacillus*. Byly tak potvrzen dříve zjištěný výsledek (Turková 2009).

DNA bakteriálních kmenů identifikovaných do rodu *Lactobacillus* (67) byla amplifikována pomocí metod založených na amplifikaci DNA (druhově specifická PCR - kapitola 4.2.4.1; multiplexní PCR - kapitola 4.2.4.2; amplifikace genu *pheS* - kapitola 4.2.4.3 a fingerprintové metody rep-PCR a RAPD-PCR - kapitola 4.2.4.4). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 16. Druhy

zařazené do blízké příbuzných druhů skupiny *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) jsou podrobněji diskutovány v kapitole 5.1.1; druhy zařazené do skupiny *L. acidophilus* (*L. gasseri* a *L. johnsonii*) v kapitole 5.1.2. Osm kmenů nebylo zařazeno do žádného druhu pomocí výše uvedených technik. Pro přesné zařazení byly použity další metody (viz dále).

**Tabulka 16: Druhová identifikace kmenů rodu *Lactobacillus* izolovaných z různých zdrojů.**

Kmen	Rodově specifická PCR	Druhově specifická PCR	Multiplexní PCR	PCR pro <i>pheS</i>	Rep-PCR + RAPD-PCR	Druhová identifikace <i>Lactobacillus</i>
RL1-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL2-P	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL3-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL4-P	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL4-bile7-5A	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL4-bile7-5B	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL5-P	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL6-P	<i>L.</i>	N	-	-	<i>gasseri</i>	N**
RL7-P	<i>L.</i>	N	-	-	N	N***
RL8-P	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL9-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL10-P	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL10-bile7-5A	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL10-bile7-5B	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL11-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL12-PA	<i>L.</i>	<i>fermentum</i>	-	-	<i>fermentum</i>	<i>fermentum</i>
RL12-PB	<i>L.</i>	<i>fermentum</i>	-	-	<i>fermentum</i>	<i>fermentum</i>
RL13-P	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL13-57L3-7AP	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL13-57L3-8AP	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL14-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL15-P	<i>L.</i>	<i>salivarius</i>	-	-	<i>gasseri</i>	<i>salivarius****</i>
RL16-P	<i>L.</i>	<i>fermentum</i>	-	-	<i>salivarius</i>	<i>fermentum****</i>
RL17-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL18-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL19-P	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL20-P	<i>L.</i>	N	-	-	<i>rhamnosus</i>	N*****
RL21-P	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL22-P	<i>L.</i>	<i>gasseri</i>	-	<i>gasseri</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri</i>
RL23-P	<i>L.</i>	<i>fermentum</i>	-	-	<i>fermentum</i>	<i>fermentum</i>
RL24-P	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL25-P	<i>L.</i>	<i>fermentum</i>	-	-	<i>fermentum</i>	<i>fermentum</i>
RL26-P	<i>L.</i>	<i>plantarum</i>	-	-	<i>plantarum</i>	<i>plantarum</i>
RL27-P	<i>L.</i>	N	-	-	N	N***
RL27-VGA-7A2	N	-	-	-	-	N
RL28-P	<i>L.</i>	N	-	-	N	N*****
RL29-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL30-P	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL1	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL2	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL3	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL4	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>

Kmen	Rodově specifická PCR	Druhově specifická PCR	Multiplexní PCR	PCR pro <i>pheS</i>	Rep-PCR + RAPD-PCR	Druhá identifikace <i>Lactobacillus</i>
RL5	<i>L.</i>	<i>johnsonii</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>johnsonii</i>	<i>johnsonii</i>
RL6	<i>L.</i>	N	-	-	N	N**
RL7	<i>L.</i>	N	-	-	N	N***
RL8	<i>L.</i>	<i>johnsonii</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>johnsonii</i>	<i>johnsonii</i>
RL9	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL10	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL11	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL12	<i>L.</i>	<i>fermentum</i>	-	-	<i>fermentum</i>	<i>fermentum</i>
RL13	<i>L.</i>	<i>gasseri/johnsonii*</i>	-	<i>johnsonii</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri/johnsonii</i>
RL14	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL15	<i>L.</i>	<i>salivarius</i>	-	-	<i>salivarius</i>	<i>salivarius</i>
RL16	<i>L.</i>	<i>fermentum</i>	-	-	<i>fermentum</i>	<i>fermentum</i>
RL17	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL18	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
RL19	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>
RL20	<i>L.</i>	N	-	-	N	N*****
RL22	<i>L.</i>	<i>gasseri</i>	-	<i>gasseri</i>	<i>gasseri</i>	<i>gasseri</i>
CCDM 83/00	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
CCDM 148/00	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
CCDM 154/02	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
CCDM 158/00	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
CCDM 821/00	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
CCDM 963/00	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
LOCK 0900	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
LOCK 0908	<i>L.</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>	-	<i>rhamnosus</i>	<i>rhamnosus</i>
LOCK 0919	<i>L.</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	-	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>

*N* neidentifikován; - PCR neprovedena; *L. Lactobacillus*; \* specifický produkt PCR byl detegován v PCR pro *L. gasseri* i v PCR pro *L. johnsonii*; \*\* identifikace do druhu *L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri* pomocí sekvenování genu pro 16SrRNA (kapitola 5.1.3); \*\*\* identifikace do druhu *L. vaginalis* pomocí MALDI-TOF (kapitola 5.1.3); \*\*\*\* druhová identifikace dle výsledků druhově specifické PCR; \*\*\*\*\* identifikace do druhu *L. helveticus* pomocí sekvenování genu pro 16SrRNA (kapitola 5.1.3); \*\*\*\*\* identifikace do druhu *L. oris* pomocí MALDI-TOF (kapitola 5.1.3)

### 5.1.1 Blíže příbuzné druhy skupiny *L. casei*

Skupina blíže příbuzných druhů *L. casei* sdružuje druhy *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* a *L. zeae* (Walter a kol. 2000). Z analyzovaného souboru kmenů bylo do druhu *L. rhamnosus* zařazeno 24 kmenů, do skupiny *L. casei/paracasei* bylo zařazeno 12 kmenů. Všech 12 kmenů bylo následně zařazeno do druhu *L. paracasei* pomocí druhově specifické PCR s využitím primerů publikovaných v práci Ward a Timmins (1999) - velikost specifických PCR produktů byla 290 bp (Tabulka 4). Produkty PCR o velikosti 290 bp byly také detegovány u sbírkových kmenů *L. casei* CCM 4791, *L. casei* CCM 4798 a *L. casei* ssp. *casei* CCM 7089 značící příslušnost k druhu *L. paracasei*. Nicméně u typového kmene *L. casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> nebyly detegovány produkty PCR ani s primery specifickými pro druh *L. casei/paracasei*, ani s primery specifickými pro druh *L. paracasei*. DNA kmene *L. casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> (ATCC 393<sup>T</sup>) byla amplifikována pomocí primerů pro skupinu druhů *L. casei/paracasei*, *L. paracasei* a *L. zeae* (kapitola 4.2.4.1). Specifický produkt PCR byl detegován pouze v druhově specifické PCR pro *L. zeae*. Výsledky se



shodují s tvrzením o příbuznosti kmene *L. casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> (ATCC 393<sup>T</sup>) s druhu *L. zae* v publikacích Dicks a kol. (1996) a Delaglio a kol. (2002).

Pro rozlišení blízce příbuzných druhů skupiny *L. casei* byla v této práci rovněž použita multiplexní PCR dle autorů Sisto a kol. (2009) (kapitola 4.2.4.2). V multiplexní PCR byly u kmenů *L. casei* detegovány dva amplikony o velikosti 540 a 350 bp, u kmenů *L. paracasei* dva amplikony o velikosti 540 a 200 bp a u kmenů *L. rhamnosus* byl detegován jeden fragment o velikosti 540 bp. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 16 a Tabulce 17. Druhová identifikace kmenů zařazených do druhu *L. rhamnosus* a *L. paracasei* pomocí druhově specifických PCR byla potvrzena pomocí multiplexní PCR. U kmenů *L. casei* CCM 4791, *L. casei* CCM 4798 a *L. casei* ssp. *casei* CCM 7089 byly detegovány dva produkty PCR 540 a 200 bp značící příslušnost kmenů k druhu *L. paracasei*. U kmene *L. zae* CCM 7069<sup>T</sup> nebyl podle očekávání detegován žádný PCR produkt.

U kmene *L. casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> (ATCC 393<sup>T</sup>) byly detegovány dva produkty PCR o velikosti 540 a 350 bp, které řadí kmen do druhu *L. casei*, což je v rozporu s předcházejícími výsledky, ve kterých byl detegován specifický produkt PCR pro druh *L. zae*. Dle výše uvedených výsledků lze konstatovat, že taxonomická pozice kmene je nejasná a pomocí výše uvedených identifikačních technik nelze jednoznačně potvrdit příslušnost kmene CCM 7088<sup>T</sup> (ATCC 393<sup>T</sup>) ke druhu *L. casei* ani ke druhu *L. zae*.

Kmen *L. casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> (ATCC 393<sup>T</sup>) je typovým kmenem druhu *L. casei* a je již několik let hlavním předmětem sporů mezi vědci zabývajícími se taxonomií skupiny *L. casei*. Udává se, že je více příbuzný s kmenem *L. zae* CCM 7069<sup>T</sup> (ATCC 15820<sup>T</sup>) než s kmeny druhu *L. casei* a neměl by tedy figurovat jako typový kmen pro druh *L. casei* (Delaglio a kol. 2002). Pomocí DNA/DNA hybridizace bylo zjištěno, že sbírkové kmeny (ATCC 393<sup>T</sup> a ATCC 15820<sup>T</sup>) jsou si podobné z 80 % (Dicks a kol. 1996). Na druhou stranu některé práce využívající genotypových metod ukazují malou příbuznost mezi kmeny *L. casei* ssp. *casei* ATCC 393<sup>T</sup> a *L. zae* ATCC 15820<sup>T</sup> (Tynkkynen a kol. 1999).

**Tabulka 17: Výsledky multiplexní PCR se specifickými primery pro *L. casei*, *L. paracasei* a *L. rhamnosus***

Kmen	Produkt PCR (bp)	Druh <i>Lactobacillus</i>
RL1-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL3-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL4-P	540, 200	<i>paracasei</i>
RL4-bile7-5A	540, 200	<i>paracasei</i>
RL4-bile7-5B	540, 200	<i>paracasei</i>
RL9-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL10-P	540, 200	<i>paracasei</i>
RL10-bile7-5A	540, 200	<i>paracasei</i>
RL10-bile7-5B	540, 200	<i>paracasei</i>
RL11-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL14-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL17-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL18-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL19-P	540, 200	<i>paracasei</i>
RL21-P	540, 200	<i>paracasei</i>
RL29-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL30-P	540	<i>rhamnosus</i>
RL1	540	<i>rhamnosus</i>
RL3	540	<i>rhamnosus</i>
RL4	540, 200	<i>paracasei</i>
RL9	540	<i>rhamnosus</i>
RL10	540, 200	<i>paracasei</i>
RL11	540	<i>rhamnosus</i>
RL14	540	<i>rhamnosus</i>
RL17	540	<i>rhamnosus</i>
RL18	540	<i>rhamnosus</i>
RL19	540, 200	<i>paracasei</i>
CCDM 83/00	540	<i>rhamnosus</i>
CCDM 148/00	540	<i>rhamnosus</i>
CCDM 154/02	540	<i>rhamnosus</i>
CCDM 158/00	540	<i>rhamnosus</i>
CCDM 821/00	540	<i>rhamnosus</i>
CCDM 963/00	540	<i>rhamnosus</i>
<i>L. rhamnosus</i> CCM 1825 <sup>T</sup>	540	<i>rhamnosus</i>
<i>L. rhamnosus</i> CCM 7091	540	<i>rhamnosus</i>
<i>L. casei ssp. casei</i> CCM 7089	540, 200	<i>paracasei</i>
<i>L. casei ssp. casei</i> CCM 7088 <sup>T</sup>	540, 350	<i>casei</i>
<i>L. casei</i> CCM 4791	540, 200	<i>paracasei</i>
<i>L. casei</i> CCM 4798	540, 200	<i>paracasei</i>
<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> CCM 1753 <sup>T</sup>	540, 200	<i>paracasei</i>
<i>L. paracasei ssp. tolerans</i> CCM7092 <sup>T</sup>	540, 200	<i>paracasei</i>
<i>L. zeae</i> CCM 7069 <sup>T</sup>	-	-
LOCK 0900	540	<i>rhamnosus</i>
LOCK 0908	540	<i>rhamnosus</i>
LOCK 0919	540, 200	<i>paracasei</i>

Dle výše uvedených výsledků lze konstatovat, že taxonomická pozice v rámci skupiny *L. casei* je velmi složitá; zabývala se jí řada prací – Collins a kol. (1989); Dellaglio a kol. (1991); Dicks a kol. (1996); Mori a kol. (1997); Klein a kol. (1998); Dellaglio a kol. (2002). Problémy v rámci této skupiny se zabývala mezinárodní komise Judicial Commission of the International Committee of Systematics of Bacteria (Wayne 1994, Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Bacteria 2008). Je nutné zdůraznit, že přesná identifikace, zvláště druhů *L. casei* a *L. paracasei*, je důležitá vzhledem k jejich potenciálnímu využití v potravinářském průmyslu nebo pro vědecké účely. Uvádí se, že až 28 % kmenů *L. casei/paracasei* má probiotické vlastnosti a je tak potenciálně využitelných v mlékárenském průmyslu (Sato a kol. 2012).

### **5.1.2 Blízce příbuzné druhy skupiny *L. acidophilus***

Další skupinou blízce příbuzných druhů v rámci rodu *Lactobacillus* je skupina *L. acidophilus*. Skupina *L. acidophilus* je vysoce heterogenní a dříve byla rozdělena dle metabolických a funkčních vlastností na šest druhů - *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* a *L. johnsonii* (Luginbuhl a kol. 2006, Walter a kol. 2000).

V práci byly použity primery GasI/GasII pro druh *L. gasseri* a primery JohSI/SII pro druh *L. johnsonii* publikované v práci Walter a kol. 2000 (Tabulka 4). U 9 kmenů, u kterých byl detegován specifický produkt PCR pro *L. gasseri*, byl také detegován specifický produkt PCR pro *L. johnsonii*. Jen u dvou kmenů byl detegován specifický produkt PCR pouze pro *L. johnsonii* (RL5, RL8) a jen u dvou kmenů byl detegován specifický produkt PCR pouze pro *L. gasseri* (RL22, RL22-P). Blízká příbuznost mezi druhy *L. gasseri* a *L. johnsonii* v oblasti genu pro 16S rRNA byla publikována již dříve (Luginbuhl a kol. 2006). Pro odlišení těchto druhů bylo testováno využití dalších genů, např. genu pro fenylalanin-tRNA syntetázu (*pheS*) při identifikaci druhu *L. johnsonii* (Grillová 2012). Shrnuté výsledky druhově specifické PCR pro druhy *L. gasseri*, *L. johnsonii* a amplifikace genu pro fenylalanin-tRNA syntetázu (*pheS*) druhu *L. johnsonii* jsou uvedeny v Tabulce 18.

**Tabulka 18: Identifikace kmenů druhu *L. gasseri* a *L. johnsonii* pomocí druhově specifických PCR a amplifikace DNA v PCR pro gen *pheS***

Kmen	Produkt PCR pro <i>L. gasseri</i>	Produkt PCR pro <i>L. johnsonii</i>	Produkt PCR pro <i>pheS</i>	Výsledná druhová identifikace
RL2-P	+	+	+	*
RL5-P	+	+	+	*
RL8-P	+	+	+	*
RL13-P	+	+	+	*
RL13-57L3-7AP	+	+	+	*
RL13-57L3-8AP	+	+	+	*
RL22-P	+	-	-	<i>gasseri</i>
RL24-P	+	+	+	*
RL2	+	+	+	*
RL5	-	+	+	<i>johnsonii</i>
RL8	-	+	+	<i>johnsonii</i>
RL13	+	+	+	*
RL22	+	-	-	<i>gasseri</i>
<i>L. gasseri</i> CCM 7009 <sup>T</sup>	+	-	-	<i>gasseri</i>
<i>L. johnsonii</i> CCM 4384 <sup>T</sup>	-	+	+	<i>johnsonii</i>
<i>L. gasseri</i> K7	+	-	-	<i>gasseri</i>
<i>L. johnsonii</i> CCM 2935	-	+	+	<i>johnsonii</i>

+ specifický produkt PCR detegován; - specifický produkt PCR nedetegován; \*nelze jednoznačně zařadit do druhu na základě dosažených výsledků

Z výsledků uvedených v Tabulce 18 vyplývá, že druhová identifikace kmenů blíže příbuzných druhů *L. gasseri* a *L. johnsonii* s využitím primerů od Walter a kol. (2000) a Grillová (2012) není jednoznačná. Jednoznačně byly identifikovány kmeny *L. gasseri* CCM 7009<sup>T</sup>, *L. johnsonii* CCM 4384<sup>T</sup>, *L. gasseri* K7 a *L. johnsonii* CCM 2935. RL kmeny rodu *Lactobacillus* nebyly zařazeny do druhu s výjimkou kmenů RL5 a RL8 (zařazeny do druhu *L. johnsonii*) a RL22-P a RL22 (zařazeny do druhu *L. gasseri*). Primery GasI/GasII a JohnSI/JohnSII (Walter a kol. 2000) a primery Lj*phe*SFW/Lj*phe*SRW (Grillová 2012) nejsou vhodné pro jednoznačné odlišení druhů *L. gasseri* a *L. johnsonii* ve studovaném souboru bakteriálních kmenů.

### 5.1.3 Porovnání sekvencí genů pro 16S rRNA

Pomocí druhově specifických PCR nebylo identifikováno do druhu 8 kmenů rodu *Lactobacillus* - RL6-P, RL7-P, RL20-P, RL27-P, RL28-P, RL6, RL7 a RL20 (Tabulka 16). U těchto kmenů byla DNA amplifikována pomocí primerů P0 a P6 ohraničujících celý úsek DNA pro 16S rRNA (Verdnerelli a kol. 2009). Specifický produkt PCR o velikosti 1466 bp byl přečištěn pomocí kitu a poslán na sekvenování (kapitola 4.2.5). Výsledné sekvence nukleotidů byly porovnány s dostupnými sekvencemi v databázi GeneBank pomocí algoritmu BLAST a bylo

vypočteno procento podobnosti s kmeny v databázi (kapitola 4.2.6). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 19.

**Tabulka 19: Druhá identifikace pomocí podobnosti genů pro 16S rRNA**

Kmen	Druhá identifikace (% podobnosti)
RL6-P	<i>L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri</i> (98%)
RL7-P	<i>L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri</i> (98%)
RL20-P	<i>L. helveticus</i> (100%)
RL27-P	<i>L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri</i> (98%)
RL28-P	<i>L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri</i> (98%)
RL6	<i>L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri</i> (98%)
RL7	<i>L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri</i> (98%)
RL20	<i>L. helveticus</i> (100%)

Kmeny RL20-P a RL20 byly zařazeny do druhu *L. helveticus*. Pomocí algoritmu BLAST byla nalezena 100% shoda sekvence nukleotidů kmenů RL20-P a RL20 s několika sekvencemi kmenů druhu *L. helveticus* uloženými v databázi GeneBank. Šest zbývajících kmenů bylo zařazeno do skupiny několika druhů *L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri*. Sekvence genu pro 16S rRNA neumožnila jednoznačné zařazení těchto kmenů do druhu, což je v souladu s údaji uváděnými v literatuře (Delavenne a kol. 2013).

Identifikace kmenů RL6-P, RL7-P, RL27-P, RL28-P, RL6 a RL7 byla upřesněna pomocí další identifikační techniky – MALDI-TOF. Kmeny RL7, RL7-P a RL27-P byly identifikovány do druhu *L. vaginalis*. Kmen RL28-P byl identifikován do druhu *L. oris*. U zbylých kmenů RL6-P a RL6 nebyla technika MALDI-TOF schopná jednoznačně identifikovat kmeny do druhu a bude nutné podrobit tyto kmeny další identifikaci (Španová 2014).

#### 5.1.4 Stanovení příbuznosti pomocí fingerprintových technik

Pro potvrzení druhové identifikace a pro stanovení příbuznosti a genetické variability mezi kmeny v rámci jednotlivých druhů byla DNA všech kmenů amplifikována pomocí primerů M13 (RAPD-PCR) a (GTG)<sub>5</sub> (rep-PCR) (kapitola 4.2.4.4). Jednotlivé fingerprintové profily kmenů byly porovnávány pomocí programu BioNumerics 6.5 (kapitola 4.2.6). Pro analýzu fingerprintů daného souboru byl využit algoritmus shlukové analýzy dat UPGMA s Pearsonovým korelačním koeficientem (Jelínek 2010). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 16. Příklady sestrojených dendrogramů z fingerprintových profilů kmenů jsou uvedeny v Příloze 1 v rámci publikovaného článku.

Pro identifikaci do druhů rodu *Lactobacillus* se rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub> ukázala jako vhodnější metoda než RAPD-PCR. Naproti tomu technika RAPD-PCR s primerem M13 byla

vhodnější pro hodnocení vnitrodruhové variability. Kombinace obou fingerprintových metod rep-PCR a RAPD-PCR umožnila přesnější druhovou identifikaci na stejné hladině podobnosti jako u techniky rep-PCR samotné. Uvedené metody byly s úspěchem použity pro typizaci různých druhů laktobacilů (Gevers a kol. 2001, Rossetti a Giraffa 2005, Švec a kol. 2010).

### 5.1.5 Shrnutí druhové identifikace kmenů

V současné době (červenec/2014) obsahuje rod *Lactobacillus* více než 150 druhů a poddruhů (podle <http://www.bacterio.net>). Rod *Lactobacillus* je považován za nejvíce heterogenní rod mezi BMK a pro přesnou identifikaci druhů je nutné využít více identifikačních technik – tzv. polyfázní přístup (Bernardeau a kol. 2008).

Laktobacily izolované ze stolice zdravých plně kojených dětí byly v této práci identifikovány do deseti druhů (*L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. oris*) a dvou skupin druhů *L. gasseri/johnsonii* a *L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri* pomocí několika molekulárně biologických technik (Tabulka 16, Tabulka 17, Tabulka 18, Tabulka 19). Všechny tyto druhy byly identifikovány v lidském gastrointestinálním traktu (Wall a kol. 2007, Mitsou a kol. 2008, Štšepetova a kol. 2011, Rubio a kol. 2014). Autoři Wall a kol. (2007) zjistili, že lidské střevo je původně po narození osídleno jen několika kmeny jednoho či dvou druhů. Mitsou a kol. (2008) našli mezi laktobacily v prvních měsících života dominanci kmenů druhu *L. rhamnosus* a *L. paracasei*; Rubio a kol. 2014 detegoval v prvním měsíci života nejvíce kmenů druhu *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. casei/paracasei*, *L. oris* a *L. vaginalis*. Po dvou měsících života již převládalo zastoupení kmenů *L. casei/paracasei* (Rubio a kol. 2014). Wall a kol. (2007) identifikovali kmeny druhu *L. rhamnosus* a *L. casei/paracasei* především u dospělých jedinců. Kmeny *L. gasseri* se vyskytují ve vagině zdravých žen a během porodu tak mohou kolonizovat novorozence a být přítomny v jeho gastrointestinálním traktu (Matsumiya a kol. 2012). Ve studii autorů Martín a kol. 2003 bylo ukázáno, že RAPD-PCR fingerprintové profily kmenů izolovaných z dětské stolice se shodují s RAPD-PCR profily kmenů z mateřského mléka.

Všechny kmeny izolované z mléčných výrobků nebo ze siláže byly zařazeny do druhu *L. rhamnosus*. Kmeny druhu *L. rhamnosus* se často vyskytují v mlékárenských výrobcích, včetně různých druhů sýrů (Bernadeau a kol. 2006). Kmeny *L. rhamnosus* se také používají spolu s kmeny *L. buchneri* k fermentaci siláže (Li a Nishimo 2011).

Část výsledků uvedených v kapitole 5.1, včetně příkladu sestrojených dendrogramů v kapitole 5.1.4 Stanovení příbuznosti pomocí fingerprintových technik, byla publikována v článku Turková K., Rittich B., Španová A.: *Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods. Chemical Papers, 2012, 66, 842-851*. V článku byla použita DNA kmenů RL-P; kmeny jsou avšak označeny pouze jako RL. Toto zjednodušené označení bylo použito na základě žádosti recenzenta článku. Plné znění článku je uvedeno v

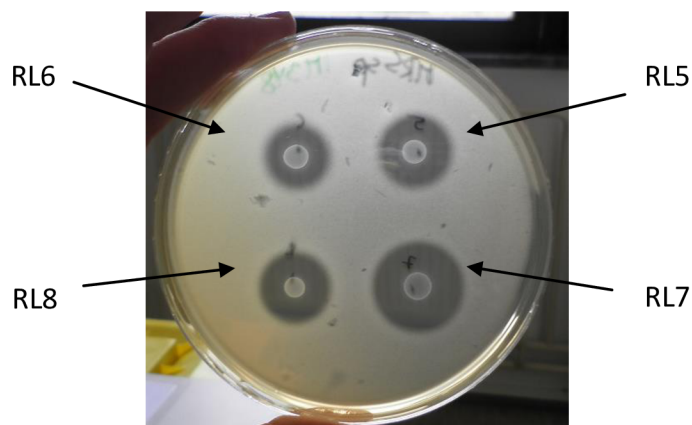
Příloze 1. Výsledky identifikace kmenů byly dále publikovány ve formě plakátových sdělení či přednášek (viz Kapitola 10).

## 5.2 Produkce antimikrobiálních látek kmeny rodu *Lactobacillus*

Antagonistická a inhibiční aktivita bakterií rodu *Lactobacillus* je založena na různých vlastnostech, mezi které patří kompetice o živiny a produkce jednoho nebo více antimikrobiálních metabolitů jako jsou organické kyseliny (kyselina mléčná nebo kyselina octová), peroxid vodíku, a antimikrobiální peptidy - bakteriociny (Ghanbari a kol. 2013). Mezi základní skriningové testy patří agarový kapkový test a agarový difuzní test.

### 5.2.1 Testování produkce antimikrobiálních látek pomocí agarového kapkového testu

Testování produkce antimikrobiálních látek bylo provedeno pomocí agarového kapkového testu a agarového kapkového testu s připipetovanými proteolytickými enzymy (kapitola 4.2.8.1 a kapitola 4.2.8.2). Na produkci antimikrobiálních látek bylo testováno 65 bakteriálních kmenů (Tabulka 3A a Tabulka 3B; nebyly testovány kmeny RL13-57L3-7AP a RL13-57L3-8AP) s použitím dvanácti indikátorových kmenů (Tabulka 2). Na Obr. 10 je zobrazena Petriho miska s agarovým kapkovým testem. Příklad Petriho misky s agarovým kapkovým testem a připipetovanými proteolytickými enzymy je uveden na Obr. 11. Velikosti inhibičních zón (mm) jsou uvedeny v Tabulkách 20 a 21 a jsou průměrem ze čtyř pokusů.



**Obr. 10: Agarový kapkový test** Inhibiční zóny způsobené produkcí antimikrobiálních látek kmenů RL5, RL6, RL7 a RL8; indikátorový kmen *L. delbrueckii* IM348





**Tabulka 20: Velikosti inhibičních zón (mm) stanovené pomocí agarového kapkového testu (indikátorové kmeny – *Lactobacillus* sp.)**

Testovaný kmen	Indikátorový kmen					
	<i>L. salivarius</i> IM 124	<i>L. gasseri</i> IM 340	<i>L. sakei</i> IM 398	<i>L. delbrueckii</i> IM 348	<i>L. delbrueckii</i> IM 349	<i>L. fermentum</i> IM 351
RL1-P	2,0±0,1 UC	-	0,5±0,1 C	3,9±0,2 C	6,4±0,3 C	-
RL2-P	-	4,3±0,2 CPT	3,7±0,2 CPT	6,6±0,4 CPT	7,1±0,2 CPT	3,4±0,2 CPT
RL3-P	5,5±0,3 UC	-	0,7±0,1 UC	3,1±0,1 UC	5,3±0,3 C	-
RL4-P	4,9±0,4 UC	-	0,7±0,1 UC	1,9±0,1 C	4,6±0,1 C	-
RL4-bile7-5A	2,0±0,1 UC	-	-	2,3±0,3 C	3,0±0,1 C	2,0±0,1 UC
RL4-bile7-5B	2,0±0,1 UC	-	-	2,4±0,1 C	2,3±0,1 C	2,0±0,2 UC
RL5-P	-	-	-	-	-	-
RL6-P	-	0,5±0,1 UC	2,4±0,2 UC	-	-	-
RL7-P	-	-	-	2,3±0,1 UC	1,4±0,1 UC	-
RL8-P	3,0±0,2 UC	-	1,0±0,1 C	4,2±0,4 C	2,7±0,2 UC	3,7±0,3 C
RL9-P	1,9±0,1 UC	-	1,1±0,1 C	3,2±0,2 CPT	3,1±0,1C	1,0±0,1 C
RL10-P	2,0±0,1 UC	-	2,0±0,1 C	3,2±0,2 C	3,6±0,2 C	5,0±0,3C
RL10-bile7-5A	2,0±0,1 UC	-	1,0±0,1 C	4,0±0,2 UC	3,1±0,1 C	5,0±0,4C
RL10-bile-5B	2,0±0,1 UC	-	1,0±0,1C	5,1±0,4 UC	2,6±0,1C	5,0±0,3 C
RL11-P	1,8±0,1 UC	-	0,9±0,1 CPT	3,6±0,3 C	2,4±0,2 CPT	-
RL12-PA	2,0±0,1 UC	-	-	5,0±0,3 UC	3,0±0,1 C	-
RL12-PB	2,0±0,1UC	-	-	3,0±0,1 UC	3,0±0,1 C	-
RL13-P	-	-	2,1±0,2 CPT	1,0±0,1 UC	3,0±0,2 C	-
RL14-P	1,0±0,1 UC	-	1,2±0,1 UC	1,0±0,1 UC	1,5±0,1UC	-
RL15-P	5,3±0,4 CPT	4,9±0,3CPT	4,7±0,3 CPT	9,5±0,5 CPT	8,7±0,5 CPT	7,9±0,3 CPT
RL16-P	-	-	2,4±0,2 UC	1,0±0,1UC	2,1±0,1 UC	-
RL17-P	-	-	3,1±0,2 UC	1,0±0,1UC	1,3±0,1 UC	-
RL18-P	-	-	-	1,3±0,1 UC	1,5±0,1 UC	-
RL19-P	2,0±0,1 UC	-	1,6±0,1 C	3,4±0,2 C	4,1±0,3 C	2,0±0,1 UC
RL20-P	-	-	3,5±0,2 UC	-	2,1±0,1 UC	-
RL21-P	-	2,0±0,1 UC	2,3±0,1 UC	2,4±0,1 UC	-	-
RL22-P	0,7±0,1 CPT	4,2±0,3 CPT	4,8±0,3 CPT	6,3±0,4 CPT	6,3±0,5 CPT	2,9±0,1 CPT
RL23-P	-	2,4±0,1 UC	2,4±0,1 UC	-	0,8±0,1 UC	2,7±0,1 UC
RL24-P	-	2,0±0,1UC	1,3±0,1 UC	1,5±0,2 UC	-	3,6±0,1 UC
RL25-P	-	-	1,2±0,1 UC	1,2±0,1 UC	1,4±0,1 UC	1,0±0,1 UC
RL26-P	2,0±0,1 UC	-	1,9±0,1 CPT	3,3±0,1 C	4,5±0,2 CPT	1,0±0,1 UC
RL27-P	-	-	1,7±0,1 UC	2,4±0,1 UC	2,4±0,1 UC	-
RL28-P	-	-	-	-	-	-
RL29-P	-	-	-	-	-	-
RL30-P	-	-	-	-	-	-
RL1	-	2,3±0,1 C	1,2±0,1 C	2,8±0,2 UC	4,1±0,2 C	0,6±0,1 UC
RL2	-	4,1±0,2 CPT	4,7±0,2 CPT	5,8±0,2 CPT	5,1±0,3 C	3,6±0,1 UC
RL3	-	-	1,2±0,1 C	1,5±0,1 UC	2,4±0,1 C	0,8±0,1 UC
RL4	-	2,8±0,1 UC	1,1±0,1 C	1,6±0,1 UC	2,6±0,1 C	-
RL5	-	2,6±0,1 UC	3,9±0,1 CPT	6,5±0,2 CPT	8,0±0,4 CPT	0,5±0,1 C
RL6	-	1,5±0,1 UC	3,1±0,1 CPT	5,2±0,3 CPT	6,2±0,3 CPT	0,5±0,1 C
RL7	-	4,3±0,3 CPT	4,8±0,3 CPT	6,9±0,2 CPT	8,6±0,4 CPT	1,5±0,1 C
RL8	-	3,3±0,3 CPT	4,7±0,3 CPT	6,2±0,3 CPT	7,3±0,3 CPT	1,1±0,1 C

Testovaný kmen	Indikátorový kmen					
	<i>L. salivarius</i> IM 124	<i>L. gasseri</i> IM 340	<i>L. sakei</i> IM 398	<i>L. delbrueckii</i> IM 348	<i>L. delbrueckii</i> IM 349	<i>L. fermentum</i> IM 351
RL9	-	-	0,9±0,1 C	2,4±0,1 UC	1,7±0,1 UC	-
RL10	-	-	1,1±0,1 C	1,6±0,1 UC	4,3±0,3 C	-
RL11	-	-	-	-	-	-
RL12	-	-	-	2,8±0,1 C	5,1±0,3 C	0,8±0,1 UC
RL13	1,5±0,1 UC	-	-	2,6±0,1 UC	3,4±0,3 UC	3,5±0,3 UC
RL14	-	-	1,0±0,1 C	2,7±0,1 CPT	5,0±0,3 C	0,8±0,1 C
RL15	-	2,1±0,1 CPT	3,6±0,3 CPT	5,6±0,3 C	6,7±0,3 CPT	1,5±0,1 CPT
RL16	-	-	-	4,1±0,2 UC	5,7±0,3C	-
RL17	-	-	1,3±0,1 C	3,7±0,2 UC	4,7±0,3 C	1,1±0,1UC
RL18	-	-	0,9±0,1 UC	2,0±0,1 UC	2,3±0,3 UC	1,1±0,1UC
RL19	-	3,6±0,1 C	3,6±0,2 CPT	6,5±0,4 CPT	4,4±0,2 C	1,9±0,1 C
RL20	-	-	-	-	0,9±0,1 UC	-
RL22	-	2,4±0,1 UC	1,6±0,1 UC	4,6±0,3 UC	3,4±0,1 C	-
K7	-	2,3±0,1 CPT	2,1±0,1 CPT	6,2±0,3 CPT	5,4±0,4 CPT	0,3±0,1 CPT
LOCK 0900	-	-	-	-	-	-
LOCK 0908	-	-	-	-	-	-
LOCK 0919	-	-	-	-	-	-
CCDM 83/00	-	-	-	-	-	-
CCDM 148/00	-	-	-	-	-	-
CCDM 154/02	-	-	-	-	-	-
CCDM 158/00	-	-	-	-	-	-
CCDM 821/00	-	-	-	-	-	-
CCDM 963/00	-	-	-	-	-	-

*P* inhibiční zóna zúžená aplikací proteinázy K; *T* inhibiční zóna zúžená aplikací trypsinu; *C* jasná inhibiční zóna; *UC* matná inhibiční zóna; *N* neprovedeno; - inhibiční zóna nebyla detegována; šedá výplň – detekce zúžení inhibiční zóny pomocí proteolytických enzymů

**Tabulka 21: Velikosti inhibičních zón (mm) stanovené pomocí agarového kapkového testu (indikátorové kmeny bez *Lactobacillus* sp.)**

Testovaný kmen	Indikátorový kmen					
	<i>St. aureus</i> IM 353	<i>E. coli</i> IM 429	<i>E. coli</i> IM 430	<i>En. faecalis</i> IM 435	<i>En. faecalis</i> IM 436	<i>S. e. ser. Typhimurium</i> IM 318
RL1-P	-	1,2±0,1 UC	1,0±0,1 UC	1,3±0,1 UC	-	0,5±0,1 C
RL2-P	2,8±0,1 C	-	-	0,2±0,1 UC	2,0±0,1 UC	-
RL3-P	-	-	0,7±0,1 UC	-	-	0,8±0,1 C
RL4-P	0,9±0,1 UC	-	0,7±0,1 UC	-	-	1,0±0,1 C
RL4-bile7-5A	0,9±0,1 UC	-	0,5±0,1 UC	-	-	0,8±0,1 UC
RL4-bile7-5B	1,2±0,1 UC	-	0,7±0,2 UC	-	-	0,9±0,1 UC
RL5-P	-	-	-	-	-	-
RL6-P	-	-	-	-	-	-
RL7-P	-	-	0,7±0,1 UC	1,4±0,1 UC	-	0,6±0,1 UC
RL8-P	0,8±0,1 UC	-	0,7±0,1 UC	1,3±0,1 C	-	0,9±0,1 C
RL9-P	0,6±0,1 UC	0,9±0,1 UC	0,8±0,1 UC	1,3±0,1 UC	-	1,0±0,1 UC
RL10-P	0,5±0,1 UC	0,9±0,1 UC	0,7±0,1 UC	1,1±0,1 UC	-	1,2±0,1 C
RL10-bile7-5A	0,7±0,1 UC	-	0,4±0,1 UC	-	-	0,8±0,1 UC
RL10-bile7-5B	0,7±0,1 UC	-	0,5±0,1 UC	-	-	0,8±0,1 UC
RL11-P	-	-	0,8±0,1 UC	1,2±0,1 UC	-	1,3±0,1 C
RL12-PA	-	-	-	-	-	-
RL12-PB	-	-	-	-	-	-
RL13-P	-	-	0,4±0,1 UC	1,0±0,1 UC	-	-
RL14-P	-	-	-	1,3±0,1 UC	-	-
RL15-P	4,3±0,3 CPT	1,3±0,1 C	0,5±0,1 UC	1,4±0,1 CPT	10,3±0,7 CPT	1,2±0,1 UC
RL16-P	-	-	-	-	-	-
RL17-P	-	-	-	-	-	-
RL18-P	-	-	-	-	-	-
RL19-P	-	0,7±0,1 UC	0,8±0,1 UC	-	-	0,5±0,1 UC
RL20-P	-	-	-	-	-	-
RL21-P	-	-	-	-	-	-
RL22-P	5,2±0,4 C	-	-	-	3,2±0,3 C	0,5±0,1 UC
RL23-P	-	-	0,4±0,1 UC	-	-	-
RL24-P	-	-	-	0,4±0,1 UC	-	-
RL25-P	-	-	-	-	1,5±0,1 UC	-
RL26-P	1,2±0,1 UC	1,0±0,1 UC	1,1±0,1 UC	1,0±0,1 UC	-	2,0±0,1 UC
RL27-P	-	-	-	-	-	-
RL28-P	-	-	-	-	-	-
RL29-P	-	-	-	-	-	-
RL30-P	-	-	-	-	-	-
RL1	-	-	1,2±0,1 UC	-	-	1,0±0,1 C
RL2	-	-	0,7±0,1 UC	3,1±0,3 C	-	0,4±0,1 UC
RL3	-	-	-	-	-	0,5±0,1 C
RL4	-	-	-	-	-	1,1±0,1 UC
RL5	-	-	-	-	-	0,5±0,1 UC
RL6	1,8±0,1 C	-	-	1,7±0,1 C	-	-
RL7	2,4±0,2 UC	-	-	1,7±0,1 C	-	0,5±0,1 UC
RL8	1,5±0,1 C	-	-	1,4±0,1 C	-	-

Testovaný kmen	Indikátorový kmen					
	<i>St. aureus</i> IM 353	<i>E. coli</i> IM 429	<i>E. coli</i> IM 430	<i>E. faecalis</i> IM 435	<i>E. faecalis</i> IM 436	<i>S. e. ser. Typhimurium</i> IM 318
RL9	-	-	-	-	-	0,5±0,1 UC
RL10	-	1,3±0,1 UC	-	-	-	0,8±0,1 UC
RL11	-	-	-	-	-	-
RL12	-	-	-	-	-	-
RL13	1,5±0,1 UC	-	-	-	-	-
RL14	-	-	-	-	-	0,8±0,1 UC
RL15	-	-	-	0,9±0,2 C	-	0,7±0,2 C
RL16	-	-	-	-	-	-
RL17	-	-	-	-	-	0,7±0,1 UC
RL18	0,6±0,2 UC	-	-	-	-	0,6±0,1 C
RL19	0,6±0,1 UC	-	-	0,3±0,1 UC	-	0,7±0,1 C
RL20	2,8±0,2 UC	-	-	1,3±0,1 C	2,1±0,1 C	1,0±0,1 C
RL22	0,6±0,1 UC	-	-	1,3±0,2 UC	-	-
K7	0,5±0,1 C	-	-	0,5±0,1 C	-	0,5±0,1 C
LOCK 0900	-	-	-	-	-	-
LOCK 0908	-	-	-	-	-	-
LOCK 0919	-	-	-	-	-	-
CCDM 83/00	-	-	-	-	-	-
CCDM 148/00	-	-	-	-	-	-
CCDM 154/02	-	-	-	-	-	-
CCDM 158/00	-	-	-	-	-	-
CCDM 821/00	-	-	-	-	-	-
CCDM 963/00	-	-	-	-	-	-

P inhibiční zóna zúžená aplikací proteinázy K; T inhibiční zóna zúžená aplikací trypsinu; C jasná inhibiční zóna; UC matná inhibiční zóna; - inhibiční zóna nebyla detegována; šedá výplň – detekce zúžení inhibiční zóny pomocí proteolytických enzymů

S výjimkou 14 kmenů (RL5-P, RL28-P, RL29-P, RL30-P, RL11, LOCK 0900, LOCK 0908, LOCK 0919, CCDM 83/00, CCDM 148/00, CCDM 154/02, CCDM 158/00, CCDM 821/00, CCDM 963/00) testované kmeny rodu *Lactobacillus* (51) inhibovaly nejméně jeden indikátorový kmen. Patnáct kmenů (RL2-P, RL9-P, RL11-P, RL13-P, RL15-P, RL22-P, RL26-P, RL2, RL5, RL6, RL7, RL8, RL14, RL15, RL19) produkovalo antimikrobiální bílkovinné substance (citlivé k proteináze K anebo k trypsinu) inhibující nejméně jeden indikátorový kmen. Degradace antimikrobiálních látek bílkovinné povahy byla většinou shodná (zúžení inhibiční zóny z obou stran) pro proteinázu K i pro trypsin. Jako kontrola byl použit kmen *L. gasseri* K7, který je známým producentem bakteriocinů gassericin K7A a gassericin K7B (Treven a kol. 2013).

Produkce antimikrobiálních bílkovinných látek účinných pouze vůči kmenům rodu *Lactobacillus* byla pozorována u patnácti testovaných kmenů. Z testovaného souboru kmenů pouze RL15P produkoval antimikrobiální bílkovinné substance účinné také vůči kmenům *St. aureus* IM353, *En. faecalis* IM435 a *En. faecalis* IM436. Bylo publikováno, že produkce antimikrobiálních bílkovinných látek je nejčastější vůči blízké příbuzným rodům (tzv. úzké

spektrum inhibice) (Ghanbari a kol. 2013). U některých kmenů byla prokázána produkce bakteriocinů účinných nejen vůči rodům blízkým k producentovi, ale i k vzdáleným bakteriálním rodům a druhům (tzv. široké spektrum inhibice) (Belguesmia a kol. 2011). Některé kmeny testované v této práci neprodukovaly žádné antimikrobiální látky. Tyto kmeny buď antimikrobiální látky neprodukují, nebo je produkují v nízké koncentraci. Jedním z dalších vysvětlení mohou být nevhodně zvolené indikátorové kmeny, které nejsou dostatečně citlivé.

### 5.2.2 Testování produkce antimikrobiálních látek pomocí agarového difuzního testu

Všechny kmeny (celkem 15), které produkovaly antimikrobiální látky bílkovinného původu, byly dále testovány v agarovém difuzním testu (kapitola 4.2.8.3). Pro charakterizaci antimikrobiální látky v supernatantu byla použita kataláza (odstranění inhibičního účinku peroxidu vodíku); inhibiční účinek kyseliny mléčné byl odstraněn neutralizací supernatantu pomocí 1 M NaOH a inhibiční účinek bílkovinných látek byl odstraněn pomocí proteolytického enzymu proteinázy K (Dimitonova a kol. 2007). Výsledky agarového difuzního testu s charakterizací antimikrobiální látky jsou uvedeny v Tabulce 22. Příklad Petriho misky s agarovým difuzním testem je uveden na Obr. 12.



- 1 neošetřený supernatant
- 2 ošetřený katalázou
- 3 ošetřený 1 M NaOH
- 4 ošetřený katalázou + 1 M NaOH
- 5 ošetřený proteinázou K

**Obr. 12: Agarový difuzní test** Testovaný supernatant kmene *L. gasseri* RL22P s antimikrobiální látkou bílkovinné povahy; indikátorový kmen *L. fermentum* IM351

**Tabulka 22: Charakterizace antimikrobiálních látek detegovaných pomocí agarového difuzního testu**

Kmen	Indikátorový kmen												
	<i>L. salivarius</i> IM 124	<i>L. sakei</i> 10/1	<i>L. gasseri</i> IM 340	<i>L. sakei</i> IM 398	<i>L. delbrueckii</i> IM 348	<i>L. delbrueckii</i> IM 349	<i>L. fermentum</i> IM 351	<i>St. aureus</i> IM 353	<i>E. coli</i> IM 429	<i>E. coli</i> IM 430	<i>En. faecalis</i> IM 435	<i>En. faecalis</i> IM 436	<i>S. e. ser. Typhimurium</i> IM 318
RL2-P	-	P	P	P	P	P	-	-	-	-	-	-	-
RL9-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL11-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL13-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL15-P	-	P	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
RL22-P	-	P	P	P	P	P	P	-	-	-	-	-	-
RL26-P	-	P	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
RL2	-	P	P	P	P	P	-	-	-	-	-	-	-
RL5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL7	-	P	PK	-	P	PK	-	-	-	-	-	-	-
RL8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL14	-	P	-	-	-	PK	-	-	-	-	-	-	-
RL15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*P* antimikrobiální substance citlivé k proteináze K; *PK* antimikrobiální substance citlivé k proteináze K a kataláze; -inhibiční zóny nebyly detegovány (ani u neošetřeného supernatantu)

Pouze v supernatantech 7 kmenů (RL2-P, RL15-P, RL22-P, RL26-P, RL2, RL7, RL14) byly detegovány antimikrobiální látky citlivé k proteolytickému enzymu (proteináze K) na rozdíl od agarového kapkového testu, kde byla detegována produkce antimikrobiálních bílkovinných látek u 15 testovaných kmenů (kapitola 5.2.1). Jedním vysvětlením rozdílu v detekci produkce antimikrobiálních bílkovinných látek mezi agarovým kapkovým testem a difuzním testem u stejných kmenů může být nedostatečná koncentrace antimikrobiální bílkovinné látky v supernatantu po 18 hodinové kultivaci v případě agarového difuzního testu (kapitola 4.2.8.3). Uvádí se, že antimikrobiální bílkovinné látky mohou být produkovány jak v exponenciální fázi růstu, tak ve stacionární fázi růstu, a proto 18 hodinová kultivace nemusí být v případě některých kmenů dostatečná pro projevení antimikrobiálního účinku (Pringsulaka a kol. 2012, Jiang a kol. 2012). Na rozdíl od difuzního testu, při agarovém kapkovém testu je testovaný kmen kultivován na pevném mediu a antimikrobiální látky mohou difundovat do agarového media po celou dobu kultivace s indikátorovým kmenem.

Pokud testovaný kmen produkuje více antimikrobiálních látek, je nutné difúzní test modifikovat a kombinovat ošetření katalázou + NaOH, katalázou + proteinázou K a NaOH +

proteinázou K. Více antimikrobiálních látek v dostatečné koncentraci (vytvoření inhibiční zóny) bylo detegováno u kmenů RL7 a RL14. Tyto kmeny produkovaly antimikrobiální substance citlivé k proteolytickým enzymům a ke kataláze. Lze tedy usuzovat, že na antimikrobiální aktivitě se podílí více antimikrobiálních substancí, což je v souladu s informacemi uváděnými v literatuře (Dimitonova a kol. 2007). Citlivost antimikrobiálních substancí ke kataláze značí produkci peroxidu vodíku. Kmeny produkující peroxid vodíku jsou často využívány k potlačení nežádoucích bakteriálních kmenů ve vagině žen (Dasari a kol. 2014). Kmen RL7 byl identifikován jako *L. vaginalis* (kapitola 5.1.3), tedy jako druh, u kterého je produkce peroxidu vodíku známá (Dimitonova a kol. 2007).

V agarovém kapkovém testu produkoval kmen RL15-P antimikrobiální látky citlivé k proteolytickým enzymům a účinné proti *St. aureus* IM 353, *En. faecalis* IM 435 a *En. faecalis* IM 436. Produkce antimikrobiálních bílkovinných substancí však nebyla potvrzena v agarovém difuzním testu.

V agarovém difuzním testu nebyl detegován inhibiční účinek vůči kmenům z jiných rodů, než je rod *Lactobacillus*. Bylo tím potvrzeno, že inhibice způsobená antimikrobiálními bílkovinnými látkami je nejčastější vůči blízké příbuzným bakteriálním rodům a druhům.

### **5.2.3 Charakterizace antimikrobiálních látek bílkovinného původu**

Supernatanty 7 kmenů, u kterých byla v našich podmínkách prokázána produkce antimikrobiálních bílkovinných látek (Tabulka 22), byly testovány za různých teplot, pH a za přítomnosti vybraných detergentů a EDTA. Byl sledován vliv na inhibiční vlastnosti.

#### **5.2.3.1 Vliv teploty na antimikrobiální vlastnosti supernatantu**

Uspořádání experimentů je uvedeno v kapitole 4.2.8.4. Pro zjištění aktivity supernatantů ošetřených teplotou byly použity následující indikátorové kmeny: *L. delbrueckii* IM 349, *L. delbrueckii* IM 348, *L. sakei* IM 398, *L. sakei* 10/1, *L. gasseri* IM 340, *L. fermentum* IM 351. Před testem byly supernatanty testovaných kmenů neutralizovány 1 M NaOH a ošetřeny katalázou. Takto upravené supernatanty byly vystaveny testovaným teplotám. Výsledky pro jednotlivé indikátorové kmeny jsou uvedeny v Tabulce 23 (A-F). Na Obr. 13 je pro ilustraci uvedena Petriho miska s testem vlivu teploty na antimikrobiální vlastnosti supernatantu. Kromě teploty mělo vliv na inhibici také použití různých indikátorových kmenů.

**Tabulka 23A: Vliv teploty na antimikrobiální vlastnosti supernatantu - Indikátorový kmen *L. delbrueckii* IM 349**

Testovaný kmen	Teplota/čas							Kontrola (neošetřeno)
	121°C / 15 minut	80°C / 60 minut	50°C / 60 minut	37°C / 60 minut	5°C / týden	-21°C / týden	-70°C / týden	
RL2-P	+	+	+	+	+	+	+	+
RL15-P	-	-	-	+/-	+	+	+	+
RL22-P	+	+	+	+	+	+	+	+
RL26-P	-	-	-	+	+	+	+	+
RL2	+	+	+	+	+	+	+	+
RL7	-	-	-	+	+	+	+	+
RL14	-	-	+	+	+	+	+	+

+ inhibiční zóna detegována; - inhibiční zóna nebyla detegována; +/- byla detegována menší inhibiční zóna než u kontroly; ++ byla detegována větší inhibiční zóna než u kontroly

**Tabulka 23B: Indikátorový kmen *L. delbrueckii* IM 348**

Testovaný kmen	Teplota /čas							Kontrola (neošetřeno)
	121°C / 15 minut	80°C / 60 minut	50°C / 60 minut	37°C / 60 minut	5°C / týden	-21°C / týden	-70°C / týden	
RL2-P	-	+	+	+	++	-	-	+
RL15-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL22-P	+/-	+	+	+	+	+	+	+
RL26-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL2	-	+	+	+	+	+	+	+
RL7	-	+	+	+	++	+/-	+	+
RL14	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabulka 23C: Indikátorový kmen *L. sakei* IM 398**

Testovaný kmen	Teplota /čas							Kontrola (neošetřeno)
	121°C / 15 minut	80°C / 60 minut	50°C / 60 minut	37°C / 60 minut	5°C / týden	-21°C / týden	-70°C / týden	
RL2-P	+/-	+	+	+	+	+	+	+
RL15-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL22-P	+	+	+	+	+	+	+	+
RL26-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL2	+/-	+	+	+	+	+	+	+
RL7	-	-	-	-	-	-	-	-
RL14	-	-	-	-	-	-	-	-



**Tabulka 23D: Indikátorový kmen *L. gasseri* IM 340**

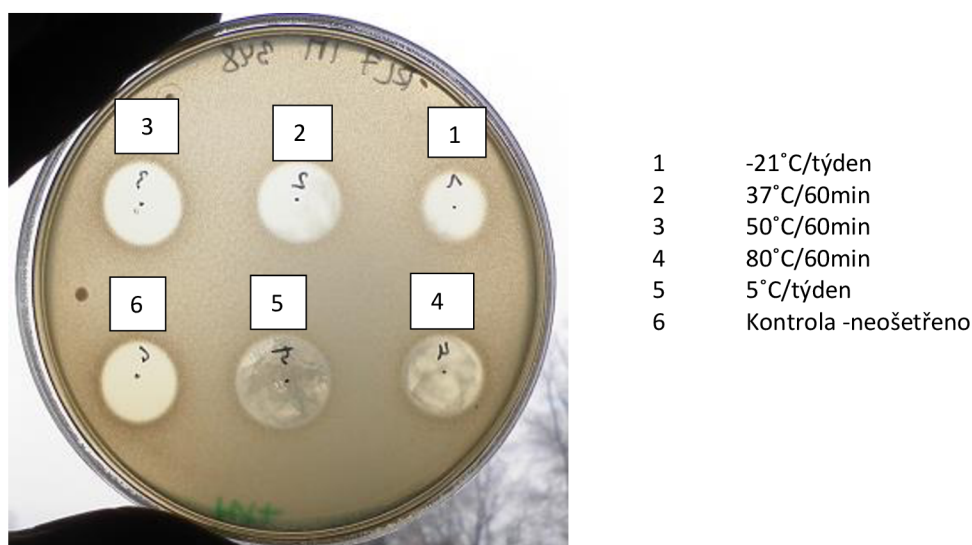
Testovaný kmen	Teplota /čas							Kontrola (neošetřeno)
	121°C/ 15 minut	80°C/ 60 minut	50°C/ 60 minut	37°C/ 60 minut	5°C/ týden	-21°C/ týden	-70°C/ týden	
RL2-P	-	+	+	+	+	+	+	+
RL15-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL22-P	-	+	+	+	+	+	+	+
RL26-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL2	-	+	+	+	+	+	+	+
RL7	-	+	+	+	+	+	+	+
RL14	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabulka 23E : Indikátorový kmen *L. fermentum* IM 351**

Testovaný kmen	Teplota /čas							Kontrola (neošetřeno)
	121°C/ 15 minut	80°C/ 60 minut	50°C/ 60 minut	37°C/ 60 minut	5°C/ týden	-21°C/ týden	-70°C/ týden	
RL2-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL15-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL22-P	-	+	+	+	+	+	+	+
RL26-P	-	-	-	-	-	-	-	-
RL2	-	-	-	-	-	-	-	-
RL7	-	-	-	-	-	-	-	-
RL14	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabulka 23F: Indikátorový kmen *L. sakei* 10/1**

Testovaný kmen	Teplota /čas							Kontrola (neošetřeno)
	121°C/ 15 minut	80°C/ 60 minut	50°C/ 60 minut	37°C/ 60 minut	5°C/ týden	-21°C/ týden	-70°C/ týden	
RL2-P	-	+	+	+	+	+	+	+
RL15-P	-	-	-	+/-	+	+	+	+
RL22-P	-	+	+	+	+	+	+	+
RL26-P	-	-	-	+	+	+	+	+
RL2	+	+	+	+	+	+	+	+
RL7	-	-	-	+	+	+	+	+
RL14	-	-	+	+	+	+	+	+



**Obr. 13: Agarový difúzní test se supernatanty ošetřenými teplotou** Jako testovaný kmen použit *L. vaginalis* RL7; Indikátorový kmen *L. delbrueckii* IM 348

Z testovaných kmenů byly nejodolnější k vysoké teplotě 3 kmeny – RL2-P, RL22-P a RL2, které produkovaly antimikrobiální bílkovinné látky, které byly teplotně stabilní a neztratily antimikrobiální aktivitu při teplotě 80°C/60 minut a v některých případech ani při teplotě 121°C/15 minut. V literatuře (Drider a kol. 2006; Ghanbari a kol. 2013) byla u kmenů *Lactobacillus* sp. popsána produkce teplotně stabilních antimikrobiálních látek bílkovinného původu (bakteriocinů nebo bakteriocinům podobných substancí). Některé kmeny rodu *Lactobacillus* produkuje teplotně odolné antimikrobiální látky bílkovinného původu, které neztrácejí inhibiční vlastnosti i při působení teploty 130°C/90 minut (Mkrtchyan a kol. 2010).

Kmeny RL2-P, RL22-P a RL2 byly vybrány pro další testy. Ze souboru indikátorových kmenů byly nejcitlivější kmeny *L. sakei* IM398, *L. sakei* 10/1, *L. delbrueckii* IM348 a *L. delbrueckii* IM349.

#### 5.2.3.2 Vliv pH na antimikrobiální vlastnosti supernatantů

Vliv pH na antimikrobiální vlastnosti supernatantů byl testován u kmenů RL2-P, RL22-P a RL2. Supernatanty byly ošetřeny 1 M NaOH, katalázou a sterilizovány filtrací (0,2µm CA Membrane). Podmínky experimentu jsou uvedeny v kapitole 4.2.8.4.

Pro test byly zvoleny tři indikátorové kmeny (*L. delbrueckii* IM349, *L. sakei* IM398 a *L. sakei* 10/1), které byly v dřívějších pokusech velmi citlivé k antimikrobiálním látkám produkovaným kmeny RL2-P, RL22-P a RL2. Test byl proveden dvakrát, výsledky jsou uvedeny v Tabulce 24.

**Tabulka 24: Vliv pH na inhibiční účinky supernatantů**

Testovaný kmen	pH	Indikátorový kmen		
		<i>L. debrueckii</i> IM 349	<i>L. sakei</i> IM 398	<i>L. sakei</i> 10/1
RL2-P	2	-	-	-
	4	+	+	+
	7,5	+	+	+
	10	-	-	-
	Kontrola (neošetřeno)	+	+	+
RL22-P	2	-	-	-
	4	+	+/-	+
	7,5	+	+	+
	10	-	+	+
	Kontrola (neošetřeno)	+	+	+
RL2	2	-	-	-
	4	+	+	+
	7,5	+	+	+
	10	+	-	-
	Kontrola (neošetřeno)	+	+	+

+inhibiční zóna detegována; - inhibiční zóna nebyla detegována; +/- detegována menší inhibiční zóna než u kontroly

Detekce inhibičních zón se lišila podle pH supernatantů testovaných kmenů i podle indikátorových kmenů. V případě kontrolních supernatantů byla vždy detegována inhibiční zóna. U supernatantů všech kmenů ošetřených na pH 2 nebyly detegovány inhibiční zóny a došlo ke ztrátě antimikrobiální aktivity. Při pH 4 a pH 7,5 nedochází ke ztrátě antimikrobiální aktivity ani u jednoho testovaného kmene. Supernatant kmene RL2 vystavený pH 10 ztratil antimikrobiální aktivitu. Naopak u supernatantů kmenů RL22-P a RL2 ošetřených na pH 10 byly inhibiční zóny detegovány. V literatuře byla popsána tolerance bakteriocinů a bakteriocinům podobných substancí ke kyselému pH (Yang a kol. 1992) i k pH nad 7 (Ghanbari a kol. 2013). Mkrtychyan a kol. 2010 uvádí, že antimikrobiální látky bílkovinného původu jsou stabilní při pH do 6,5. Nad tuto hodnotu je inhibiční aktivita redukována. Naproti tomu Ghanbari a kol. 2013 udává, že aktivita antimikrobiálních bílkovinných látek je vysoká i po vystavení od pH3 do pH10. Tyto poznatky se shodují s výsledky v této práci, kdy byla antimikrobiální aktivita bílkovinných látek v supernatantu u kmenů RL22-P a RL2 detegována i po vystavení pH 10.

### 5.2.3.3 Vliv působení detergentů a EDTA na antimikrobiální vlastnosti supernatantu

Dalším testem, kterému byly vystaveny supernatanty, bylo zhodnocení vlivu detergentů a EDTA na antimikrobiální vlastnosti. Ošetřený supernatant byl vystaven působení EDTA a detergentů SDS a Tween 20. Podmínky experimentu jsou podrobně popsány v kapitole 4.2.8.4.

Jako indikátorové kmeny byly použity *L. delbrueckii* IM 349, *L. sakei* IM 398 a *L. sakei* 10/1. Jako kontrola byly použity supernatanty bez EDTA nebo detergentu. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 25.

**Tabulka 25: Testování vlivu působení detergentů a EDTA na inhibiční účinky supernatantů**

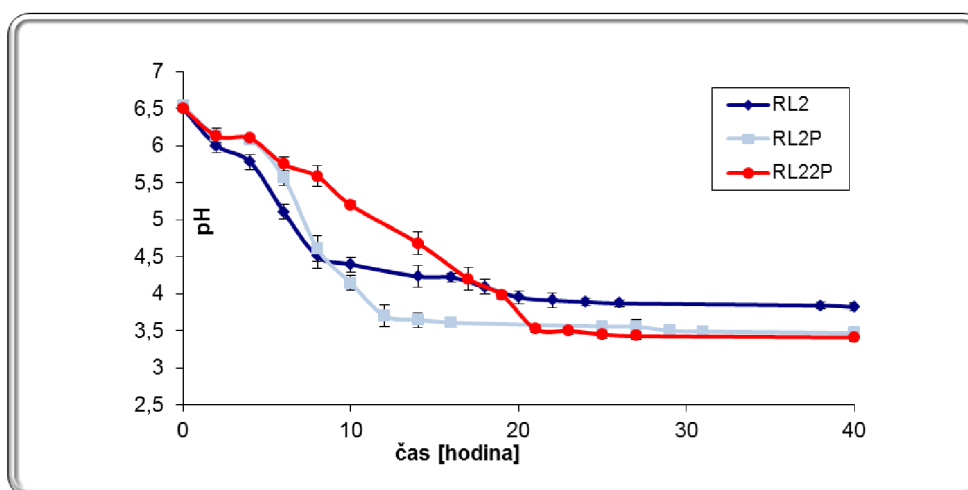
Testovaný kmen	Ošetření	Indikátorový kmen		
		<i>L. delbrueckii</i> IM 349	<i>L. sakei</i> IM 398	<i>L. sakei</i> 10/1
RL2-P	10% SDS	+	-	-
	20% SDS	+	-	-
	0,5 M EDTA	+	+	+
	1% Tween 20	+	+	+
	kontrola	+	+	+
RL22-P	10% SDS	+	-	-
	20% SDS	+	-	-
	0,5 M EDTA	+	+	+
	1% Tween 20	+	+	+
	kontrola	+	+	+
RL2	10% SDS	+	+/-	-
	20% SDS	+/-	+/-	-
	0,5 M EDTA	+	+	+
	1% Tween 20	+	+	+
	kontrola	+	+	+

+inhibiční zóna detegována; +/- inhibiční zóna detegována slabě; - inhibiční zóna nebyla detegována

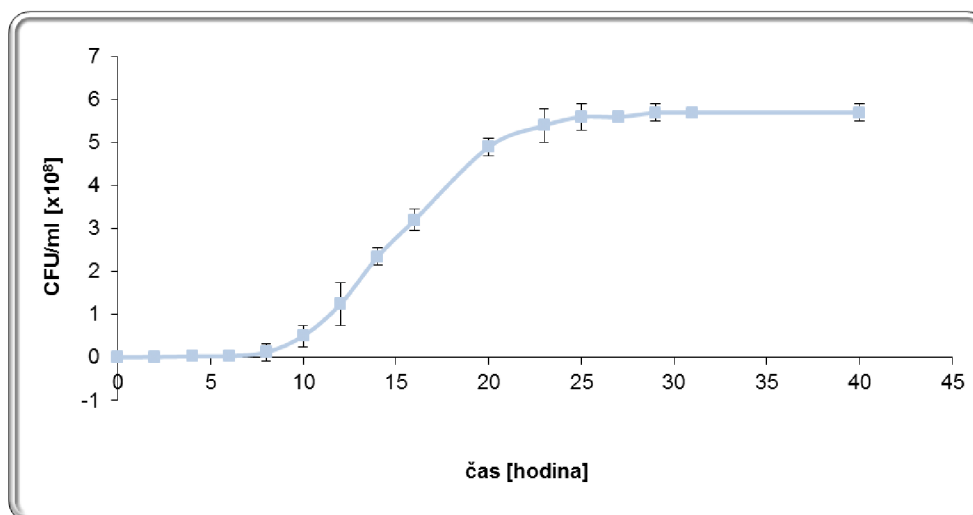
Z výsledků testu vlivu detergentů a EDTA na antimikrobiální účinky supernatantů je patrné, že antimikrobiální vlastnosti supernatantů zůstávají nezměněny při působení 0,5 M EDTA a 1% Tween 20. V případě použití 10% a 20% detergentu SDS došlo některých případech ke ztrátě antimikrobiální aktivity (Tabulka 25). Dodecylsulfát sodný je iontová povrchově aktivní látka amfifilního charakteru, která má vliv na povrch buněk a dělá je citlivými k hydrofobním peptidům, jako jsou bakteriociny. Na druhou stranu je detergent SDS znám také tím, že rozbaluje proteiny a tím ovlivňuje jejich konformaci. Může tak ovlivňovat antimikrobiální vlastnosti bílkovinných látek v supernatantu, které mohou ztratit své antimikrobiální vlastnosti (Castellano a kol. 2011).

### 5.2.4 Stanovení produkce antimikrobiálních látek v supernatantech v průběhu růstu kmenů

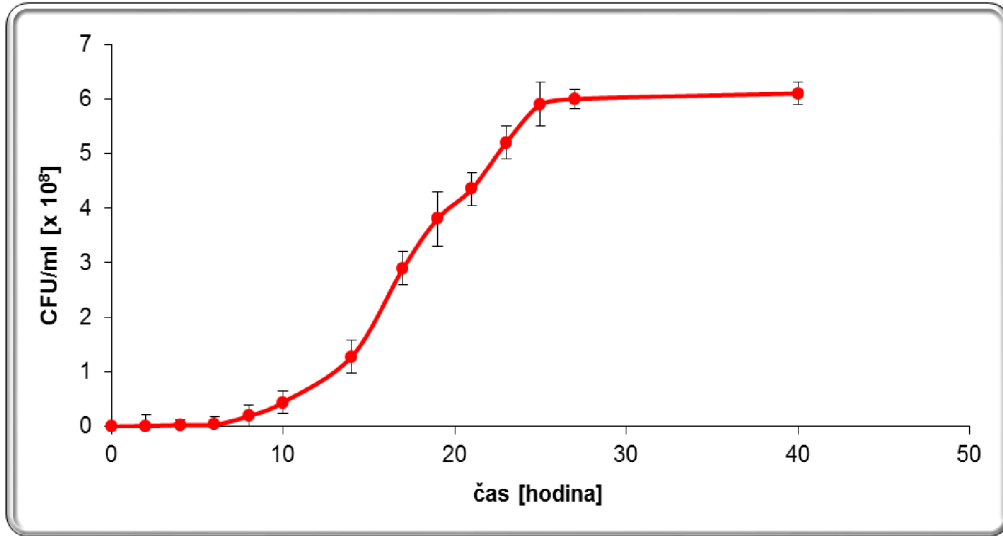
Během růstu tří kmenů RL2-P, RL22-P a RL2 (kapitola 4.2.8.5) byly odebrány alikvoty, ze kterých byly připraveny supernatanty a změřeny hodnoty pH. Supernatanty byly ošetřeny a použity pro agarový difuzní test (kapitola 4.2.8.3). Výsledné grafy poklesu pH a růstových křivek (CFU/ml) v závislosti na čase jsou uvedeny na Obr. 14 a 15 A-C. Výsledky agarového difuzního testu se supernatanty jsou uvedeny v Tabulkách 26, 27 a 28.



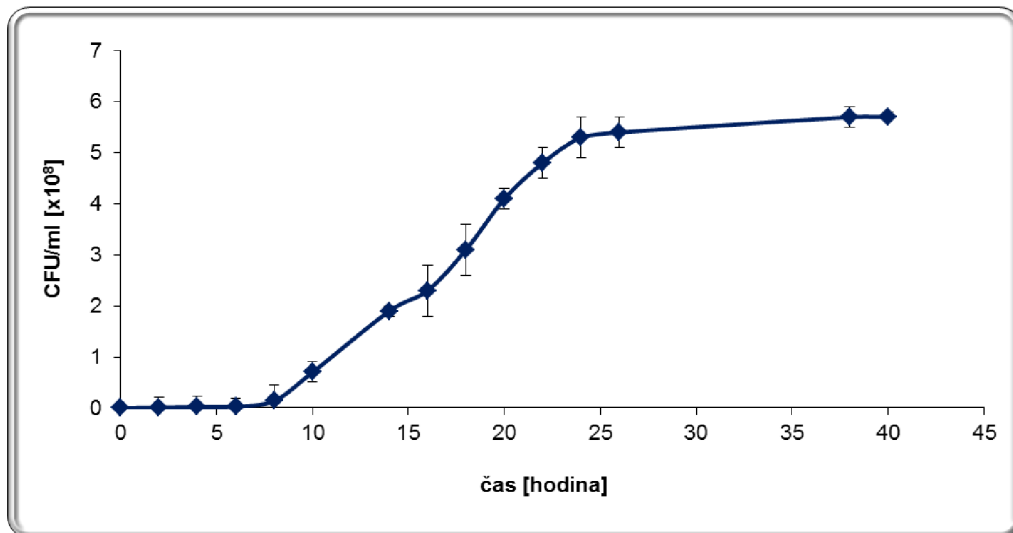
Obr. 14: Změna pH supernatantů kmenů RL2P, RL22P a RL2 v průběhu kultivace



Obr. 15A: Růstová křivka kmene RL2-P



**Obr. 15B: Růstová křivka kmene RL22-P**



**Obr. 15C: Růstová křivka kmene RL2**

**Tabulka 26: Produkce antimikrobiálních látek v supernatantu kmene RL2-P v průběhu růstu**

Odběr (hod)	Indikátorový kmen/ošetření supernatantu					
	<i>L. delbrueckii</i> IM 349		<i>L. sakei</i> 10/1		<i>L. sakei</i> IM 398	
	NaOH, K, P	NaOH, K	NaOH, K, P	NaOH, K	NaOH, K, P	NaOH, K
0	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+/-	-	+/-
10	-	+	-	+	-	+
12	-	+	-	+	-	+
14	-	+	-	+	-	+
16	-	+	-	+	-	+
18	-	+	-	+	-	+
25	-	+	-	+	-	+
27	-	+	-	+	-	+
29	-	+	-	+	-	+
31	-	+	-	+	-	+
40	-	+	-	+	-	+

+ detekce inhibiční zóny; +/- slabá, malá, nejasná inhibiční zóna; - inhibiční zóna nebyla detegována; P proteináza K; K kataláza

**Tabulka 27: Produkce antimikrobiálních látek v supernatantu kmene RL22-P**

Odběr (hod)	Indikátorový kmen/ošetření supernatantu					
	<i>L. delbrueckii</i> IM 349		<i>L. sakei</i> 10/1		<i>L. sakei</i> IM 398	
	NaOH, K, P	NaOH, K	NaOH, K, P	NaOH, K	NaOH, K, P	NaOH, K
0	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	+/-
10	-	+	-	+	-	+
14	-	+	-	+	-	+
17	-	+	-	+	-	+
19	-	+	-	+	-	+
21	-	+	-	+	-	+
23	-	+	-	+	-	+
25	-	+	-	+	-	+
27	-	+	-	+	-	+
40	-	+	-	+	-	+

+detekce inhibiční zóny; +/- slabá, malá, nejasná inhibiční zóna; - inhibiční zóna nebyla detegována; P proteináza K; K kataláza

**Tabulka 28: Produkce antimikrobiálních látek v supernatantu kmene RL2**

Odběr (hod)	Indikátorový kmen/ošetření supernatantu					
	<i>L. delbrueckii</i> IM 349		<i>L. sakei</i> 10/1		<i>L. sakei</i> IM 398	
	NaOH, K, P	NaOH, K	NaOH, K, P	NaOH, K	NaOH, K, P	NaOH, K
0	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	+	-	+
14	-	+	-	+	-	+
16	-	+	-	+	-	+
18	-	+	-	+	-	+
20	-	+	-	+	-	+
22	-	+	-	+	-	+
24	-	+	-	+	-	+
26	-	+	-	+	-	+
38	-	+	-	+	-	+
40	-	+	-	+	-	+

+ detekce inhibiční zóny; -inhibiční zóna nebyla detegována; P proteináza K; K kataláza

U kmene RL2-P byla detegována produkce antimikrobiálních bílkovinných substancí po osmi nebo deseti hodinách kultivace v závislosti na indikátorovém kmeni. U kmene RL22-P byla detegována produkce antimikrobiálních bílkovinných substancí od osmé až desáté hodiny kultivace. U kmene RL2 byla detegována produkce antimikrobiálních bílkovinných látek, které inhibovaly indikátorové kmeny od desáté hodiny kultivace.

Udává se, že v porovnání s produkcí dalších antimikrobiálních látek (především kyseliny mléčné) je produkce antimikrobiálních látek bílkovinné povahy detegována až v pozdějších hodinách kultivace. Detekce produkce antimikrobiálních bílkovinných látek v pozdějších hodinách může být způsobena fází růstového cyklu kmenů, ve které jsou antimikrobiální látky bílkovinného původu produkovány. Fáze růstového cyklu buněk, ve které jsou bakteriociny produkovány, se liší mezi kmeny i samotnými bakteriociny. Bylo zjištěno, že některé bakteriociny rodu *Lactobacillus* mohou být produkovány na počátku exponenciální fáze, během exponenciální fáze, během stacionární fáze růstu i v pozdní stacionární fázi růstu (Pringsulaka a kol. 2012, Castro a kol. 2011, Jiang a kol. 2012).

### 5.2.5 Diluční test

S cílem stanovit množství antimikrobiálních látek v supernatantech a v zakoncentrovaných supernatantech byl proveden diluční test. Supernatanty přes noc narostlých testovaných kmenů RL2-P, RL22-P a RL2 byly ošetřeny (5 M NaOH a katalázou) a vyředěny desítkovým ředěním (viz kapitola 4.2.8.6). Poté byl proveden agarový difuzní test (kapitola 4.2.8.3). Jako indikátorové



kmeny byly použity *L. sakei* 10/1, *L. delbrueckii* IM 349, *L. sakei* IM 398. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 29.

**Tabulka 29: Agarový difuzní test s ředěnými supernatanty**

Testovaný kmen	Ředění supernatantu	Indikátorový kmen/inhibiční zóna		
		<i>L. sakei</i> 10/1	<i>L. delbrueckii</i> IM 349	<i>L. sakei</i> IM 398
RL2-P	neředěný	+	+	+
	10 x	+/-	-	-
	100x	-	-	-
	1000x	-	-	-
RL22-P	neředěný	+	+	+
	10x	+	-	-
	100x	-	-	-
	1000x	-	-	-
RL2	neředěný	+	+	+
	10x	+	-	-
	100x	-	-	-
	1000x	-	-	-

+ detekce inhibiční zóny; - inhibiční zóna nebyla detegována; +/- slabá, malá, nejasná inhibiční zóna

Inhibiční zóny byly detegovány u všech tří neředěných supernatantů. Pokud byl supernatant zředěn 10x byly inhibiční zóny detegovány pouze při použití indikátorového kmene *L. sakei* 10/1. V dilučním testu byly prokázány nízké koncentrace antimikrobiálních bílkovinných látek. Pro případné další použití by bylo vhodné supernatanty zakonzentrovat např. síranem amonným (Todorov a kol. 2004).

### 5.2.6 Skríning přítomnosti genů pro produkci bakteriocinů pomocí DNA/DNA hybridizace a PCR

Kmeny RL2-P a RL2 byly identifikovány do druhu *L. gasseri/johnsonii* a kmen RL22-P do druhu *L. gasseri*, a proto byla DNA uvedených kmenů amplifikována s primery pro produkci bakteriocinů, které byly nalezeny u kmenů skupiny *L. acidophilus* – gassericinu K7A, gassericinu K7B, acidocinu A, acidocinu B, gassericinu T, gassericinu A a laktacinu F (kapitola 4.2.4.6). Přítomnost genů pro produkci bakteriocinů byla sledována u všech kmenů z Tabulky 3. Specifické produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 30.

**Tabulka 30: Skríning přítomnosti genů pro produkci bakteriocinů pomocí PCR a DNA/DNA hybridizace\***

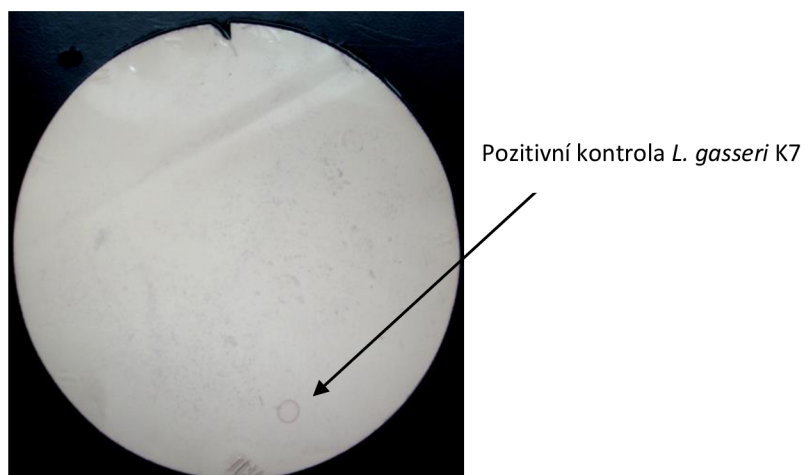
Kmen	Laktacin F		Gassericin K7A		Gassericin K7B		Acidocin A	Acidocin B	Gassericin T	Gassericin A
	PCR	Hybridizace	PCR	Hybridizace	PCR	Hybridizace	PCR	PCR	PCR	PCR
RL1-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL2-P	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
RL3-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL4-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL4-bile7-5A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL4-bile7-5B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL5-P	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
RL6-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL7-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL8-P	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
RL9-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL10-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL10-bile7-5A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL10-bile7-5B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RL11-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL12-PA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL12-PB	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
RL13-P	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RL13-57L3-7AP	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RL13-57L3-8AP	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RL14-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL15-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL16-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL17-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL18-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL19-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL20-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL21-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL22-P	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
RL23-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL24-P	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RL25-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL26-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL27-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL27-VGA-7A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL28-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL29-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL30-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
RL3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kmen	Laktacin F		Gassericin K7A		Gassericin K7B		Acidocin A	Acidocin B	Gassericin T	Gassericin A
	PCR	Hybridizace	PCR	Hybridizace	PCR	Hybridizace	PCR	PCR	PCR	PCR
RL8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL13	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RL14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RL22	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
CCDM 83/00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCDM 148/00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCDM 154/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCDM 158/00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCDM 821/00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCDM 963/00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LOCK 0900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LOCK 0908	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LOCK 0919	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

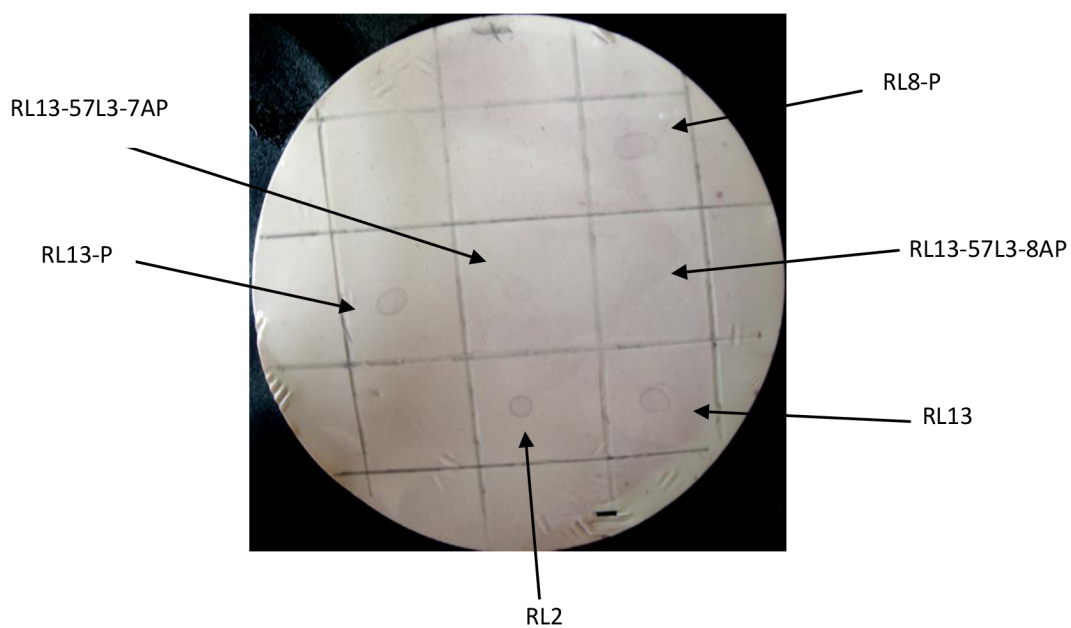
+ specifický PCR produkt detekován/hybridizační produkt detekován; - specifický PCR produkt nebyl detekován/hybridizační produkt nebyl detekován; \* v Tabulce jsou uvedeny výsledky za použití vyšší stringence

Podle předpokladu specifické produkty PCR byly detegovány u kmenů, které byly identifikovány do druhů *L. gasseri*, *L. johnsonii* nebo *L. gasseri/johnsonii*. Výjimkou byly kmeny *L. paracasei* RL10-bile7-5B a *L. fermentum* RL12-PB u kterých byly detegovány specifické produkty PCR pro gassericin T (RL10-bile7-5B) a gassericin K7B (RL12-PB). Antimikrobiální aktivita způsobená bílkovinnými substancemi však nebyla u těchto kmenů detegována (viz výsledky agarového kapkového testu Tabulka 20 a Tabulka 21).

Pro potvrzení přítomnosti sekvencí nukleotidů komplementárních k amplifikovaným úsekům pomocí primerů pro produkci bakteriocinů byla provedena DNA/DNA hybridizace s různou stringencí (kapitola 4.2.7). Jako pozitivní kontroly byly použity kmeny produkující gassericin K7A (*L. gasseri* K7), gassericin K7B (*L. gasseri* K7) a laktacin F (*L. johnsonii* CCM 2935). Z těchto kmenů byly připraveny DNA sondy. Výsledky DNA/DNA hybridizace při vyšší stringenci jsou shrnuty v Tabulce 30. Příklady DNA/DNA hybridizací provedených pomocí kapek se sondou DNA pro gassericin K7A jsou uvedeny na Obr. 16 a Obr. 17.



**Obr. 16: DNA/DNA hybridizace s vyšší stringencí**  
DNA sonda připravena z kmene *L. gasseri* K7 pomocí primerů LFA185/268



**Obr. 17: DNA/DNA hybridizace s vyšší stringencí**  
DNA sonda připravena z kmene *L. gasseri* K7 pomocí primerů LFA185/268

DNA/DNA hybridizace byla provedena pro tři bakteriociny – gassericin K7A, gassericin K7B a laktacin F, protože pro další bakteriociny nebyly dostupné pozitivní kontroly a nebylo tak možno připravit značené DNA sondy. Výsledky dosažené pomocí PCR se specifickými primery byly potvrzeny pomocí DNA/DNA hybridizace s vyšší stringencí. Při použití nižší stringence byly detegovány pozitivní výsledky i s DNA kmenů, u kterých nebyl detegován specifický produkt PCR. Výjimkou byl kmen RL24-P, u kterého byl detegován specifický produkt PCR, který však nebyl potvrzen DNA/DNA hybridizací s vyšší stringencí. Potvrzen byl pouze DNA/DNA hybridizací s nízkou stringencí.

Specifické produkty PCR získané pomocí primerů LFA185/268 pro gassericin K7A (84 bp) a primerů K7B c.f. F/R pro gassericin K7B (165 bp) u kmenů RL2-P, RL22-P a RL2 byly přečištěny pomocí purifikačního kitu (Quiagen Minielute PCR purification kit) a poslány na sekvenování. Pomocí algoritmu BLAST byla nalezena vysoká podobnost sekvence produktu PCR (84 bp) získaného s primery LFA185/268 a DNA izolované z kmene RL2 se sekvencemi bakteriocinů gassericinu K7A a acidocinu LF221A (Tabulka 31). Je známo, že nukleotidová sekvence gassericinu K7A a acidocinu LF221A je 100% identická (Majhenič a kol. 2004). Vysoká podobnost byla také nalezena u sekvencí produktů PCR získaných s primery K7B c.f. F/R (165bp) a DNA izolované z kmenů RL2, RL2-P a RL22-P se sekvencemi genů bakteriocinů gassericinu K7B, gassericinu T a acidocinu LF221B (Tabulka 31). Je známo, že nukleotidová sekvence gassericinu K7B a acidocinu LF221B je 100% identická (Majhenič a kol. 2004). Gassericin K7B je homologní ke gassericinu T (Kawai a kol. 2000, Treven a kol. 2013).

**Tabulka 31: Analýza sekvencí produktů PCR pro gassericin K7A a gassericin K7B**

Kmen	Fragment genu pro produkci bakteriocinu/ produkt PCR	Podobnost s (vyhledávání v BLASTu, NCBI)	Podobnost (%)
RL2	gassericin K7A (84 bp)	1) genem pro komplementární faktor gassericinu K7A kmene <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 A a s genem pro imunitní protein gassericinu K7A 2) genem pro domnělý komplementární faktor <i>Lactobacillus gasseri</i> a s genem pro domnělý imunitní protein acidocinu LF221A	98
RL2		1) částí genového klastru gassericinu T kmene <i>Lactobacillus gasseri</i> LA158 2) genem pro domnělý komplementární protein acidocinu LF221B a s genem pro domnělý imunitní protein acidocinu LF221B 3) částí genového klastru gassericinu K7B	98
RL2-P	gassericin K7B (165 bp)	1) částí genového klastru gassericinu T kmene <i>Lactobacillus gasseri</i> LA158 2) genem pro domnělý komplementární protein acidocinu LF221B a s genem pro domnělý imunitní protein acidocinu LF221B	98
RL22-P		1) částí genového klastru gassericinu T kmene <i>Lactobacillus gasseri</i> LA158 2) genem pro domnělý komplementární protein acidocinu LF221B a s genem pro domnělý imunitní protein acidocinu LF221B	98

Sekvence produktů PCR získaných pomocí primerů K7B c. f. F/R (165 bp) po amplifikaci DNA kmenů RL2, RL2P a RL22P byly porovnány navzájem mezi sebou. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 18.

```

RL2      AMTTCAAA*GTGGAGCGMAGTCGCTGGATGGGCTCTTGGAAATGCAGTTTGCGGTCCTGCTT 60
RL2-P    AMATCAT-GTGGAGCGMAGTCGCTGGATGGGCTCTTGGAAATGCAGTTTGCGGTCCTGCTT 59
RL22-P   AKGGCRW-GTGGAGCGMAGTCGCTGGATGGGCTCTTGGAAATGCAGTTTGCGGTCCTGCTT 59
*
RL2      GTGGCTTTGTTGGAGCACACTATGTTCCAATAGCATGGGCTGGCGTAACGGCAGCTACTG 120
RL2-P    GTGGCTTTGTTGGAGCACACTATGTTCCAATAGCATGGGCTGGCGTAACGGCAGCTACTG 119
RL22-P   GTGGCTTTGTTGGAGCACACTATGTTCCAATAGCATGGGCTGGCGTAACGGCAGCTACTG 119
*****
RL2      GTGGATTCGAAAA 134
RL2-P    GTGGATTCGAAAA 133
RL22-P   GTGGATTCGAAAA 133
*****

```

**Obr. 18: Porovnání sekvencí produktů PCR získaných amplifikací DNA izolované z kmenů RL2-P, RL22-P a RL2 pomocí specifických primerů pro gassericin K7B**

Sekvence specifických produktů PCR si byly velmi podobné (Obr. 18) (stejně nukleotidy jsou označeny \*). Porovnávané sekvence se liší na počátku amplikonu v pěti nukleotidech (označeno rámečky).

Sekvenční analýza DNA kmene *L. gasseri* K7 ukázala, že genový klastr pro produkci gassericinu K7A je tvořen sekvencí o délce 1143 bp, která je složena ze tří otevřených čtecích rámců organizovaných do jedné transkripční jednotky (Obr. 3). Specifický produkt PCR o velikosti 84bp byl detekován také u kmenů, které měly pouze část genového klastru pro gassericin K7A (Treven a kol. 2013).

Geny pro produkci gassericinu K7B jsou organizovány také do jedné transkripční jednotky (3276 bp), která se skládá z šesti otevřených čtecích rámců (Obr. 4). Amplifikace DNA s primery K7B c. f. R/F a detekce specifického produktu PCR o velikosti 165bp není určující pro produkci gassericinu K7B. Bylo prokázáno, že i přes detekci specifického produktu PCR o velikosti 165bp, byly v DNA testovaných kmenů neúplné nukleotidové sekvence genu pro gassericin K7B (Trevena kol. 2013).

Pro funkční bakteriocin je potřeba, aby byl přepsán celý operon a byly syntetizovány všechny proteiny potřebné k inhibičnímu účinku. Přítomnost nekompletních genů gassericinu K7A a gassericinu K7B byla prokázána v mnoha genomech laktobacilů stejně jako u dalších mikroorganismů v lidském gastrointestinálním traktu (Treven a kol. 2013).

### 5.2.7. **Skríning DNA kmenů na přítomnost genetických determinant genových klastrů**

Pro detekci přítomnosti genetických determinant genových klastrů pro gassericin K7A a gassericin K7B v DNA izolované z kmenů RL2, RL2-P a RL22-P byly použity primery uvedené v článku Treven a kol. 2013 (kapitola 4.2.4.7), které byly odvozeny z DNA probiotického kmene *L. gasseri* K7. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 32. Kompletní geny gassericinu K7A a gassericinu K7B jsou uvedeny na Obr. 3 a Obr. 4.

**Tabulka 32: Skríning DNA kmenů na přítomnost genetických determinant genových klastrů**

Kmen	Gassericin K7A/primery/produkt PCR			Gassericin K7B/primery/produkt PCR		
	Komplementární peptid	Aktivní peptid	Imunitní protein	Komplementární peptid	Aktivní peptid	Imunitní protein
	GasA_1F/R	GasA_2F/R	GasA_3F/R	GasB_3F/R	GasB_4F/R	GasB_5F/R
RL2	+	+	+	+*	+	+
RL2-P	-	-	-	+*	+	+
RL22-P	-	-	-	+*	+	+
K7	+	+	+	+*	+	+

+ specifický PCR produkt detegován; - specifický PCR produkt nebyl detegován; \* specifický PCR produkt detegován, ale nesequenován

Z výsledků uvedených v Tabulce 32 je patrné, že v DNA izolované z kmene RL2 jsou přítomny geny pro komplementární peptid, aktivní peptid a imunitní protein pro gassericin K7A. V DNA všech testovaných kmenů RL2, RL2-P a RL22-P jsou geny pro komplementární peptid, aktivní peptid a imunitní protein pro gassericin K7B. Získané specifické produkty PCR byly přečištěny a sekvenovány. Sekvence nukleotidů pro komplementární peptid pro gassericin K7B (primery GasB\_3R/F) nebyly získány kvůli velmi nízkému množství produktu PCR po přečištění kitem. Sekvence nukleotidů byly analyzovány pomocí algoritmu BLAST a databáze GeneBank. Z databáze byly staženy sekvence celých genů nebo klastru genů pro produkci bakteriocinů – gassericinu K7A, gassericinu K7B, gassericinu T, acidocinu LF221A a acidocinu LF221B.

S použitím programu Clustal W2 bylo provedeno porovnání sekvencí pro genový klaster gassericin K7A a acidocin LF221A se sekvencemi produktů PCR získaných amplifikací DNA z kmene RL2 pomocí primerů GasA1F/R, GasA2F/R a GasA3F/R. Z mnohonásobného přiřazení sekvencí nukleotidů vyplynulo, že při použití primerů GasA1F/R a GasA3/R jsou sekvence produktů PCR přerušeny úseky o délce 14 nukleotidů respektive 11 nukleotidů. V těchto úsecích nebyly shody v nukleotidech mezi sekvencemi z databáze a sekvencemi analyzovaných produktů PCR. Nukleotidová sekvence získaná amplifikací DNA kmene RL2 a primerů Gas2F/R byla 100% shodná se sekvencemi pro úseky genového klastru gassericinu K7A a acidocinu LF221A (Příloha 2).

Dále byly porovnávány sekvence pro genový klaster gassericinu K7B se sekvencemi produktů PCR, získaných amplifikací DNA z kmenů RL2, RL2-P a RL22-P pomocí primerů GasB4F/R a GasB5F/R. Z mnohonásobného přiřazení sekvencí je patrné, že přiřazení nukleotidů obou produktů PCR pro všechny testované kmeny je 100% komplementární se sekvencí gassericinu K7B uloženou v databázi GeneBank, s výjimkou sekvence získané amplifikací DNA kmene RL2 a s použitím primerů GasB 5F/R, kde jeden nukleotid neodpovídal přiřazovanému nukleotidu (Příloha 2).



Dále bylo provedeno porovnání sekvencí pro gen pro produkci acidocinu LF221B se sekvencemi produktů PCR získaných amplifikací DNA kmenů RL2, RL2-P a RL22-P pomocí primerů GasB 4F/R a GasB 5F/R. Přiřazení nukleotidů obou produktů PCR pro všechny kmeny je taktéž 100% komplementární se sekvencí genu pro acidocin LF221B s výjimkou sekvence získané amplifikací DNA kmene RL2 a s použitím primerů GasB 5F/R, kde jeden nukleotid neodpovídal přiřazovanému nukleotidu (Příloha 2).

S použitím programu Clustal W2 bylo provedeno porovnání sekvence genu pro produkci gasserycinu T se sekvencemi produktů PCR získaných amplifikací DNA izolované z kmenů RL2, RL2-P a RL22-P pomocí primerů GasB4F/R a GasB5F/R. Přiřazení nukleotidů všech produktů PCR bylo pro všechny kmeny 100% komplementární se sekvencí gasserycinu T, s výjimkou sekvence získané amplifikací DNA RL2 a primerů GasB5F/R, kde jeden nukleotid neodpovídal přiřazované sekvenci.

Po amplifikaci DNA kmenů RL2-P a RL22-P pomocí primerů specifických pro vybrané geny genového klastru gasserycinu K7B a jejich analýze byla nalezena 100% shoda v sekvencích získaných specifických PCR produktů a sekvencí z databáze pro gassericin K7B, gassericin T a acidocin LF221B. Při testování produkce antimikrobiálních látek byla u kmenů RL2-P a RL22-P detegována produkce antimikrobiálních bílkovinných látek (Tabulka 20, Tabulka 21 a Tabulka 22). Nelze však s jistotou říci, že antimikrobiální látky produkované kmeny jsou gassericin K7B, gassericin T nebo acidocin LF221B. Sekvenční podobnost gassericin K7B a gasserycinu T je známa (Kawai a kol. 2000). Bylo také publikováno, že nukleotidové sekvence gasserycinu K7A jsou 100% identické se sekvencemi acidocinu LF221A a sekvence gasserycinu K7B se sekvencemi acidocinu LF221B (Majhenič a kol. 2004). Proto byly analyzované sekvence specifických produktů PCR porovnávány i s těmito sekvencemi, které jsou uvedeny v databázi GeneBank. Je zajímavé, že produkční kmeny bakteriocinu gasserycinu K7B a acidocinu LF221B – *L. gasseri* K7 a *L. gasseri* LF221 nejsou identické a liší v plazmidovém profilu, RAPD-PCR profilu, růstových charakteristikách, hladině produkce bakteriocinů a optimálních podmínkách pro růst a produkci bakteriocinů (Rogelj a Matijašić 2006).

Závěrem lze konstatovat, že tři kmeny RL2, RL2-P a RL22-P produkují antimikrobiální bílkovinné látky. V DNA izolované z kmene RL2 byla detegována přítomnost genů pro gassericin K7A a gassericin K7B. Po amplifikaci DNA tohoto kmene s použitím primerů pro jednotlivé geny genových klastrů gasserycinu K7A a gasserycinu K7B nebyla nalezena 100% shoda sekvencí specifických PCR produktů. Naproti tomu v DNA kmenů RL2-P a RL22-P byla nalezena 100% podobnost nukleotidových sekvencí PCR produktů a sekvencí genů z genových klastrů pro produkci gasserycinu K7B, gasserycinu T a acidocinu LF221B.

V rámci zahraniční stáže ve Slovinsku v laboratoři prof. I. Rogelj bylo spolupracováno při analýzách DNA kmenů skupiny *L. acidophilus* na přítomnost genů pro produkci bakteriocinů gassericinu K7A a gassericinu K7B. Výsledky byly publikovány v práci Treven P., Turková K., Trmčič A., Obermajer T., Rogelj I., Matijašič B. B. (2013): *Detection and quantification of probiotic strain Lactobacillus gasseri K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. Folia Microbiol. 58: 623-630.* Plný text článku je uveden v Příloze 3.

### 5.3 Stanovení vybraných probiotických vlastností

Bylo charakterizováno jedenáct kmenů rodu *Lactobacillus* patřících do skupiny druhů *L. acidophilus* (Tabulka 2) s cílem vybrat kmeny s probiotickými vlastnostmi. Tyto kmeny byly testovány na přežití v gastrointestinálním traktu, produkci antimikrobiálních látek a kompetici o vazebná místa na Caco-2 buňkách s netoxigenním kmenem *Escherichia coli* O157:H7. Následuje stručné shrnutí výsledků, které byly publikovány formou článku (Příloha 4).

Životnost probiotických kmenů je nejčastěji ovlivňována kyselým prostředím žaludku a přítomností žluči ve dvanáctníku. Udává se, že kyselost prostředí je hlavním faktorem ovlivňujícím viabilitu kmenů rodu *Lactobacillus* (Mainville a kol. 2005). Proto byly testované kmeny inkubovány v živných mediích s upraveným pH, přidavkem enzymů a v přítomnosti žlučových solí. Následná kultivace na pevných médiích umožnila stanovit počty buněk (CFU/ml) (kapitola 4. 2. 10).

Ze souboru testovaných kmenů byl u všech kmenů s výjimkou tří (*L. gasseri* CCDM 335, *L. helveticus* CCDM 81 a *L. helveticus* CCM 82) pozorován pokles počtů buněk (CFU/ml) během tříhodinové inkubace v žaludeční šťávě o pH 3,0. Žádný z testovaných kmenů nepřežil tříhodinovou kultivaci v žaludeční šťávě o pH 2,0. Takto nízkému pH však nejsou kmeny v žaludku vystaveny, protože je třeba brát v úvahu pufovací kapacitu potraviny, se kterou jsou příslušné kmeny konzumovány (Mainville a kol. 2005). Následná tříhodinová inkubace ve střevní šťávě způsobila pokles počtu buněk (CFU/ml) u všech kmenů s výjimkou *L. gasseri* CCDM 335. U některých kmenů rodu *Lactobacillus* byla popsána tolerance nebo schopnost růstu v prostředí s 0,3% roztokem žlučových solí (Jacobsen a kol. 1999, Hacin a kol. 2008). V simulovaných podmínkách gastrointestinálního traktu nejlépe přežívaly kmeny *L. acidophilus* CCDM 109, *L. gasseri* CCDM 332 a *L. gasseri* CCDM 335. Byly zjištěny rozdílné výchozí koncentrace bakteriálních kmenů, které jsou zřejmě způsobeny rozdílnou rychlostí růstu jednotlivých kmenů v MRS mediu (Pitino a kol. 2010).

V posledních letech se na téma životaschopnost probiotických kmenů a jejich probiotický efekt objevují studie, které ukazují, že zdraví prospěšný efekt nemusí být nutně vztažen na živou buňku. Byly publikovány studie, ve kterých se uvádí, že buňky inaktivované UV a oslabené teplem mají prospěšný efekt a také pozitivně ovlivňují zdraví (Lopez a kol. 2008, Kataria a kol. 2009).

Produkce antimikrobiálních látek byla testována pomocí agarového kapkového testu s připipetovanými proteolytickými enzymy za účelem zjištění bílkovinné povahy antimikrobiální látky. Produkce antimikrobiálních bílkovinných látek degradovaných proteolytickými enzymy byla detekována u všech testovaných kmenů s výjimkou *L. gasseri* CCDM 332, *L. gasseri* CCDM 335, *L. helveticus* CCDM 81 a *L. helveticus* CCDM 102.

Produkce antimikrobiálních bílkovinných látek byla detegována u 7 kmenů proti indikátorovým kmenům rodu *Lactobacillus* a *Clostridium*, ale ne proti indikátorovým kmenům

patřícím k jiným bakteriálním rodům. Z literatury je patrné, že by se mohlo jednat o bakteriociny nebo bakteriocinům podobné substance (Nespolo a Brandelli 2010).

V kompetiční studii bylo porovnáváno množství adherovaných buněk netoxigenního kmene *E. coli* O157:H7 na povrchu Caco-2 buněk v přítomnosti (koinkubaci) s vybranými kmeny rodu *Lactobacillus* (kapitola 4.2.9). Koinkubace buněk kmene *E. coli* O157:H7 s kmeny rodu *Lactobacillus* po dobu 30 minut snížila adhezi *E. coli* O157:H7 na povrch Caco-2 buněk. Významný pokles v počtu *E. coli* O157:H7 adherovaných na Caco-2 buňky byl pozorován u všech kombinací se všemi kmeny rodu *Lactobacillus*. Pokles byl kmenově specifický, což je ve shodě s výsledky uváděnými v literatuře (Jankowska a kol. 2008).

Nejvhodnější probiotické charakteristiky u testovaných CCDM kmenů (přežití v podmínkách gastrointestinálního traktu a test kompetice) byly nalezeny u kmene *L. acidophilus* CCDM 109. Nicméně *L. acidophilus* CCDM 109 inhiboval růst pouze čtyř indikátorových kmenů (produkce antimikrobiálních bílkovinných látek pouze vůči dvěma). Na druhou stranu kmen *L. gasseri* CCDM 215 a kmen *L. acidophilus* CCDM 149 nevykazovaly dobré přežití v podmínkách gastrointestinálního traktu a v kompetiční studii (v porovnání s *L. acidophilus* CCDM 109), ale produkovaly antimikrobiální substance aktivní vůči nejméně třinácti indikátorovým kmenům. Také kmen *L. helveticus* CCDM 82 produkoval antimikrobiální bílkovinné substance proti pěti indikátorovým kmenům a úspěšně inhiboval adhezi *E. coli* O157:H7 v kompetiční studii.

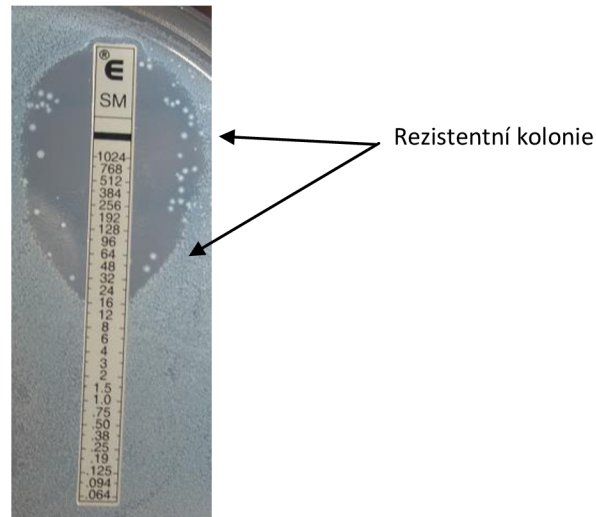
Výše uvedené experimenty byly publikovány v práci Turková K., Mavrič A., Narat M., Rittich B., Španová A., Rogelj I., Matijašić B. B.: *Evaluation of Lactobacillus strains for selected probiotic properties 2013. Folia Microbiol 58: 231-267.* – Plná verze článku je uvedena v kapitole Přílohy - Příloha 4).

### **5.3.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik**

Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik (MIC) je velmi důležité pro praktické použití probiotického kmene v potravinářském průmyslu. Pokud jsou v jejich genomu přítomny geny rezistence na určitá antibiotika, mohou se prospěšné probiotické kmeny stát zdrojem přenosu takovýchto genů do kmenů patogenních (Bernardeau a kol. 2008).

Kmeny byly testovány pomocí E-testů na rezistenci/citlivost k 10 antibiotikům (stanovení MIC) (kapitola 4. 2. 11). Jako médium byl použit 90% MH agar + 10% MRS agar. Klasicky se citlivost na antibiotika testuje pouze na MH agaru. Vzhledem k tomu, že kmeny rodu *Lactobacillus* na tomto mediu nerostou anebo je jejich růst velmi pomalý, bylo zvoleno speciální kombinované medium (MH+MRS), na kterém kmeny rodu *Lactobacillus* rostou dobře (Matijašić 2012). Nevýhodou může být skutečnost, že není dostatečně prostudována interakce antibiotik se složkami MRS agaru (Danielson a Wind 2003).

Výsledky stanovení MIC 10 antibiotik u kmenů skupiny *L. acidophilus* jsou uvedeny v Tabulce 33. Na Obr. 19, 20 a 21 jsou uvedeny příklady inhibičních zón, včetně detekce přítomnosti rezistentních kolonií (Obr. 19).

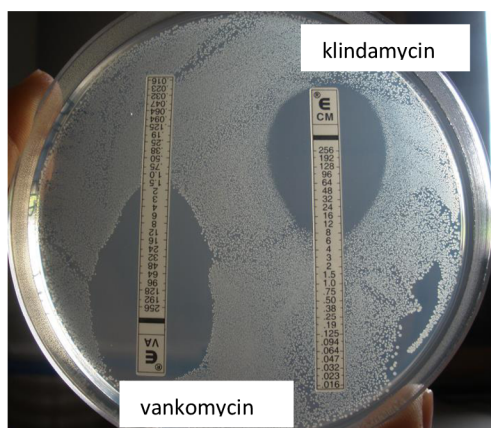


**Obr. 19: Inhibiční zóna a jednotlivé rezistentní kolonie při stanovení MIC pro streptomycin u kmene *L. gasseri* CCDM 332.**

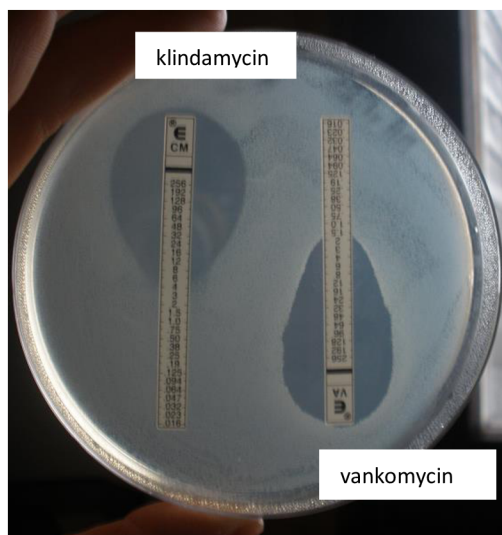
**Tabulka 33: Hodnoty MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) u vybraných antibiotik u různých druhů rodu *Lactobacillus* vyhodnocené pomocí E-testů**

Kmen/antibiotikum	SM	GM	TC	CH	MZ	CM	VA	RI	CL	EM
<i>L. acidophilus</i> CCDM 109	16	24	2	0,032	>256	4	1,5	>32	4	0,125
<i>L. acidophilus</i> CCDM 149	12	24	2	0,047	>256	4	1,5	>32	4	0,125
<i>L. gasseri</i> CCDM 377	48	48	2	0,125	>256	6	3	>32	6	0,38
<i>L. gasseri</i> CCDM 214	12	24	1,5	0,094	>256	6	2	0,094	6	0,19
<i>L. gasseri</i> CCDM 215	128	64	1,5	0,064	>256	4	2	>32	6	0,125
<i>L. gasseri</i> CCDM 332	96*	48	1,5	0,125	>256	4	1,5	>32	4	0,19
<i>L. gasseri</i> CCDM 335	128	24	1,5	0,19	>256	0,5	2	>32	6	0,5
<i>L. gasseri</i> CCDM 340	>1024	>1024	2	0,19	>256	0,25	2	>32	8	0,5
<i>L. helveticus</i> CCDM 81	96	16	2	-	>256	6	2	0,094	4	0,125
<i>L. helveticus</i> CCDM 82	96	48	2	0,064	>256	6	2	0,064	4	0,19
<i>L. helveticus</i> CCDM 92	48	16	2	-	>256	6	1,5	0,094	4	0,19
<i>L. helveticus</i> CCDM 98	48	24	2	0,094	>256	4	1,5	0,094	4	0,19
<i>L. helveticus</i> CCDM 102	48	24	1,5	0,064	>256	6	2	0,094	4	0,125

-nebylo provedeno; SM streptomycin; GM gentamicin; TC tetracyklin; CH klarithromycin; MZ metronidazol; CM klindamycin; VA vankomycin; RI rifampicin; CL chloramfenikol; EM erythromycin; \*detekce rezistentních kolonií. Odečet MIC pro jednotlivá antibiotika byl proveden dle návodu od výrobce.



**Obr. 20: Stanovení MIC pro vankomycin a klindamycin u kmene *L. helveticus* CDDM 92**



**Obr. 21: Stanovení MIC pro vankomycin a klindamycin u kmene *L. gasseri* CDDM 215**

Pro potřeby odlišení rezistentních a citlivých kmenů na dané antibiotikum, definoval FEEDAP a SCAN hraniční hodnoty koncentrací. Tyto hraniční hodnoty se liší v rámci rodů a druhů. Jako citlivé jsou považovány kmeny, jejichž MIC je menší nebo rovno hraniční koncentraci. Naopak rezistentní jsou kmeny, jejichž MIC je větší než hraniční koncentrace daného antibiotika (FEEDAP 2012).

V Tabulce 34 jsou uvedeny MIC antibiotik pro kmeny různých druhů rodu *Lactobacillus* a jejich srovnání s hodnotami pro hraniční koncentrace publikované v článkách a panelech SCAN a FEEDAP.

**Tabulka 34: Porovnání publikovaných výsledků v testech na citlivost vůči antibiotikům (stanovení MIC, µg/ml) a výsledků z testů uvedených v disertační práci**

Antibiotikum (µg/ml)	Danielson a Wind 2003	Zarazaga a kol. 1999	D'Aimmo a kol. 2007	SCAN 2003	FEEDAP 2012	Disertační práce	Rezistence/ citlivost testovaných kmenů
klarithromycin (0,016-256)	-	0,03	-	-	-	0,032 – 0,19	***
erythromycin (0,016-256)	0,5	0,125	0,1	4	1	0,125 – 0,5	CITLIVÉ
vankomycin (0,016-256)	4	4,096	0,5	4	2	1,5 – 2	CITLIVÉ
chloramfenikol (0,016-256)	4	-	8	16	4	4 – 8	REZISTENTNÍ****
klindamycin* (0,016-256)	1	-	4	-	16	4 – 6	CITLIVÉ
klindamycin** (0,016-256)	32	-	4	-	16	0,25 – 6	CITLIVÉ
rifampicin (0,016-256)	1	-	1	32	-	0,064 - >32	REZISTENTNÍ****
tetracyklin (0,016-256)	2	-	4	16	4	1,5 – 2	CITLIVÉ
gentamicin (0,064-1024)	>256	-	16	1	16	16 - >1024	REZISTENTNÍ****
streptomycin (0,064-1024)	128	-	4	16	16	12 - >1024	REZISTENTNÍ****
metronidazol (0,016-256)	>256	-	500	-	-	>256	***

-MIC neuvedena; \*platí pro druhy *L. acidophilus* a *L. johnsonii*; \*\*platí pro druh *L. gasseri*; \*\*\*hraniční hodnota MIC není uvedena v panelech FEEDAP nebo SCAN; \*\*\*\* rezistentní jsou pouze vybrané kmeny

U některých testovaných kmenů v disertační práci byla nalezena rezistence na chloramfenikol, rifampicin, gentamicin a streptomycin (Tabulka 35).

**Tabulka 35: Rezistence testovaných kmenů na chloramfenikol, rifampicin, gentamicin a streptomycin (µg/ml)**

Kmen/antibiotikum	Streptomycin	C/R*	Gentamicin	C/R*	Rifampicin	C/R**	Chloramfenikol	C/R*
<i>L. acidophilus</i> CCDM 109	16	C	24	R	>32	R	4	C
<i>L. acidophilus</i> CCDM 149	12	C	24	R	>32	R	4	C
<i>L. gasseri</i> CCDM 377	48	R	48	R	>32	R	6	R
<i>L. gasseri</i> CCDM 214	12	C	24	R	0,09	C	6	R
<i>L. gasseri</i> CCDM 215	128	R	64	R	>32	R	6	R
<i>L. gasseri</i> CCDM 332	96	R	48	R	>32	R	4	C
<i>L. gasseri</i> CCDM 335	128	R	24	R	>32	R	6	R
<i>L. gasseri</i> CCDM 340	>1024	R	>1024	R	>32	R	6	R
<i>L. helveticus</i> CCDM 81	96	R	16	C	0,09	C	4	C
<i>L. helveticus</i> CCDM 82	96	R	48	R	0,06	C	4	C
<i>L. helveticus</i> CCDM 92	48	R	16	C	0,09	C	4	C
<i>L. helveticus</i> CCDM 98	48	R	24	R	0,09	C	4	C
<i>L. helveticus</i> CCDM 102	48	R	24	R	0,09	C	4	C

C citlivý; R rezistentní; \* hraniční koncentrace publikované v panelu FEEDAP; \*\* hraniční koncentrace publikované v panelu SCAN

Z testovaných kmenů byly rezistentní ke čtyřem antibiotikům čtyři kmeny (CCDM 377, CCDM 215, CCDM 335, CCDM 340) a ke třem antibiotikům jeden kmen (CCDM 332). Zbytek kmenů byl rezistentní ke dvěma a méně testovaným antibiotikům.

Vrozené rezistence jsou typické pro všechny kmeny daného druhu a jsou obvykle nepřenosné horizontálním přenosem na jiné kmeny. Získané rezistence jsou přenosné na další kmeny a jsou tak nebezpečným zdrojem šíření rezistence na antibiotika u patogenních kmenů (FEEDAP 2012). V literatuře se uvádí, že rezistence k rifampicinu je často způsobená mutací genu lokalizovaného na chromozomu a není přenosná mezi kmeny (Ezekiel a Hutchins 1968). U námi analyzovaných kmenů byla rezistence k rifampicinu detegována u sedmi kmenů (>32μg/ml).

U kmene *L. gasseri* CCDM 340 byla detegována rezistence k vysokým koncentracím aminoglykosidů (streptomycin >1024μg/ml a gentamicin >1024μg/ml). Rezistence k vysokým koncentracím aminoglykosidů byla pozorována u většiny testovaných kmenů (streptomycin – 12-128 μg/ml, gentamicin – 16-64 μg/ml) (Tabulka 35). V literatuře bylo popsáno velké množství spontánních mutací zapříčiňujících rezistenci kmene na streptomycin, které ale nejsou přenosné mezi kmeny a tak neslouží k šíření rezistence v bakteriálním společenství (Curragh a Collins 1992).

Oba panely FEEDAP 2012 a SCAN 2003 se v některých případech rozcházejí v hraničních koncentracích. V této práci byla rezistence na chloramfenikol detegována u 5 kmenů s využitím hraničních koncentrací uvedených ve zprávě FEEDAP 2012. Naopak pokud by bylo využito hraničních koncentrací ve zprávě SCAN (2003), žádné rezistentní kmeny by nebyly detegovány (Tabulka 35). Rezistence vůči antibiotikům se liší v rámci rodu *Lactobacillus* a to podle druhů. V publikaci Danielson a Wind (2003) jsou hodnoty koncentrací u klindamycinu uváděny odděleně pro kmeny druhů *L. acidophilus*/*L. johnsonii* a *L. gasseri*. Naopak FEEDAP (2012) uvádí hodnoty hraničních koncentrací pro klindamycin pro celou skupinu *L. acidophilus* shodné.

Rezistence na erythromycin a tetracyklin jsou snadno a nejčastěji přenositelné mezi kmeny rodu *Lactobacillus*, protože geny jsou lokalizovány na plazmínech. Vůči těmto dvěma antibiotikům jsou tak kmeny rodu *Lactobacillus* nejčastěji rezistentní (Bernadeau a kol. 2008). V námi analyzovaném souboru kmenů toto tvrzení nebylo potvrzeno, protože rezistence na erythromycin a tetracyklin nebyla detegována.

### **5.3.2 Skríníng přítomnosti genů pro vybrané probiotické a další vlastnosti**

#### **5.3.2.1 Identifikace genu pro linoleát izomerázu**

Konjugované linoleové kyseliny (CLA) byly popsány jako protirakovinná složka, která má významný podíl na regulaci hladiny tělesného tuku (Park 2014). Vznikají z α-linoleové kyseliny (LA) pomocí enzymu linoleát izomerázy (LI). Mnoho kmenů izolovaných z gastrointestinálního traktu a bacheru přežvýkavců je schopno přeměnit LA na CLA (Macouzet a kol. 2010). Některé



kmeny rodu *Lactobacillus* mohou produkovat CLA jako intermediát při hydrogenaci kyseliny linoleové na kyselinu stearovou (Ogawa a kol. 2005).

Primery použité v této práci jsou komplementární pro linoleát izomerázu bakteriálního druhu *L. acidophilus*. V PCR byly amplifikovány DNA kmenů, které byly pomocí identifikačních technik zařazeny do skupiny druhů *L. acidophilus* (druhy *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*) (Tabulka 16). Bylo testováno patnáct RL kmenů a čtyři sbírkové kmeny s využitím specifických primerů publikovaných v práci (Macouzet a kol. 2010) (kapitola 4.2.4.5). Velikost specifického produktu PCR byla 1378 bp (Macouzet a kol. 2010).

Při amplifikaci DNA izolované z kmenů RL5, RL8, RL20, RL20-P, *L. gasseri* CCM 7009<sup>T</sup>, *L. johnsonii* CCM 2935 byl získán produkt PCR o velikosti 1378 bp; při amplifikaci DNA izolované z kmenů RL2-P, RL5-P, RL8-P, RL13-P, RL13-57L3-7AP, RL13-57L3-8AP, RL22-P, RL24-P, RL13, RL22 a *L. gasseri* K7 byl získán produkt PCR o velikosti asi 700 bp. Při amplifikaci DNA izolované z kmenů RL2 a *L. acidophilus* CCM 4833 byly amplifikovány dva produkty PCR o velikosti 700 a 1378 bp. Produkt PCR o velikosti 1378 bp z kmene *L. johnsonii* CCM2935 byl přečištěn (PCR purification kit, Qiagen) a poslán na sekvenování (Microsynth, Švýcarsko). Analýza sekvenovaného produktu PCR pomocí algoritmu BLAST ukázala 95% podobnost s genem pro linoleát izomerázu kmene *L. acidophilus* AS1.1854 uloženého v databázi Genbank. Sekvence nukleotidů (aminokyselin) pro enzym linoleát izomerázu jsou v rámci rodu *Lactobacillus* vysoce variabilní. Produkty PCR o velikosti 700 bp je nutné podrobit další analýze.

### 5.3.2.2 Identifikace genů pro histidin dekarboxylázu a tyrosin dekarboxylázu

Všechny kmeny byly testovány na přítomnost genu pro histidin dekarboxylázu a tyrosin dekarboxylázu. Produkce dekarboxyláz je nežádoucí vlastností mezi probiotickými kmeny kvůli možné produkci biogenních aminů. Skríníng přítomnosti genů byl proveden pomocí PCR se specifickými primery HD3/HD4 (histidin dekarboxyláza) a TD2/TD5 (tyrosin dekarboxyláza) (Coton a Coton, 2005)(kapitola 4.2.4.5).

Ze všech testovaných kmenů rodu *Lactobacillus* (67) byl specifický produkt PCR (440 bp) pro histidin dekarboxylázu detegován u 7 kmenů (*L. vaginalis* RL7, *L. fermentum* RL12, *L. fermentum* RL16, *L. vaginalis* RL7-P, *L. fermentum* RL12-PA, *L. fermentum* RL12-PB a *L. fermentum* RL16-P).

Ze všech testovaných kmenů (67) byl specifický produkt PCR (1100 bp) pro tyrosin dekarboxylázu detegován pouze u kmene *Lactobacillus* sp. RL6P. Tento specifický produkt PCR byl přečištěn (PCR purification kit, Qiagen) a poslán na sekvenování (Microsynth, Švýcarsko). Po analýze nukleotidové sekvence pomocí programu BLAST byla nalezena 74% podobnost s genem pro tyrosin dekarboxylázu kmene *Carnobacterium divergens* V41.

Bylo publikováno, že tyramin produkující bakterie mají TyrDC biochemickou cestu kódovanou čtyřmi geny, které tvoří operon lokalizovaný na chromozomu. Gen *tyrDC* kóduje tyrosin-dekarboxylázu; gen *tyrP* kóduje tyrosin permeázu, gen *nhaC* se účastní k  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportu a gen *tyrS* vykazuje velkou podobnost s geny tyrosyl-tRNA syntetáz (Coton a Coton 2009). Bylo prokázáno, že produkce tyraminu je kmenově specifická (Coton a Coton 2009).

Pomocí výše uvedené konvenční PCR se specifickými primery pro histidin dekarboxylázu a tyrosin dekarboxylázu lze detegovat přítomnost daného genu v genomech laktobacilů. Uvedenou metodou však nelze zjistit, zda je syntetizován funkční protein a nelze rovněž stanovit množství produkovaného enzymu.

Mezi testovanými kmeny byl i *L. vaginalis* RL7 náležející mezi kmeny, které produkovaly antimikrobiální bílkovinné látky. Z důvodu detekce genu pro histidin dekarboxylázu, a tím i možné produkce biogenních aminů, byl tento kmen vyřazen z možného budoucího využití jako probiotikum (i když má tento kmen zajímavé výsledky v produkci antimikrobiálních látek).

Části experimentů uvedených v kapitole 5. 3. byly provedeny v rámci zahraniční stáže na Univerzitě v Ljubljani (Biotechnical Faculty, Institute of Dairy Science and Probiotics) ve Slovinsku v laboratoři prof. I. Rogelj a byly publikovány v pracích:

*Turková K., Mavrič A., Narat M., Rittich B., Španová A., Rogelj I., Matijašić B. B. (2012): Evaluation of Lactobacillus strains for selected probiotic properties. Folia Microbiologica, DOI: 10.1007/s12223-012-0208-4. Plné znění je uvedeno v kapitole Přílohy - Příloha 4*

Další výsledky z této kapitoly byly prezentovány formou konferenčních příspěvků (viz Kapitola 10).

## 5.4 Imunomagnetická separace buněk

Imunomagnetická separace buněk kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 byla provedena pomocí komerčních magnetických nosičů s navázaným streptavidinem (MPG-STV) a protilátkou (anti-*Lactobacillus*). Optimalizovaný postup je uveden v kapitole 4. 2. 12. Optimalizováno bylo množství magnetického nosiče, koncentrace protilátky, počty promývání navázaných buněk na magnetickém nosiči a doby inkubací. Postup byl optimalizován pro separaci buněk kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 z kultivačního media, UHT mléka a bílého jogurtu. Přítomnost imunomagneticky separovaných buněk byla zhodnocena kultivačně a pomocí PCR.

### 5.4.1 Interference magnetických nosičů v PCR

PCR byly provedeny podle optimalizovaných návodů uvedených v kapitole 4.2.4.1 Pro použití PCR pro vyhodnocení počtu imunomagneticky separovaných buněk byla nejdříve zhodnocena citlivost použitých PCR a možná interference magnetických nosičů v PCR. Citlivost PCR byla stanovena pro doménu *Bacteria* na 10 fg/μl, pro rod *Lactobacillus* 10 pg/μl a druh *L. rhamnosus* 10 pg/μl. Vyhodnocení interference magnetických nosičů MPG-STV byla provedena pomocí PCR s primery specifickými pro doménu *Bacteria* a pro rod *Lactobacillus*. Ke směsi pro PCR byly přidány magnetické nosiče MPG-STV v objemu 2, 4 a 6 μl (koncentrace 5 mg/ml) ve třech nezávislých pokusech. Pro doménu *Bacteria* byla snížena citlivost z 10 fg/μl na 1 pg/μl; pro rod *Lactobacillus* z 10 pg/μl na 100 pg/μl. I přes snížení citlivosti jsou obě PCR vhodnou metodou pro zjištění přítomnosti imunomagneticky separovaných buněk kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900.

### 5.4.2 IMS buněk *L. rhamnosus* LOCK 0900

Kmen *L. rhamnosus* LOCK 0900 byl kultivován při 37°C po dobu 18hodin aerobně ( $1,25 \times 10^8$  CFU/ml). Protilátky a magnetické nosiče použité pro imunomagnetickou separaci jsou popsány v kapitolách 4.1.2. Imunomagnetická separace byla provedena dle optimalizovaného postupu uvedeného v kapitole 4. 2. 12. Testované kombinace a výsledky imunomagnetické separace obou nezávislých pokusů jsou uvedeny v Tabulce 36. Výsledky IMS-PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *L. rhamnosus* jsou uvedeny v Tabulce 37.

**Tabulka 36: Imunomagnetické separace buněk *L. rhamnosus* LOCK 0900**

Magnetický nosič (50 µl)	Protilátka (50 µl)	Počet buněk přidaných k nosičům (CFU/ml)	Počet buněk po IMS (CFU/ml)
MPG-STV (5 mg/ml)			5,09 x10 <sup>4</sup>
	10x ředěná anti- <i>Lactobacillus</i>	1,25x10 <sup>7</sup>	4,99 x10 <sup>4</sup>
	Bez protilátky		7,5 x10 <sup>2</sup>

**Tabulka 37: Detekce DNA imunomagneticky separovaných buněk pomocí IMS-PCR**

Magnetický nosič	Protilátka	produkt PCR		
		doména <i>Bacteria</i>	rod <i>Lactobacillus</i>	druh <i>L. rhamnosus</i>
MPG-STV (5mg/ml)		+	+	+
	10x ředěná anti- <i>Lactobacillus</i>	+	+	+
	Bez protilátky	+	-	-

+ specifický produkt PCR detegován; +/- specifický produkt PCR detegován slabě; -specifický produkt PCR nebyl detegován

Z množství přidaných buněk kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 bylo po imunomagnetické separaci detegováno množství buněk nižší o 3 řády, než bylo přidáno (u obou dvou nezávislých testů). U nespecifické sorpce (kontroly), u které nebyla použita biotinylovaná protilátka, bylo detegováno množství buněk nižší o 2 řády než u vzorků s protilátkou anti-*Lactobacillus* (Tabulka 36). V PCR byly detekovány specifické produkty PCR u domény *Bacteria*, rodu *Lactobacillus* i druhu *L. rhamnosus*. U nespecifické sorpce (kontroly) byl detegován specifický produkt PCR pouze v PCR pro doménu *Bacteria*, ale nebyl detegován ve zbylých PCR. Je to v důsledku různé citlivosti PCR, kdy PCR pro doménu *Bacteria* je citlivější než rodově a druhově specifické PCR (viz kapitola 5.4.2).

### 5.4.3 IMS buněk *L. rhamnosus* LOCK 0900 přidanych do mléka

Bakteriální buňky narostlé přes noc byly přidány do UHT mléka. Imunomagnetická separace byla provedena dle optimalizovaného postupu uvedeného v kapitole 4.2.12.1. Testované kombinace a výsledky imunomagnetické separace obou nezávislých pokusů jsou uvedeny v Tabulce 38. Výsledky IMS-PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *L. rhamnosus* jsou uvedeny v Tabulce 39.

Tabulka 38: Imunomagnetická separace buněk čisté kultury kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 z UHT mléka

Magnetický nosič (50µl)	Protilátka (50 µl)	Počet buněk přidanych k nosičům (CFU/ml)	Počet buněk po IMS (CFU/ml)
MPG-STV (5 mg/ml)	10x ředěná anti- <i>Lactobacillus</i>	1,25x10 <sup>7</sup>	3,25 x 10 <sup>3</sup>
	Bez protilátky		2,5 x10 <sup>3</sup>
			5,0 x10 <sup>1</sup>

Tabulka 39: Detekce DNA imunomagneticky separovaných buněk z mléka pomocí IMS-PCR

Magnetický nosič	Protilátka	produkt PCR		
		doména <i>Bacteria</i>	rod <i>Lactobacillus</i>	druh <i>L. rhamnosus</i>
MPG-STV (5mg/ml)	10x ředěná anti- <i>Lactobacillus</i>	+	+/-	+/-
		+	+/-	+/-
	Bez protilátky	-	-	-

+ specifický PCR produkt detegován; +/- specifický PCR produkt detegován slabě; -specifický PCR produkt nebyl detegován

Z množství přidanych buněk kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 do UHT mléka bylo po imunomagnetické separaci detegováno na miskách s MRS agarem množství buněk nižší o 4 řády, než bylo přidáno (u obou dvou nezávislých testů). U kontroly, u které nebyla použita biotinylovaná protilátka, bylo detegováno množství kolonií o 6 řádů nižší (nespecifická adsorpce). Specifické produkty PCR byly detegovány v IMS-PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *L. rhamnosus*. Snížená citlivost byla pozorována v PCR pro rod *Lactobacillus* a druh *L. rhamnosus*.

#### 5.4.4 IMS buněk *L. rhamnosus* LOCK 0900 přidanych do bílého jogurtu

Čerstvě narostlé bakteriální buňky *L. rhamnosus* LOCK 0900 byly přidány do bílého jogurtu, ve kterém jsou přítomny startovací kultury *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, ale žádné probiotické kmeny (dle údajů výrobce). Imunomagnetická separace byla provedena dle optimalizovaného postupu uvedeného v kapitole 4.2.12.2. Testované kombinace a výsledky imunomagnetické separace obou nezávislých pokusů jsou uvedeny v Tabulce 40. Výsledky IMS-PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druh *L. rhamnosus* jsou uvedeny v Tabulce 41.

**Tabulka 40: Imunomagnetické separace buněk čisté kultury kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 z bílého jogurtu**

Magnetický nosič (50μl)	Protilátka (50 μl)	Počet buněk přidanych k nosičům (CFU/ml)	Počet buněk po IMS (CFU/ml)
MPG-STV (5 mg/ml)	10x ředěná anti- <i>Lactobacillus</i>	1,25x10 <sup>7</sup>	5,0 x 10 <sup>2</sup>
			3,0 x 10 <sup>3</sup>
	Bez protilátky		0
			5,0 x 10 <sup>1</sup>

**Tabulka 41: Výsledky imunomagnetické separace buněk čisté kultury – detekce DNA imunomagneticky separovaných buněk pomocí IMS-PCR**

Magnetický nosič	Protilátka	Produkt PCR		
		doména <i>Bacteria</i>	rod <i>Lactobacillus</i>	druh <i>L. rhamnosus</i>
MPG-STV (5mg/ml)	10x ředěná anti- <i>Lactobacillus</i>	+	+/-	+/-
		+	+	+/-
	Bez protilátky	-	-	-
		-	-	-

+ specifický PCR produkt detegován; +/- specifický PCR produkt detegován slabě; -specifický PCR produkt nebyl detegován

Z množství přidanych buněk kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 do bílého jogurtu bylo po imunomagnetické separaci detegováno na miskách s MRS agarem množství buněk nižší o 4 nebo 5 řádů, než bylo přidáno (u obou dvou nezávislých testů). U nespecifické sorpce (kontroly), u

které nebyla použita biotinylovaná protilátka, nebyly detegovány v jednom případě žádné kolonie a v druhém případě byl o 6 řádů nižší počet kolonií.

V PCR pro doménu *Bacteria* byly detegovány specifické produkty PCR u všech testovaných vzorků, ke kterým byla přidána protilátka anti-*Lactobacillus*. U kontrol specifické produkty PCR nebyly detegovány. Produkty PCR o slabé intenzitě byly detegovány v PCR pro rod *Lactobacillus* a druh *L. rhamnosus*, což zřejmě souvisí s citlivostí PCR. Možné interakce mohou způsobovat také buňky startovací jogurtové kultury, které jsou ve výrobku přítomny.

Při využití imunomagnetické separace buněk lze izolovat buňky přítomné v matrici ve velmi nízké koncentraci. Díky streptavidinu navázanému na magnetický nosič, a biotinylované protilátce lze využít vazbu streptavidin – biotin pro nabohacení buněk, které jsou v matrici přítomny ve velmi nízkých koncentracích. Vzhledem k dosaženým výsledkům je potřebné postup dále optimalizovat.

## 6. ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ

Probiotické bakterie mléčného kvašení jsou běžnou součástí řady výrobků potravinářského průmyslu. Významné postavení mezi bakteriemi mléčného kvašení mají druhy rodu *Lactobacillus*. Řada kmenů z různých druhů rodu *Lactobacillus* je pro člověka zdraví prospěšná a je hodnocena jako potencionální probiotikum. Identifikace probiotického kmene je velmi důležitá, pokud chceme využít jeho probiotické vlastnosti.

Druhovú identifikaci a charakterizaci kmenů uvedeného rodu je věnována první část práce. Byl analyzován soubor 68 kmenů. Kmeny byly identifikovány pomocí PCR pro rod *Lactobacillus*, druhově specifických PCR, včetně multiplexní PCR, rep-PCR, RAPD-PCR a porovnání sekvencí genu pro 16S rRNA. Výše uvedená škála technik umožnila zařazení analyzovaných kmenů do 10 druhů a 2 skupin druhů: 24 kmenů bylo identifikováno do druhu *L. rhamnosus*, 12 kmenů do *L. paracasei*, 7 kmenů do *L. fermentum*, 3 kmeny do druhu *L. vaginalis*, 2 kmeny do *L. helveticus*, 2 kmeny do *L. johnsonii*, 2 kmeny do *L. gasseri*, 2 kmeny do *L. salivarius*, 1 kmen do druhu *L. oris*, 1 kmen do *L. plantarum*, 9 kmenů do skupiny druhů *L. gasseri/johnsonii*; 3 kmeny nebyly druhově identifikovány a z nich jeden nebyl zařazen do rodu *Lactobacillus*.

Všechny kmeny byly testovány na produkci antimikrobiálních látek proti vybranému souboru indikátorových kmenů v agarovém kapkovém testu. Z celého souboru produkovalo antimikrobiální bílkovinné látky v dostatečné koncentraci v supernatantu (agarový difuzní test) 7 kmenů (RL2-P, RL15-P, RL22-P, RL26-P, RL2, RL7 a RL14). Pro podrobnou charakteristiku antimikrobiálních bílkovinných látek v supernatantu byly zvoleny tři kmeny RL2-P, RL22-P a RL2, u kterých byl sledován vliv teploty, pH a přítomnosti detergentů a EDTA na inhibiční vlastnosti. Uvedené kmeny produkovaly teplotně stabilní antimikrobiální bílkovinné látky, jejichž antimikrobiální vlastnosti neovlivňovaly testované detergenty s výjimkou SDS.

Dále bylo zjištěno, že 7 CCDM kmenů produkovalo antimikrobiální látky citlivé k proteolytickým enzymům, které byly účinné proti indikátorovým kmenům rodu *Lactobacillus* a *Clostridium*. Kmen *L. acidophilus* CCDM 109 produkoval antimikrobiální bílkovinné látky účinné pouze vůči dvěma indikátorovým kmenům. Kmeny *L. gasseri* CCDM 215 a *L. acidophilus* CCDM 149 produkovaly antimikrobiální substance aktivní vůči 13 indikátorovým kmenům, ale nevykazovaly dobré přežití v podmínkách gastrointestinálního traktu a v kompetiční studii (v porovnání s *L. acidophilus* CCDM 109). Kmen *L. helveticus* CCDM 82 v kompetiční studii produkoval antimikrobiální bílkovinné substance proti 5 indikátorovým kmenům a úspěšně inhiboval adhezi *E. coli* O157:H7.

Pomocí specifických primerů pro geny kódující produkci bakteriocinů (acidocin A, acidocin B, laktacin F, gassericin A, gassericin B, gassericin K7A a gassericin K7B) byla amplifikována DNA izolovaná ze všech kmenů. Specifické produkty PCR pro geny kódující produkci bakteriocinů byly



detegovány u 14 kmenů. Výsledky byly potvrzeny DNA/DNA hybridizací s vysokou stringencí s výjimkou jednoho kmene.

U tří kmenů (RL2, RL2-P a RL22-P) byly pomocí PCR hledány jednotlivé geny v genových klastrech gassericinů K7A a gassericinů K7B. Získané produkty PCR byly sekvenovány a analyzovány pomocí algoritmu BLAST a programu CLUSTAL W2. Byla nalezena 100% shoda sekvencí pro části genových klastrů gassericinů K7B, acidocinů LF221B a gassericinů T v DNA kmenů RL2-P a RL22-P. Propojení produkce antimikrobiálních bílkovinných látek v agarovém kapkovém testu a agarovém difuzním testu s molekulárně biologickou analýzou nebylo v našem případě jednoznačné.

Všechny analyzované kmeny byly podrobeny skríníngu na přítomnost genů pro produkci dekarboxyláz, které jsou zodpovědné za vznik biogenních aminů. Provedený skríníng DNA všech kmenů pomocí specifických primerů ukázal přítomnost genu pro produkci histidin dekarboxylázy u 7 kmenů (RL7, RL12, RL16, RL7-P, RL12-PA, RL12-PB a RL16-P). Gen pro produkci tyrosin dekarboxylázy byl detegován pouze u kmene RL6P. Dále byly kmeny testovány na přítomnost genu pro linoleát izomerázu (LI), která je zodpovědná za tvorbu konjugovaných linoleových kyselin (CLA). Specifický produkt PCR pro LI byl detegován u 4 kmenů (RL5, RL8, RL20 a RL20-P).

Třináct kmenů skupiny *Lactobacillus acidophilus* bylo testováno na resistenci vůči 12 antibiotikům pomocí E-testu. Z testovaných kmenů byly 4 kmeny resistantní k 4 antibiotikům a 1 kmen k 3 antibiotikům. Zbylé kmeny byly rezistentní ke 2 a méně antibiotikům.

V poslední části práce byl testován postup imunomagnetické separace buněk kmene *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 pomocí biotinylované protilátky anti-*Lactobacillus* navázané na magnetické nosiče funkcionalizované streptavidinem (MPG-STV). Buňky kmene *L. rhamnosus* LOCK 0900 byly pomocí imunomagnetické separace izolovány z kultivačního média, UHT mléka a bílého jogurtu v dostatečném množství pro detekci pomocí kultivační metody a PCR.

## 7. ZKRATKY

ATCC	American Type Culture Collection
BMK	bakterie mléčného kvašení
Caco-2 buňky	(human colon carcinoma cell line) buňky epiteliálního kolorektálního adenokarcinomu
CCDM	Czech Collection of Dairy Microorganisms
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CFU	(colony forming units) kolonie tvořící jednotky
CLA	konjugovaná linolová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Food and Agriculture Organization
FEEDAP	The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed
GIT	gastrointestinální trakt
GRAS	(Generally Recognized As Safe) všeobecně považovány za bezpečné
IMS	imunomagnetická separace
LI	linoleát izomeráza
MH agar	Müller-Hinton agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRS	de Mann, Rogosa a Sharpe medium
QPS	(Qualified presumption of Safety)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerázová řetězová reakce
P(HEMA-co-GMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát-co- glycidylmethakrylát)
RAPD-PCR	náhodně amplifikovaná polymorfní PCR
Rep-PCR	interrepetitivní PCR
SDS	(sodium dodecyl sulphate) dodecylsulfát sodný
UHT	ultra-high temperature

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

- **Acuña L., Picariello G., Sesma F., Morero R. D., Bellomio A. (2012):** A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEBS Open Bio* 2:12-19.
- **Alakomi H. L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I. M. (2000):** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 66:2001-2005.
- **Álvarez-Martín P., Flórez A. B., Hernández-Barranco A., Mayo B. (2008):** Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control* 19:62-70.
- **Anal A. K., Singh H. (2007):** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol* 18:240-251.
- **Arakawa K., Kawai Y., Nishimura J., Kitazawa H., Saito T. (2009):** Negative effect of divalent metal cations on production of gassericin T, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri*, in milk-based media. *Int. Dairy J.* 19:612-616.
- **Arqués J. L., Rodríguez E., Nuñez M., Medina M. (2011):** Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *Food Control* 22:457-461.
- **Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarondo M., Chobert J. M., Dousset X., Ivanova I., Haertlé T. (2003):** Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int J Food Microbiol* 87:63-73.
- **Belguesmia Y., Naghmouchi K., Chihib N.E., Drider D. (2011):** Class IIa bacteriocins: Current Knowledge and Perspectives. In: *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*.
- **Bernardeau M., Guéguen M., Vernoux J. P. (2006):** Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol Rev* 30: 487-513.
- **Bernardeau M., Vernoux J. P., Henri-Dubernet S., Guéguen M. (2008):** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol* 126: 278-285.
- **Bhattacharya A., Banu J., Rahman M., Causey J., Fernandes G. (2006):** Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17: 789-810.
- **Bosch M., Nart J., Audivert S., Bonachera M. A., Alemany A.S., Fuentes M. C., Cuñé J. (2012):** Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Arch Oral Biol* 57:539-549.

- **Buyn R., Nadkarni M.A., Chhour K.L., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. (2004):** Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* 42:3128-3136.
- **Byczkowski J. Z., Gessner T. (1988):** Biological role of superoxide ion-radical. *Int J Biochem* 20:569-580.
- **Castellano P., Belfiore C., Vignolo G. (2011):** Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties. *Food Control* 22:1461-1465.
- **Castro M. P., Palavecino N. Z., Herman C., Garro O. A., Campos C. A. (2011):** Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Sci* 87:321-329.
- **Cintas L. M., Casaus P., Holo H., Hernández P. E., Nes I. F., Håvarstein L. S. (1998):** Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J Bacteriol* 180: 1988-1994.
- **Chahad O. B., El Bour M., Calo-Mata P., Boudabous A., Barros-Velázquez J. (2012):** Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. *Res Microbiol* 163:44-54.
- **Chalón M. C., Acuña L., Morero R. D., Minahk C. J., Bellomio A. (2012):** Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods: Are they the definite hurdle? *Food Res Int* 45:735-744.
- **Champagne C. P., Ross R. P., Saarela M., Hansen K. F., Charalampopoulos D. (2011):** Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol* 149: 185-193.
- **Chan E. S., Zhang Z. (2005):** Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in an acidic medium. *Process Biochem* 40:3346-3351.
- **Charlier C., Cretenet M., Even S., Le Loir Y. (2009):** Interaction between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int J Food Microbiol* 131: 30-39.
- **Chen W., Shen H., Li X., Jia N., Xu J. (2006):** Synthesis of immunomagnetic nanoparticles and their application in the separation and purification of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells. *Appl Surf Sci* 253:1762-1769.
- **Collins M.D., Phillips B.A., Zanoni P. (1989):** Deoxyribonucleic-acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 39:105-108.
- **Coton E., Coton M. (2005):** Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamin- and tyramine-producing bacteria. *J Microbiol Methods* 63:296-304.

- **Coton E., Coton M. (2009):** Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiol* 26: 52-57.
- **Coton M., Romano A., Spano G., Ziegler K., Vetrana C., Desmarais C., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Coton E. (2010):** Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiol* 27: 1078-1085.
- **Curragh H.J., Collins M.A. (1992):** High levels of spontaneous drug resistance in *Lactobacillus*. *J Appl Bacteriol* 73: 31-36.
- **D'Aimmo M.R., Modesto M., Biavati B. (2007):** Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int J Food Microbiol* 115:35-42.
- **Danielsen M., Wind A. (2003):** Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 82:1-11.
- **Dasari S., Shouri R.N.D., Wudayagiri R., Valluru L. (2014):** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* against microbial flora of cervicovaginal infection. *Asian Pacific J Trop Dis* 4:18-24.
- **Dellaglio F., Dicks L.M.T., Du Toit M., Torriani S. (1991):** Designation of ATCC334 in place of ATCC393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989). Request for an Opinion. *Int J Syst Bacteriol* 41:340-342.
- **Dellaglio F., Felis G.E., Torriani S. (2002):** The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:285-287.
- **Delavenne E., Ismail R., Pawtowski A., Mounier J., Barbier G. (2013):** Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* 30:206-213.
- **Dicks L.M.T., Du Plessis E.M., Dellaglio F., Lauer E. (1996):** Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int J Syst Bacteriol* 46: 337-340.
- **Dimitonova S.P., Danova S.T., Sekedjieva J.P., Bakalov B.V. (2007):** Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women. *Anaerobe* 13:178-184.
- **Dominguez-Bello M. G., Blaser M. J., Ley R. E., Knight R. (2011):** Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology* 140:1713-1719.
- **Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen L. M., Prévost H. (2006):** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:564-582.

- **Dubernet S., Desmasures N., Guégen M. (2002):** A PCR-based method for identification of lactobacilli at genus level. *FEMS Microbiol Lett* 214: 271-275.
- **Dušková M., Španová A., Dráb V., Rittich B. (2009):** Searching for genes of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* encoding the bacteriocin nisin using DNA/DNA hybridisation. *Czech J Food Sci* 27:366-368.
- **EFSA (2010):** The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 1496:1-288.
- **Ehrmann M. A., Vogel R. F. (2005):** Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol* 16: 31-42.
- **Eklund T. (1984):** The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *Int J Food Microbiol* 1:179-185.
- **Ezekiel D.H., Hutchins J.E. (1968):** Mutations affecting RNA polymerase associated with rifampicin resistance in *Escherichia coli*. *Nature* 220:276-277.
- **FAO (2006):** Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.
- **FEEDAP (2012):** Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA journal* 10:2740-2750.
- **Fernández M.F., Boris S., Barbés C. (2003):** Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 94:449-455. DOI: DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01850.x.
- **Gaggia F., Di Gioia D., Baffoni L., Biavati B. (2011):** The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends Food Sci Technol* 22: S58-S66.
- **Gálvez A., Abriouel H., López R. L., Omar N. B. (2007):** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 120:51-70.
- **Garcia-Gonzalez L., Geeraerd A. H., Mast J., Briers Y., Elst K., Van Ginneken L., Van Impe J. F., Devlieghere F. (2010):** Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide treatment. *Food Microbiol* 27:541-549.
- **Gevers D., Huys G., Swings J. (2001):** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 205:31-36.
- **Ghanbari M., Jami M., Kneifel W., Domig K.J. (2013):** Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. *Food Control* 32:379-385.
- **Giraffa G., Chanishvili N., Widayastuti Y. (2010):** Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res Microbiol* 161: 480-487.

- **González M., Bagatolli L. A., Echabe I., Arrondo J. L. R., Argaraña C. E., Contor C. R., Fidelio D. (1997):** Interaction of Biotin with Streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding. *Biol Chem* 17:11288-11294.
- **Grillová L. (2012):** Vyhledávání genů kódujících probiotické a další vlastnosti vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií. *Diplomová práce, Masarykova Univerzita, Brno, 88 s.*
- **Haarman M., Knol J. (2006):** Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* 72:2359-2365.
- **Hacin B., Rogelj I., Matijašić B.B. (2008):** *Lactobacillus* isolates from weaned piglets mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. *Folia Microbiol* 53: 569-579.
- **Heenan C. N., Adams M. C., Hosken R. W., Fleet G. H. (2004):** Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT- Food Sci Technol* 37:461-466.
- **Ishikawa H., Kutsukake E., Fukui T., Sato I., Shirai T., Kurihara T., Okada N., Danbara H., Toba M., Kohda N., Maeda Y., Matsumoto T. (2010):** Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* strains b240 protected mice against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1338-1342.
- **Ishii S., Kadota K., Senoo K. (2009):** Application of a clustering-based peak alignment algorithm to analyze various DNA fingerprinting data. *J Microbiol Methods* 78:344-350.
- **Jacobsen C.N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A.E., Møller P.L., Michaelsen K.F., Pærregaard A., Sandström B., Tvede M., Jakobsen M. (1999):** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 65:4949-4956.
- **Jankowska A., Laubitz D., Antushevich H., Zabielski R., Grzesiuk E. (2008):** Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotechnol Article ID 357964, 6 s.*
- **Jelínek Z. (2010):** Molekulární typizace bakterií mléčného kvašení. *Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 55 s.*
- **Jepson M.A., Lang T.F., Reed K.A., Simmons N.L. (1996):** Evidence for a rapid, direct effect on epithelial monolayer integrity and trans-epithelial transport in response to *Salmonella* invasion. *Eur J Physiol* 432:225-233.
- **Jiang J., Shi B., Zhu D., Cai Q., Chen Y., Li J., Qi K., Zhang M. (2012):** Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. *Food Control* 23:338-344.

- **Johnsen L., Fimland G., Nissen-Meyer J. (2005):** The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J Biol Chem* 11:9243-9250.
- **Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Bacteria (2008):** The type strain of *Lactobacillus casei* is ATCC 393, ATCC 334 cannot serve as the type because it represents a different taxon, the name *Lactobacillus paracasei* and its subspecies names are not rejected and the revival of the name '*Lactobacillus zae*' contravenes Rules 51b(1) a (2) of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *Opinion 82. Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1764-1765.
- **Kanatani K., Tahara T., Oshimura M., Sano K., Umezawa C. (1995):** Identification of the replication region of *Lactobacillus acidophilus* plasmid pLA103. *FEMS Microbiol Lett* 133:127-130.
- **Kanmani P., Kumar R. S., Yuvaraj N., Paari K. A., Pattukumar V., Arul V. (2011):** Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochem Eng J* 58-59:140-147.
- **Karska-Wysocki B., Bazo M., Smoragiewicz W. (2010):** Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol Res* 165:674-686.
- **Kataria J., Li N., Wynn J. L., Neu J. (2009):** Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutr Rev* 67:546-550.
- **Kawai Y., Saitoh B., Takahashi O., Kitazawa H., Saito T., Nakajima H., Itoh T. (2000):** Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2201-2208.
- **Kimmel A.R., Oliver B. (2006):** DNA microarrays, Part B: Databases and Statistics. *In Methods in enzymology, vol. 411. Academic Press, 496 s. ISBN 0-12-182816-6.*
- **Kirtzalidou E., Pramateftaki P., Kotsou M., Kyriacou A. (2011):** Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe* 17:440-443.
- **Klayraung S., Viernstein H., Okonogi S. (2009):** Development of tablets containing probiotics: Effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *Int J Pharm* 370:54-60.
- **Klaenhammer T. R., Barrangou R., Buck B. L., Azcarate-Peril M. A., Altermann E. (2005):** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* 29: 393-409.
- **Kleerebezem M., Hols P., Bernard E., Rolain T., Zhou M., Siezen R. J., Bron P. A. (2010):** The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev* 34:199-230.



- **Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. (1998):** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 41: 103-125.
- **Kong S., Davison A. J. (1980):** The role of interaction between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>, e<sup>-</sup> and O<sup>2-</sup> in free radical damage to biological systems. *Arch Biochem Biophys* 204: 18-29.
- **Lacroix C. (2011):** *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*, Woodhead Publishing, 537s.
- **Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGewttigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. (2007):** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- **Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S. C. J. (2008):** Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:728-757.
- **Lee Y. K., Mazmanian S. K. (2010):** Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 330:1768-1773.
- **Legendre P., Legendre I. (1998):** *Numerical ecology, 2ng illustrated edition*. Elsevier, 853 s. ISBN 0-444-89250-8.
- **Li Y., Nishimo N. (2011):** Bacterial and communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Lett Appl Microbiol* 52:314-321.
- **Lindgren S. E., Dobrogosz W. J. (1990):** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Lett* 87:149-163.
- **Liu X.Q., Xing J.M., Guan Y.P., Shan G.B., Liu H.Z. (2004):** Synthesis of aminosilane modified superparamagnetic silica supports and their use of protein immobilization. *Colloids Surf* 238:127-131.
- **Lopez M., Li N., Kataria J., Russell M., Neu J. (2008):** Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 138:2264-2268.
- **Luginbuhl W., Jimeno J., Zehntner U. (2006):** Identification of seven species of the *Lactobacillus acidophilus* group by FT-IR spectroscopy. *LWT-Food Sci Technol* 39:152-158.
- **Ma K., Deng Y., Bai Y., Xu D., Chen E., Wu H., Li B., Gao L. (2014):** Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCA assay based on immunomagnetic separation. *Food Control* 42: 87-93.
- **Macouzet M., Robert N., Lee B.H. (2010):** Genetic and functional aspects of linoleate isomerase in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:1737-1742.
- **Madden, T. (2002):** The BLAST sequence analysis tool. In: *The NCBI Handbook*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>.

- **Mainville I., Arcand Y., Farnworth E. R. (2005):** A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol* 99:287-296.
- **Majhenič A. Č., Matijašić B. B., Rogelj I. (2003):** Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *J Dairy Res* 77:199-203.
- **Majhenič A.C., Venema K., Allison G.E., Matijašić B.B., Rogelj I., Klaenhammer T.R. (2004):** DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221A and acidocin LF221B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Appl Microbiol Biot* 63:705-714.
- **Marianelli C., Cifani N., Pasquali P. (2010):** Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Res Microbiol* 161: 673-680.
- **Marteau P. (2001):** Safety aspects of probiotic products. *Food Nutr Res* 45:22-24.
- **Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M. (2003):** Human milk is source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 143:754-758.
- **Matijašić B. B. (2012):** ústní sdělení.
- **Matijašić B. B., Rogelj, I. (2000):** Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technol Biotech* 37:93-100.
- **Matijašić B.B., Narat M., Zorič M. (2003):** Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technol Biotechnol* 41:83-88.
- **Matsumia Y., Kato N., Watanabe K., Kato H. (2012):** Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese by arbitraly primed polymerase chain reaction. *J Infection Chemother* 8:43-49.
- **Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M. (2002):** Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J* 12: 173-182.
- **Messaoudi S., Manai M., Kergourlay G., Prévost H., ConnilN., Chobert J.M., Dousset X. (2013):** *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol* 36: 296-304.
- **McCartney A. L. (2002):** Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr* 88:29-37.
- **Mijač V. D., Dukić S. V., Opavski N. Z., Dukić M. K., Ranin L. T. (2006):** Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 129:69-76.
- **Mitsou E.K., Kirtzalidou E., Oikonomou I., Liosis G., Kyriacou A. (2008):** Fecal microflora of Greek healthy neonates. *Anaerobe* 14:94-101.

- **Mkrtchyan H., Gibbons S., Heidelberger S., Zloh M., Limaki H.K. (2010):** Purification, characterisation and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine. *Int J Antimicrob Agents* 35:255-260.
- **Molly K., Woestyne M., Verstraete W. (1993):** Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:254-258.
- **Mori K., Yamazaki K., Ishiyama T., Katsumata M., Kobayashi K., Kawai Y., Inoue N., Shinano H. (1997):** Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int J Syst Bacteriol* 47: 54-57.
- **Muriana P.M., Massey I.J., Klaenhammer T.R. (1991):** Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J Bacteriol* 173:1779-1788.
- **Nes I. F., Diep D. B., Håvarstein L. S., Burberg M. B., Eijsink V., Holo H. (1996):** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 70:113-128.
- **Nes I. F., Tagg J. R. (1996):** Novel lantibiotics and their pre-peptides. *Antonie Leeuwenhoek* 69: 89-97.
- **Nespolo C.R., Brandelli A. (2010):** Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. *Braz J Microbiol* 41:1009-1018.
- **Ng E. W., Yeung M., Tong P. S. (2011):** Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. *Int J Food Microbiol* 145:169-175.
- **Nilsson L., Huss H. H., Gram L. (1997):** Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int J Food Microbiol* 38:217-227.
- **O'Connor E. B., Barrett E., Fitzgerald G., Hill C., Stanton C., Ross R. P. (2005):** Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria. In: *Tamine A. (eds.), Probiotic Dairy Products, Blackwell Publishing Oxford, 207s.*
- **Ogawa J., Kishino S., Ando A., Sugimoto S., Mihara K., Shimizu S. (2005):** Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J Biosci Bioeng* 100: 355–364.
- **O'hara A. M., Shanahan F. (2006):** The gut flora as a forgotten organ. *EMBO rep.* 7:688-693.
- **Oliver S. P., Patel D. A., Callaway T. R., Torrence M. E. (2009):** ASAS centennial paper: Developments and future outlook for preharvest food safety. *J Anim Sci* 87:419-437.
- **O'Shea E. F., Cotter P. D., Stanton C., Ross R. P., Hill C. (2012):** Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol* 152:189-205.

- **Pappert G., Rieger M., Niessner R., Seidel M. (2010):** Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of *E.coli*. *Microchim Acta* 168:1-8.
- **Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. Q. (2007):** Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* 104:1-13.
- **Park Y. (2014):** Conjugated linoleic acid in human health effects on weight control. *In: Nutrition in the Prevention and Treatment of abdominal obesity.* 429-446.
- **Pascual L. M., Daniele M. B., Giordano W., Pájaro M. C., Barberis I. L. (2010):** Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol* 56:397-402.
- **Peternel M. Z., Majhenič A. Č., Holo H., Nes I. F., Salehlen Z., Berlec A., Rogelj I. (2010):** Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Prob Antimicro. Prot.* 2: 233-240.
- **Pineiro M., Stanton C. (2007):** Probiotic Bacteria: Legislative Framework-requirements to evidence basis. *J Nutr* 137:850-853.
- **Pinto A.L., Fernandes M., Pinto C., Albano H., Castilho F., Teixeira P., Gibbs (2009):** Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int J Food Microbiol* 129:50-58.
- **Pitino I., Randazzo C.L., Mandalari G., Curto A.L., Faulks R.M., Le Marc Y., Bisignano C., Caggia C., Wickham M.S.J. (2010):** Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiol* 27:1121-1127.
- **Podolak R. K., Zayas J. F., Kastner C. L., Fung D. Y. C. (1996):** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J Food Prot* 59:370-373.
- **Pot B., Tsakalidou E. (2009):** Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. *In: Ljungh Ä., Wadström T. (eds.), Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics, Caister Academic Press, 205s.*
- **Pringsulaka O., Thongngam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K., Rangsiruji A. (2012):** Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control* 23: 547-551.
- **Quigley E. M. M. (2011):** Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Curr Opin Pharmacol* 11:593-603.
- **Rada V., Petr J. (2000):** A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J Microbiol Methods* 43:127-132.
- **Remus D. M., Kleerebezem M., Bron P. A. (2011):** An intimate tête-à-tête - how probiotic lactobacilli communicate with the host. *Eur J Pharmacol* 668:S33-S42.

- **Rittich B., Španová A., Horák D. (2009):** Functionalised magnetic microspheres with hydrophilic properties for molecular diagnostic applications. *Food Research International* 42: 493-498.
- **Rittich B., Špano M., Španová A. (2014):** Molekulární identifikace a typizace bakterií mléčného kvašení s využitím shlukové analýzy. *Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 79s.*
- **Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y. (2010):** Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol* 27:1-11.
- **Rogelj I., Matijašić B.B. (2006):** *Lactobacillus gasser* LF221 and K7 – from isolation to application. *Biologia* 61:761-769.
- **Rossetti L, Giraffa G. (2005):** Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J Microbiol Methods* 63:135-144.
- **Rubio R., Jofré A., Martín B., Aymerich T., Garriga M. (2014):** Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiol* 38:303-311
- **Sabia C., Anacarso I., Bergonzini A., Gargiulo R., Sarti M., Condo C., Messi P., de Niederhausern S., Iseppi R., Bondi M. (2014):** Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. *Anaerobe* 26:41-45.
- **Sahl H. G., Bierbaum G. (1998).** Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Ann Rev Microbiol* 52: 41-79.
- **Salam A. I., Yang H., Seo C. W. (2008):** Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chem* 190:137-143.
- **Sambrook J., Russel D.W. (2001):** Molecular cloning: A laboratory manual (II), 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Laboratory Harbor Press, 343s.
- **Sato H., Torimura M., Kitahara M., Ohkuma M., Hotta Y. Tamura H. (2012):** Characterization of the *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in *S10-spc-alpha* operons as observed by MALDI-TOF MS. *Syst Appl Microbiol* 35: 447-454.
- **SCAN (2003):** Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. European commission health&consumer protection directorate-general.
- **Sedláček I. (2007):** Taxonomie prokaryot. *Masarykova univerzita v Brně, 270s.*

- **Semyonov D., Ramon O., Kaplun Z., Levin-Brener L., Gurevich N., Shimoni E. (2010):** Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Res Int* 43:193-202.
- **Shalaby A. R. (1996):** Significance of biogenic amines in food safety and human health. *Food Res Int* 29:675-690.
- **Shenderov B. A. (2011):** Probiotic (symbiotic) bacterial languages. *Anaerobe* 17: 490-495.
- **Singh S., Goswami P., Singh R., Heller K. J. (2009):** Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT Food Sci Technol* 42: 448-457.
- **Sisto A., De Bellis P., Visconti A., Morelli L., Lavermicocca P. (2009):** Development of a PCR assay for the strain-specific identification of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1. *Int J Food Microbiol* 136:59-65.
- **Smid E. J., Wood B. J. B. (2011):** Food fermentation. In: *Ledeboer A., Hugenholtz J., Kok J., Konings W., Wouters J. (eds.), Thirty years of research on lactic acid bacteria, 24 Media Labs, 196 s.*
- **Snel J., Vissers Y., Smit B., Jongen J., Van der Meulen E., Zwijsen R., Ruinemans Koerts J., Jansen A., Kleerebezem M., Savelkoul H. (2010):** Strain-specific immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* strains on birch-pollen-allergic subjects out of season. *Clin Exp Allergy* 41:232-242.
- **Snijders J. M., van Logtestijn J. G., Mossel D. A. A., Smulders F. J. M. (1985):** Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *Veterinary Quarterly* 7:277-282.
- **Snoeck V., Goddeeris B., Cox E. (2005):** The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* 7:997-1004.
- **Šafařík I., Šafaříková M. (1999):** Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatogr B* 722:33-53.
- **Španová A., Rittich B. (2010):** Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. Vyd. 1. Brno: *Vysoké učení technické, Fakulta chemická. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.*
- **Španová A.,** soukromé sdělení, 2014
- **Štšepetova J., Sepp E., Kolk H., Loivukene K., Songisepp E., Mikelsaar M. (2011):** Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly. *Br J Nutr* 105:1235-1244.
- **Švec P., Dráb V., Sedláček I. (2005):** Ribotyping of *Lactobacillus casei* group strains isolated from dairy products. *Folia Microbiol* 50: 223-228.
- **Tannock G. W. (2003):** Probiotics: time for a dose of realism. *Curr Issues Intest Microbiol* 4: 33-42.

- **Todorov S. D. (2009):** Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action. *Braz J Microbiol* 40: 209-221.
- **Todorov S. D. (2004):** Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Braz J Microbiol* 35: 157-160.
- **Tomás M. S. J., Duhart C. I. S., De Gregorio P. R., Pingitore E. V., Nader-Macías M. E. (2011):** Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 159: 399-406.
- **Treven P., Turková K., Trmčič A., Obermajer T., Rogelj I., Matijašić B. B. (2013):** Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. *Folia Microbiol* 58:623-630, DOI:10.1007/s12223-013-0252-8.
- **Tulumoglu S., Yuksekdog Z.N., Beyatli Y., Simsek O., Cinar B., Yasar E. (2013):** Probiotic properties of lactobacilli species isolated from childrens feces. *Anaerobe* 24: 36-42.
- **Turková K. (2009):** Využití metod amplifikace DNA při identifikaci baktérií rodu *Lactobacillus*. *Diplomová práce, Masarykova univerzita, 106s.*
- **Tynkkynen S., Satokari R., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Saxelin M. (1999):** Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl Environ Microbiol* 65: 3908-3914.
- **van Belkum M. J., Martin-Visscher L. A., Vederas J. C. (2011):** Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol* 19:411-418.
- **van der Vossen J.M.B.M., van Herwijnen M.H.M., Leer R.J., ten Brink B., Pouwels P.H., Huis int Veld J.H.J. (1994):** Production of acidocin B, a bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* M46 is a plasmid-encoded trait: Plasmid curing, genetic marking by in vivo plasmid integration, and gene transfer. *FEMS Microbiol Lett* 116:333-340.
- **Verdenelli M.C., Ghelfi F., Silvi S., Orpianes C., Cecchi C., Cresci A. (2009):** Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Europ J Nutr* 48:355-363.
- **Vesterlund S., Palta J., Karp M., Ouweland A.C. (2005):** Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Res Microbiol* 156:238-244.
- **Vinderola C. G., Mocchiutti P., Reinheimer J. A. (2002):** Interaction among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J Dairy Sci* 85:721-729.
- **Wall R., Fitzgerald G., Hussey S., Ryan T., Murphy B., Ross P., Stanton C. (2007):** Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 127-137.

- **Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjärvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T. (2000):** Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* 66: 297-303.
- **Waner M.J., Mascotti D.P. (2008):** A simple spectrophotometric streptavidin-biotin binding assay utilizing biotin-4-fluorescein. *J Biochem Biophys Methods* 70: 873-877.
- **Ward L.J.H., Timmins M.J. (1999):** Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 29: 90-92.
- **Wayne L.G. (1994):** Actions of the Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology on Requests for Opinions published between January 1985 and July 1993. *Int J Syst Bacteriol* 44: 177-178.
- **Wells J. M., Rossi O., Meijerink M., van Baarlen P. (2011):** Epithelial crosstalk at the microbita-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- **Xiong Q., Cui X., Saini J.K., Liu D., Shan S., Jin Y. Lai Weihua (2014):** Development of an immunomagnetic separation method for efficient enrichment of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control* 37:41-45.
- **Yang R., Johnson M.C., Ray B. (1992):** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58:3355-3359.
- **Zarazaga M., Sáenz Y., Portillo A., Tenorio C., Ruiz-Larrea F., Del Campo R., Baquero F., Torres C. (1999):** In vitro activities of Ketolide HMR3647, Macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 43:3039-3041.
- **Zhao T., Doyle M. P., Harmon B. G., Brown C. A., Mueller P. O. E., Parks A. H. (1998):** Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J Clin Microbiol* 36:641-647.

Elektronické zdroje:

[www.cals.ncsu.edu/food\\_science/KlaenhammerLab/Project.html](http://www.cals.ncsu.edu/food_science/KlaenhammerLab/Project.html)

<http://www.bacterio.net>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>



## 9. ŽIVOTOPIS AUTORA

### OSOBNÍ ÚDAJE

**Jméno:** Kristýna Turková

**Trvalé bydliště:** Květná 48, 79201 Bruntál, Česká republika

**Datum narození:** 4.srpna 1985

### VZDĚLÁNÍ, ODBORNÁ PŘÍPRAVA, ŠKOLENÍ

Září 2013 – doposud

#### Laboratorní technik Pharma and Food

LentiKat's a.s., Biotechnologický inkubátor INBIT, Kamenice 34, 62500 Brno, Česká republika

Červen 2009 – doposud

#### Doktorské studium

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Purkyňova 118, 61200, Brno, Česká republika

Závěrečné práce: Studium probiotických bakterií mléčného kvašení produkující antimikrobiální látky

Srpen 2012

**Stáž ve Výzkumném ústavu vodohospodářském T.G. Masaryka**, Mojžírovo náměstí 16, 61200 Brno

Září 2011-prosinec 2011

#### Zahraniční stáž v rámci Free movers, MŠMT ČR

University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Institute of Dairy Science and Probiotics, Groblje 3, 1230 Domžale, Slovenia

Květen 2011

**Letní škola – Metody molekulární biologie proteinů a proteomiky**, MZLU v Brně, Česká republika

Září 2010 – prosinec 2010

**Zahraníční stáž v rámci Free movers, MŠMT ČR**

University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Institute of Dairy Science and Probiotics, Groblje 3, 1230 Domžale, Slovenia

Červen 2010

**Letní škola metod molekulární biologie nukleových kyselin a genomiky**, MZLU v Brně, Česká republika

Červenec 2007 – červen 2009

**Magisterské studium** (titul Mgr.; červený diplom)

Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Tvrdého 2, Brno, Česká republika, obor Obecná biologie, Mikrobiologie  
Závěrečná práce: Využití metod amplifikace DNA při identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus*

Červen 2004 – červenec 2007

**Bakalářské studium** (titul Bc. ; červený diplom)

Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Tvrdého 2, Brno, Česká republika, obor Obecná biologie, Mikrobiologie  
Závěrečná práce: Produkce vitamínů, exopolysacharidů a bakteriocinů bakteriemi mléčného kvašení

**OCENĚNÍ A GRANTY**

2012 – hlavní řešitel projektu FRVŠ na rozvoj předmětu – Testování produkce antimikrobiálních látek u vybraného probiotického kmene

2011 – spoluřešitel projektu FRVŠ na rozvoj předmětu – Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem – analýzy potravin a biologických vzorků (hl. řešitel Ing. J. Pořízka)

2011 – grant FEMS – finanční podpora na účast na zahraniční konferenci v Nizozemsku

## 10. KOMPLETNÍ SOUHRN PUBLIKACÍ AUTORA

### **Publikace v impaktovaných časopisech**

**Turková K.**, Rittich B., Španová A. (2012): Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods. *Chemical Papers* 66: 842-851, DOI: 10.2478/s11696-012-0206-7.

**Turková K.**, Mavrič A., Narat M., Rittich B., Španová A., Rogelj I., Matijašić B.B. (2013): Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties. *Folia Microbiol.* 58: 261-267, DOI: 10.1007/s12223-012-0208-4.

Treven P., **Turková K.**, Trmčič A., Obermajer T., Rogelj I., Matijašić B.B. (2013): Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. *Folia Microbiol.* 58: 623-630, DOI:10.1007/s12223-013-0252-8.

Šišková P., Černohorská L., Mahelová M., **Turková K.**, Woznicová V. (2014): Phenotypes of *Escherichia coli* isolated from urine: Differences between extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producers and sensitive strains. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. V tisku.

### **Konferenční příspěvky v podobě full textu**

**Turková K.**, Španová A., Rittich B., Matijašić B.B. (2012): Characterization of antimicrobial substances produced by strain *Lactobacillus gasseri* RL22P, XXI. *Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny, Brno, s. 108-109. ISBN:978-80-210-5874-3.*

**Turková K.**, Španová A., Rittich B., Matijašić B.B. (2012): Identification and antimicrobial activity of *Lactobacillus* strain isolated from infant faeces. In *CECE 2012, 9th International interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. Brno: 2012. s. 324-326. ISBN: 978-80-904959-1-3.*

### **Konferenční příspěvky v podobě abstraktu**

**Turková K.**, Rittich B., Španová A. (2009): Identifikace bakterií rodu *Lactobacillus* pomocí DNA amplifikačních metod. XIII. *Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, s. 99-100. ISBN:978-80-210-4830-0.*

Rittich B., **Turková K.**, Dušková M., Špano M., Dráb V., Španová A. (2009): *Identification and characterisation of newly isolated Lactobacillus strains of human origin. St. Petersburg, Russia, s. A21-A21.*

**Turková K.**, Španová A., Rittich B. (2010): Využití DNA amplifikačních metod pro identifikaci sbírkových a typových kmenů rodu *Lactobacillus*. *XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, s. 82-82. ISBN: 978-80-210-5164-5.*

Španová A., **Turková K.**, Dráb V., Špano M., Burdychová R., Rittich B. (2010): Characterization of potential probiotic *Lactobacillus* strains of human origin. *14th International Biotechnology Symposium, Rimini, Itálie.*

**Turková K.**, Mavrič A., Jakopič A., Matijašić B.B. (2011): Testing of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties. *10th symposium on lactic acid bacteria. Egmond aan Zee, The Netherlands.*

Treven P., Matijašić B.B., **Turková K.**, Trmčič A., Obermajer T., Rogelj I. (2011): Evaluation of gassericin K7A and K7B specific primers for detection or quantification of a probiotic strain in the faeces and milk. *10th symposium on lactic acid bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands.*

Rieglová K., **Turková K.**, Španová A., Rittich B. (2011): Molecular identification of selected species of lactic acid bacteria and bifidobacteria in food additives. *Chemické listy. Chemistry and Life, s. 1036-1036. ISSN: 0009-2770.*

**Turková K.**, Rittich B., Španová A. (2011): Screening of *Lactobacillus* strains for bacteriocin genes. *Chemické listy, Chemistry and Life, s. 1030-1030, ISSN: 0009-2770.*

Obermajer T., Mohar Lorbeg P., Lipoglavšek L., **Turková K.**, Čanžek Majhenič A., Matijašić B.B., Rogelj I. (2011): Vegetarian as. Omnivore diet and fecal microbiota composition, *9th Congress of the Slovenian Biochemical Society, 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participatin, 3rd CEFORM central Eutopean Forum for Microbiology, Maribor, Slovenia, s. 206-206. ISBN:978-961-90895-5-2.*

**Turková K.**, Mavrič A., Novak R., Matijašić B.B., Španová A. (2011): Production of antimicrobial substances by strains of *Lactobacillus* genus. *XX. Konference mladých mikrobiologů Tomáškovy Dny, Brno, s. 62-63. ISBN: 978-80-263-0004-5.*

**Turková K.**, Rittich B., Španová A., Matijašić B.B. (2012): Evaluation of *Lactobacillus* strains for the production of proteinaceous antimicrobial substances. *International scientific conference on bacteriocins and antimicrobial peptides, Košice, Slovakia, s. 56-57. ISBN: 978-80-89589-02-9.*

**Turková K., Španová A., Rittich B., Matijašić B.B.** (2012): Identification and antimicrobial activity of *Lactobacillus* strain isolated from infant faeces. *9th International interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, CECE 2012, Brno*, s. 324-326. ISBN: 978-80-904959-1-3.

**Turková K., Rittich B., Španová A.** (2012): Využití DNA amplifikačních metod pro detekci genů pro histidin-dekarboxylázu, tyrosin-dekarboxylázu a hydrolázu žlučových solí u kmenů rodu *Lactobacillus*. *XXIII. Biochemický sjezd, Brno*, s. 177-177. ISBN:978-80-86313-34-4.

**Turková K., Rittich B., Španová A.** (2013): Characterization of antimicrobial substances produced by the *Lactobacillus gasseri* RL2 strain. *1st Polish-Czech Probiotics Conference-Microbiology and Immunology of Mucosa, Probiotics Conference, Polsko*, s.40-40. ISBN: 978-83-928488-3- 7.

#### **Konferenční příspěvky – ústní přednášky**

**Turková K., Španová A., Rittich B.** (2010): Probiotic species identification and screening of *Lactobacillus* strains for bacteriocin genes. *International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics, Košice, Slovakia*, s. 73-73, ISBN: 978-80-970168-4-5.

Rittich B., **Turková K.**, Trachtová Š., Španová A. (2010): Charakterizace potenciálně probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* lidského původu ze sbírky Laktoflora, Praha.

## 11. PŘÍLOHY

### Příloha 1:

Turková K., Rittich B., Španová A.: Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods. *Chemical Papers* 2012, 66:842-851.

### Příloha 2:

Mnohonásobné přiložení sekvencí (Multiple sequence alignment)

### Příloha 3:

Treven P., Turková K., Trmčič A., Obermajer T., Rogelj I., Matijašić B.B.: Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. *Folia Microbiologica* 2013, 58: 623-630.

### Příloha 4:

Turková K., Mavrič A., Narat M., Ritiich B., Španová A., Rogelj I., Matijašić B.B.: Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties. *Folia Microbiologica* 2013, 58:261-267.

**IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF RELATEDNESS OF LACTOBACILLI USING DIFFERENT  
DNA AMPLIFICATION METHODS**

Kristýna Turková, Bohuslav Rittich, Alena Španová

*Chemical Papers 66 (9):842-851 (2012)*

*DOI:10.2478/s1696-012-0206-7*

## ORIGINAL PAPER

Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods<sup>‡</sup><sup>a</sup>Kristýna Turková\*, <sup>a,b</sup>Bohuslav Rittich, <sup>a,b</sup>Alena Španová<sup>a</sup>Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, CZ-612 00 Brno, Czech Republic<sup>b</sup>Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Tvrdeho 14, CZ-602 00 Brno, Czech Republic

Received 30 October 2011; Revised 18 April 2012; Accepted 4 May 2012

Several DNA amplification-based methods were used for identification and evaluation of the relation between lactobacilli isolated from breastfed full-term infant faeces (31 strains), dairy products (5 strains) and silage (1 strain). Twenty-seven strains isolated from infant faeces were identified as *Lactobacillus rhamnosus* (9), *Lactobacillus gasseri* (6), *Lactobacillus paracasei* (4), *Lactobacillus fermentum* (4), *Lactobacillus salivarius* (2), *Lactobacillus plantarum* (1), and *Lactobacillus helveticus* (1) using 10 species-specific polymerase chain reactions (PCRs), multiplex PCR for the *Lactobacillus casei* group, and sequencing of 16S rDNA. Four strains were not identified. Six strains isolated from dairy products and silage were identified as *Lactobacillus rhamnosus*. A repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (rep-PCR) with primer (GTG)<sub>5</sub> and a randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) with primer M13 were used for confirmation of species identification. Fingerprints were used for evaluation of the relatedness of lactobacilli. Differences between strains from infant faeces, dairy products, and silage were not detected.

© 2012 Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences

**Keywords:** *Lactobacillus*, breastfed infants, dairy products, identification, PCR, fingerprinting**Introduction**

The genus *Lactobacillus* contains around 130 species exhibiting a wide range of G+C content. Lactobacilli colonise the normal gastrointestinal tract of humans, the urogenital tract of women, and can be also found in plant material. They are part of many fermented food products and play an increasing role as probiotics for promoting overall health (Bernardeau et al., 2006; Li & Nishino, 2011).

Various methods have been used for the identification and characterisation of lactobacilli strains, including physiological and chemotaxonomic methods such as major fermentation pathways, carbohydrate patterns, configuration of lactic acid, or peptidoglycan analyses. However, the correct identification of

*Lactobacillus* species can be ambiguous if based on physiological and biochemical criteria alone, because of the large number of and/or closely related *Lactobacillus* species (Ehrmann & Vogel, 2005). Phenotypic tests are also dependent on conditions of cultivation, which is why molecular characteristics and methods are used. Molecular-genetic techniques based on methods such as PCR, restriction fragment length polymorphisms (RFLP), ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR), or repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (rep-PCR) have come to be used for molecular characterisation and identification of *Lactobacillus* strains (Ehrmann & Vogel, 2005; Ben Amor et al., 2007; Švec et al., 2010). Identification and estimation of the relatedness of *Lactobacillus* strains are important for

\*Corresponding author, e-mail: xcturkovak@fch.vutbr.cz

<sup>‡</sup>Presented at the 5th Meeting on Chemistry & Life 2011, Brno, 14–16 September 2011.



the verification of probiotic strains or starter cultures. More methods need to be used in the polyphasic approach for the classification purposes of present taxonomy (Ben Amor et al., 2007).

The aim of this study was identification of species of *Lactobacillus* strains isolated from breastfed infants (31), dairy products (5), and silage (1) using different DNA amplification methods (genus-specific, species-specific, and multiplex PCRs) and determination of the relatedness of strains using rep-PCR with primer (GTG)<sub>5</sub> and RAPD-PCR with primer M13. These techniques were also applied to determine the identity of the strains collected in the Culture Collection of Dairy Microorganisms (CCDM). Attention focused on the identification of newly isolated strains with potentially probiotic properties.

## Experimental

### *Bacterial strains, culture conditions and isolation of bacterial DNA*

The objects of the study were 37 strains of bacteria of the genus *Lactobacillus*. Thirty-one strains were isolated from faecal samples of 30 healthy breastfed infants (RL strains, which were obtained from Prof. V. Rada, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic). Each strain was isolated from a single child, with the exception of RL12A and RL12B strains, which were isolated from the same child. Five strains were isolated from dairy products and one from silage (CCDM strains). All strains are part of the Culture Collection of Dairy Microorganisms (CCDM, Tábor, Czech Republic). Type and collection strains of *Lactobacillus* were obtained from the Czech Collection of Microorganisms (CCM, Brno, Czech Republic) and were used as control strains: *L. rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>, *L. rhamnosus* CCM 7091, *L. paracasei* ssp. *paracasei* CCM 1753<sup>T</sup>, *L. paracasei* ssp. *tolerans* CCM 7092<sup>T</sup>, *L. fermentum* CCM 7192<sup>T</sup>, *L. casei* CCM 4791, *L. casei* CCM 4798, *L. salivarius* CCM 7274, *L. plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, and *L. gasseri* CCM 7009<sup>T</sup>. Strain *L. gasseri* K7 was acquired from Prof. I. Rogelj (University of Ljubljana, Slovenia).

All strains were grown in MRS (de Mann, Rogosa, and Sharpe) medium (Oxoid, London, UK), pH modified to 6.5. The bacteria were incubated aerobically (*L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, and four unidentified strains) or anaerobically (*L. gasseri*) (anaerobiosis GasPak System, Oxoid, Cambridge, UK) at 37°C from 24 h to 48 h.

The bacterial cells were centrifuged (10000g, 5 min), washed with a buffer solution (10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM EDTA, pH 8.0), and resuspended in 500 µL of the same buffer containing lysozyme (5 mg mL<sup>-1</sup>). After incubation at ambient temperature for 1 h, 12.5 µL of proteinase K

(10 µg mL<sup>-1</sup>) and 5 µL of sodium dodecyl sulphate (SDS) (10 % aqueous solution) was added, and the mixture was further incubated at 55°C for 24 h. Bacterial DNAs were isolated and purified by the phenol extraction method according to Sambrook and Russell (2001). Purified DNA was dissolved in 100 µL of TE buffer (10 mmol<sup>-1</sup> Tris, 1 mmol<sup>-1</sup> EDTA) and stored at 5°C prior to use. The concentrations of the isolated DNA were estimated spectrophotometrically at 260 nm. The ratio of absorbances  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  was used as a test of nucleic acid purity. A UV-VIS NanoPhotometer (Implen, München, Germany) was used for UV spectrophotometry. Possible degradation of the nucleic acids was monitored by gel electrophoresis (0.8 % agarose) in 0.5 × TBE buffer (45 mmol L<sup>-1</sup> boric acid, 45 mmol L<sup>-1</sup> Tris-base, 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0). Agarose gels were stained in ethidium bromide (0.5 µg mL<sup>-1</sup>), and visualised with UV transilluminator (305 nm) after washing.

### *Genus-specific, species-specific, and multiplex PCRs*

The *Lactobacillus* genus-specific primers used in this study are listed in Table 1. The PCR mixtures (25 µL) were cycled in a Techne Touchgene Gradient Thermocycler (Techne, Cambridge, UK). The PCR mixture contained 0.5 µL of 10 mM dNTP, 0.5 µL (10 pmol µL<sup>-1</sup>) of each primer, 1 µL of *Taq* I.1 polymerase (1 U µL<sup>-1</sup>), 2.5 µL of PCR buffer with 1.5 mmol L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> ions, and 1 µL of DNA; PCR water (Aqua for injection Braun, Melsungen, Germany) was added up to a volume of 25 µL. The amplification reactions were carried out using the following cycle parameters: 5 min of the initial denaturation period at 95°C (hot start), 30 s of denaturation at 95°C, 30 s of primer annealing at 55°C, and 30 s of extension at 72°C. The final polymerisation step was prolonged to 10 min. The samples were subjected to 30 cycles of amplification. The PCR products (250 bp) were separated by electrophoresis in 1.8 % agarose gel at 80 V for 1.5 h. Agarose gel was visualised with UV transilluminator.

Ten species-specific PCRs were used for amplification of DNA from 37 *Lactobacillus* strains and 11 type and collection strains. The *Lactobacillus* species-specific primers used in this study are listed in Table 1. The PCR mixtures contained 0.5 µL of 10 mmol L<sup>-1</sup> dNTP, 0.5 µL (10 pmol µL<sup>-1</sup>) of each primer, 1 µL of *Taq* I.1 polymerase (1 U µL<sup>-1</sup>), 2.5 µL of PCR buffer with 1.5 mmol L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup> ions, and 1 µL of DNA; PCR water was added up to a volume of 25 µL. The strains identified using species-specific PCRs into the *Lactobacillus casei* group (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) and control strains were also amplified using multiplex PCR (Sisto et al., 2009). The PCR mixtures of multiplex PCR contained 0.5 µL of 10 mmol<sup>-1</sup> dNTP, 0.3 µL of primers (10 pmol µL<sup>-1</sup> for PAR, CAS

**Table 1.** Primers of genus-specific, species-specific, and multiplex PCRs, rep-PCR, and RAPD-PCR

PCR specific to	Primer	Sequence of primers (5'-3')	Hybridisation temperature/°C	Reference
Genus <i>Lactobacillus</i>	LbLMA 1rev R16-1	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	55	Dubernet et al. (2002)
<i>L. casei/paracasei</i>	Pr I Cas II	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G GCG ATG CGA ATT TCT TTT TC	55	Walter et al. (2000)
<i>L. paracasei</i>	Y2 Paracasei	CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT CAC CGA GAT TCA ACA TGG	58	Ward & Timmins (1999)
<i>L. salivarius</i>	LactoR LsaliF	GTC CAT TGT GGA AGA TTC CC CGA AAC TTT CTT ACA CCG AAT GC	57	Buyn et al. (2004)
<i>L. rhamnosus</i>	Pr I Rha II	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G GCG ATG CGA ATT TCT ATT ATT	58	Walter et al. (2000)
<i>L. fermentum</i>	Lfpr Ferm II	GCC GCC TAA GGT GGG ACA GAT CTG ATC GTA GAT CAG TCA AG	55	Walter et al. (2000)
<i>L. gasseri</i>	Gas I Gas II	GAG TGC GAG AGC ACT AAA G CTA TTT CAA GTT GAG TTT CTC T	55	Walter et al. (2000)
<i>L. plantarum</i>	Lfpr Plan II	GCC GCC TAA GGT GGG ACA GAT TTA CCT AAC GGT AAA TGC GA	55	Walter et al. (2000)
<i>L. acidophilus</i>	Aci 16SI 16SII	AGC TGA ACC AAC AGA TTC AC ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC	58	Walter et al. (2000)
<i>L. johnsonii</i>	Joh 16SI 16SII	GAG CTT GCC TAG ATG ATT TTA ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC	57	Walter et al. (2000)
<i>L. zeae</i>	ZeaI ZeaII	TGT TTA GTT TTG AGG GGA CG ATG CGA TGC GAA TTT CTA AAT T	58	Walter et al. (2000)
Multiplex PCR	PAR CAS RHA CPR	GAC GGT TAA GAT TGG TGA C ACT GAA GGC GAC AAG GA GCG TCA GGT TGG TGT TG CAA NTG GAT NGA ACC TGG CTT T	54	Sisto et al. (2009)
rep-PCR	(GTG) <sub>5</sub>	GTG GTG GTG GTG GTG	45	Gevers et al. (2001)
RAPD-PCR	M13	GAG GGT GGC GGT TCT	49.8	Rossetti & Giraffa (2005)
16S rDNA	P0 P6	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA	60; 55; 50 <sup>a</sup>	Verdenelli et al. (2009)

a) The temperature programme is described in Section 16S rDNA sequencing.

and RHA primers), 0.2  $\mu\text{L}$  of 50 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$  for CPR primer, 0.5  $\mu\text{L}$  of *Taq* 1.1 polymerase (1 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  of PCR buffer with 1.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ions, and 1  $\mu\text{L}$  of DNA; PCR water was added up to a volume of 25  $\mu\text{L}$ . The primer concentrations were optimised. The amplification reactions were carried out using the following cycle parameters: 5 min of the initial denaturation period at 94°C (hot start), 30 s of denaturation at 94°C, 30 s of primer annealing (temperatures are given in Table 1), and 60 s of extension at 72°C. The final polymerisation step was prolonged to 5 min. The samples were subjected to 30 cycles of amplification. The PCR products (15  $\mu\text{L}$  of each) were separated by electrophoresis in 1.5 % agarose gel at 90 V for 1.5 h.

### 16S rDNA sequencing

The DNA of the selected strains was amplified by PCR using universal primers P0 and P6 (Table 1). The reaction mixtures were cycled through the temperature profile according to Verdenelli et al. (2009) with a minor modification. After incubation at 94°C for 3 min, the following profile was used: 5 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 4 min at 72°C; 5 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C, and 4 min at 72°C; 20 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 50°C, and 4 min at 72°C; one final cycle of 10 min at 72°C and 10 min at 60°C. The PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) and sequenced by Microsynth (Bal-

gach, Switzerland). The identities of the sequences were verified using Basic Local Alignment Search Tool, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### Genotyping methods – RAPD-PCR and rep-PCR

RAPD-PCR was carried out using an M13 primer (Table 1). The reaction mixture consisted of 7.5  $\mu\text{L}$  of PCR water, 2.5  $\mu\text{L}$  of  $10 \times$  reaction buffer without  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{L}$  of  $25 \text{ mmol}^{-1} \text{ MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{L}$  of DMSO, 1  $\mu\text{L}$  of dNTP mix ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  of primer M13 ( $10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$  of *Taq* 1.1 DNA polymerase ( $5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ), and 5  $\mu\text{L}$  of bacterial DNA ( $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ). The amplification reaction was carried out using the following cycle parameters: 5 min of the initial denaturation period at  $94^\circ\text{C}$  (hot start), 1 min of denaturation at  $94^\circ\text{C}$ , 1 min of primer annealing at  $45^\circ\text{C}$ , and 1 min of extension at  $72^\circ\text{C}$ . The final polymerisation step was prolonged to 10 min. The samples were subjected to 42 cycles of amplification.

The rep-PCR was carried out using (GTG)<sub>5</sub> primer (Table 1). The reaction mixture consisted of 8  $\mu\text{L}$  of PCR water, 2.5  $\mu\text{L}$  of  $10 \times$  reaction buffer without  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{L}$  of  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{L}$  of DMSO, 1  $\mu\text{L}$  of dNTP mix ( $10 \text{ mmol}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  of primer (GTG)<sub>5</sub> ( $10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  of *Taq* 1.1 DNA polymerase ( $5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ), and 5  $\mu\text{L}$  of bacterial DNA. The amplification reaction was carried out using the following cycle parameters: 5 min of the initial denaturation period at  $94^\circ\text{C}$  (hot start), 1 min of denaturation at  $94^\circ\text{C}$ , 1 min of primer annealing at  $49.8^\circ\text{C}$ , and 1 min of extension at  $72^\circ\text{C}$ . The final polymerisation step was prolonged to 10 min. The samples were subjected to 35 cycles of amplification. The amplification products from rep-PCR and RAPD-PCR were analysed by agarose gel electrophoresis (1.4 %) in "0.5 $\times$ " TBE ( $45 \text{ mmol L}^{-1}$  boric acid,  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-base,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA, pH 8.0) buffer at 40 V for 16 h (gel length was 30 cm).

The similarities of RAPD-PCR and rep-PCR banding patterns were calculated using the Pearson correlation coefficients. BioNumerics software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) was used to construct dendrograms based on UPGMA analysis. A DNA marker 100bp ladder supplemented with linearised plasmid pUC19 (2686 bp) was used for gel electrophoresis.

### Results and discussion

The 31 RL strains from infant faeces, 5 CCDM strains from dairy products, 1 CCDM strain from silage and 11 type and collection strains were identified using genus-specific PCR as the *Lactobacillus* genus. Subsequently, the 10 species-specific PCRs were used to identify the *Lactobacillus* species of the strains tested. The RL strains isolated from infant faeces were

identified as 6 species: *L. rhamnosus* (9 strains), *L. gasseri* (6 strains), *L. paracasei* (4 strains), *L. fermentum* (4 strains), *L. salivarius* (2 strains), and *L. plantarum* (1 strain). The identification of *L. rhamnosus* and *L. paracasei* strains was confirmed using multiplex PCR (Table 2). One specific PCR product for strains of *L. rhamnosus* (540 bp) and two specific PCR products of strains of *L. paracasei* (540 bp and 200 bp) were detected. Strain RL20 was identified as *L. helveticus* using 16S rDNA sequencing and 4 strains were not identified (Table 2). The CCDM strains isolated from dairy products and silage were identified as *L. rhamnosus* (6 strains).

The lactobacilli isolated from full-term breastfed babies were classified into 7 *Lactobacillus* species. All the 7 species (*L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, and *L. helveticus*) were previously detected in the human gastrointestinal tract (Wall et al., 2007; Mitsou et al., 2008; Štěpetova et al., 2011). Wall et al. (2007) revealed that the human intestine was initially colonised by only a few (1–2) different cultivable strains, whereas in adults the pattern became more complex with a higher diversity of strains. Mitsou et al. (2008) found a predominance of *L. rhamnosus* and *L. paracasei* species in the gut microflora in the first month of life (this conforms with the results shown in this paper). However, Wall et al. (2007) detected strains of *L. rhamnosus* and *L. casei/paracasei* mainly in adults. Strains of *L. rhamnosus* are widely used in dairy products including cheese products or probiotic dairy products (Bernardeau et al., 2006). *L. buchneri* strains are frequently used as silage starter cultures. Strains of *L. rhamnosus* are used for silage fermentation in combination with *L. buchneri* strains (Li & Nishino, 2011).

The species identification of RL6, RL7, RL27, and RL28 strains did not succeed, either by using species-specific PCRs or by sequencing the gene for 16S rRNA (Table 2). The 4 unidentified strains were classified according to BLAST into *L. vaginalis/panis/frumentii/pontis/oris/antri*-related species. It was confirmed that the sequencing of the 16S rRNA gene was not always a suitable method for the discrimination of these *Lactobacillus* species and other methods should be used for their identification, e.g. the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences (Ferchichi et al., 2008).

Species identification of strains of the *L. casei* group (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) was confirmed using multiplex PCR. Multiplex PCR confirmed species identification of all these strains with the exception of the collection strains *L. casei* CCM 4798 and *L. casei* CCM 4791. These strains were identified as *L. paracasei* using both species-specific PCR and multiplex PCR.

Genotyping methods such as rep-PCR and RAPD-PCR were used to confirm species identification (polyphasic approach) and to evaluate genetic vari-

**Table 2.** Identification of *Lactobacillus* strains using species-specific PCRs, multiplex PCR, and rep-PCR + RAPD-PCR

<i>Lactobacillus</i> strain	Source	Species-specific PCR	Multiplex PCR	rep-PCR+RAPD-PCR <sup>a</sup>
RL1	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
RL2	Infant faeces	<i>L. gasseri</i>	NP	<i>L. gasseri</i>
RL3	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
RL4	Infant faeces	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>
RL5	Infant faeces	<i>L. gasseri</i>	NP	<i>L. gasseri</i>
RL6 <sup>b</sup>	Infant faeces	ND	NP	<i>L. gasseri</i>
RL7 <sup>b</sup>	Infant faeces	ND	NP	ND
RL8	Infant faeces	<i>L. gasseri</i>	NP	<i>L. gasseri</i>
RL9	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
RL10	Infant faeces	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>
RL11	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
RL12A	Infant faeces	<i>L. fermentum</i>	NP	<i>L. fermentum</i> <sup>c</sup>
RL12B	Infant faeces	<i>L. fermentum</i>	NP	<i>L. fermentum</i> <sup>c</sup>
RL13	Infant faeces	<i>L. gasseri</i>	NP	<i>L. gasseri</i>
RL14	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
RL15	Infant faeces	<i>L. salivarius</i>	NP	<i>L. gasseri</i>
RL16	Infant faeces	<i>L. salivarius</i>	NP	<i>L. salivarius</i>
RL17	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
RL18	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
RL19	Infant faeces	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>
RL20	Infant faeces	ND	NP	<i>L. rhamnosus</i> <sup>e</sup>
RL21	Infant faeces	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>
RL22	Infant faeces	<i>L. gasseri</i>	NP	<i>L. gasseri</i>
RL23	Infant faeces	<i>L. fermentum</i>	NP	<i>L. fermentum</i> <sup>c</sup>
RL24	Infant faeces	<i>L. gasseri</i>	NP	<i>L. gasseri</i>
RL25	Infant faeces	<i>L. fermentum</i>	NP	<i>L. fermentum</i>
RL26	Infant faeces	<i>L. plantarum</i>	NP	<i>L. plantarum</i> <sup>d</sup>
RL27 <sup>b</sup>	Infant faeces	ND	NP	ND
RL28 <sup>b</sup>	Infant faeces	ND	NP	ND
RL29	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
RL30	Infant faeces	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
CCDM 83/00	Dairy product	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
CCDM 148/00	Dairy product	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
CCDM 154/02	Dairy product	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
CCDM 158/00	Silage	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
CCDM 821/00	Dairy product	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
CCDM 963/00	Dairy product	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>

a) 76 % similarity level; b) species identification using 16S rDNA sequencing as *L. vaginalis/panis/frumenti/pontis/oris/antri*; c) 65 % similarity level; d) 70 % similarity level; e) species identification using 16S rDNA sequencing as *L. helveticus*; ND = not determined; NP = not performed.

ability and relatedness between the strains. Rep-PCR with primer (GTG)<sub>5</sub> and RAPD-PCR with primer M13 have already been published for lactobacilli typing (Gevers et al., 2001; Rossetti & Giraffa, 2005; Švec et al., 2010). In the case of M13 fingerprint profiles, it was impossible to distinguish single groups according to species. The RAPD-PCR fingerprint profiles were relatively heterogenic. This variability can be useful for intraspecies differentiation in strains of *Lactobacillus* species, for example *L. rhamnosus* (see Fig. 1). The strains of *L. rhamnosus* formed a single group at a similarity level of 72 % in contrast to the similarity level of 85 % in the case of rep-PCR (results not shown).

With regard to the above results, rep-PCR fingerprint profiles were used for confirmation of species identification and determination of relatedness between strains. The results of fingerprinting using rep-PCR with (GTG)<sub>5</sub> primer are given in Fig. 2. The

strains were clustered in 8 groups at a similarity level of 75 %. Strains of *L. fermentum* were clustered in group I (RL25, RL23, RL12B, and CCM 7192<sup>T</sup>) and group II (RL12A). The strains clustered in groups I and II were identified using species-specific PCR as *L. fermentum*. The strains form a single group at a similarity level of 60 %. Three strains of *L. gasseri* formed group III (RL13, RL8, and RL2). The remaining *L. gasseri* strains (RL22, RL24, and RL5), *L. gasseri* K7, and *L. gasseri* CCM 7009<sup>T</sup> were clustered together with all *L. rhamnosus* strains in group V. Three strains, namely RL6 (unidentified), RL20 (identified using 16S rDNA sequencing as *L. helveticus*), and RL16 (*L. salivarius*) were also clustered in group V. *L. paracasei* strains formed group IV (RL21, RL4, RL19, RL10, CCM 1753<sup>T</sup>, CCM 7092<sup>T</sup>, *L. casei* CCM 4791, and *L. casei* CCM 4798), *L. plantarum* group VI (RL26 and CCM 7039<sup>T</sup>), and *L. salivarius* group VII (RL15 and CCM 7274). Strains RL27, RL7,



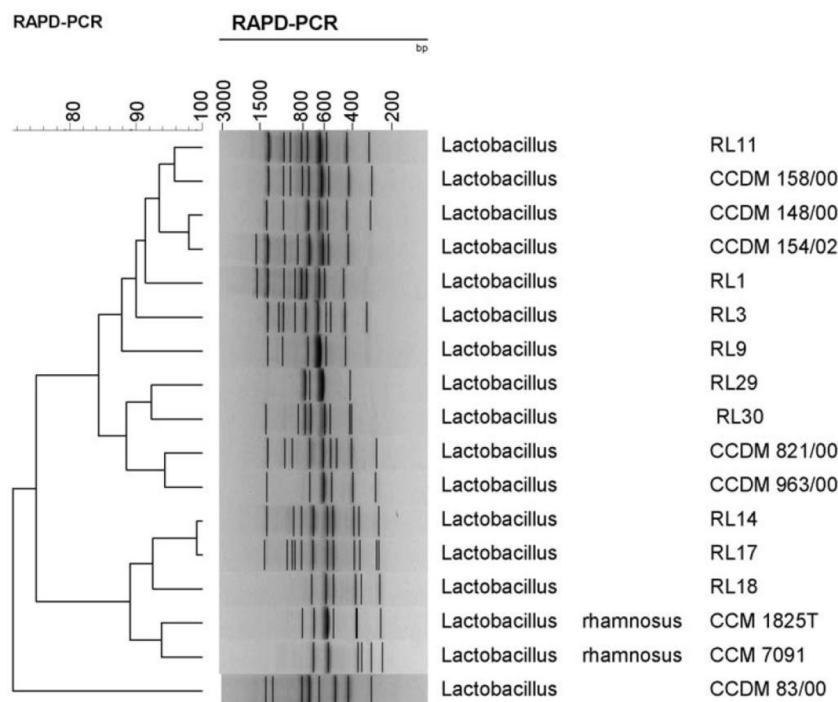


Fig. 1. Dendrogram generated from RAPD-PCR patterns using UPGMA analysis and Pearson's correlation coefficient. DNAs of the 17 strains of *Lactobacillus rhamnosus* species were amplified for creating fingerprint profiles.

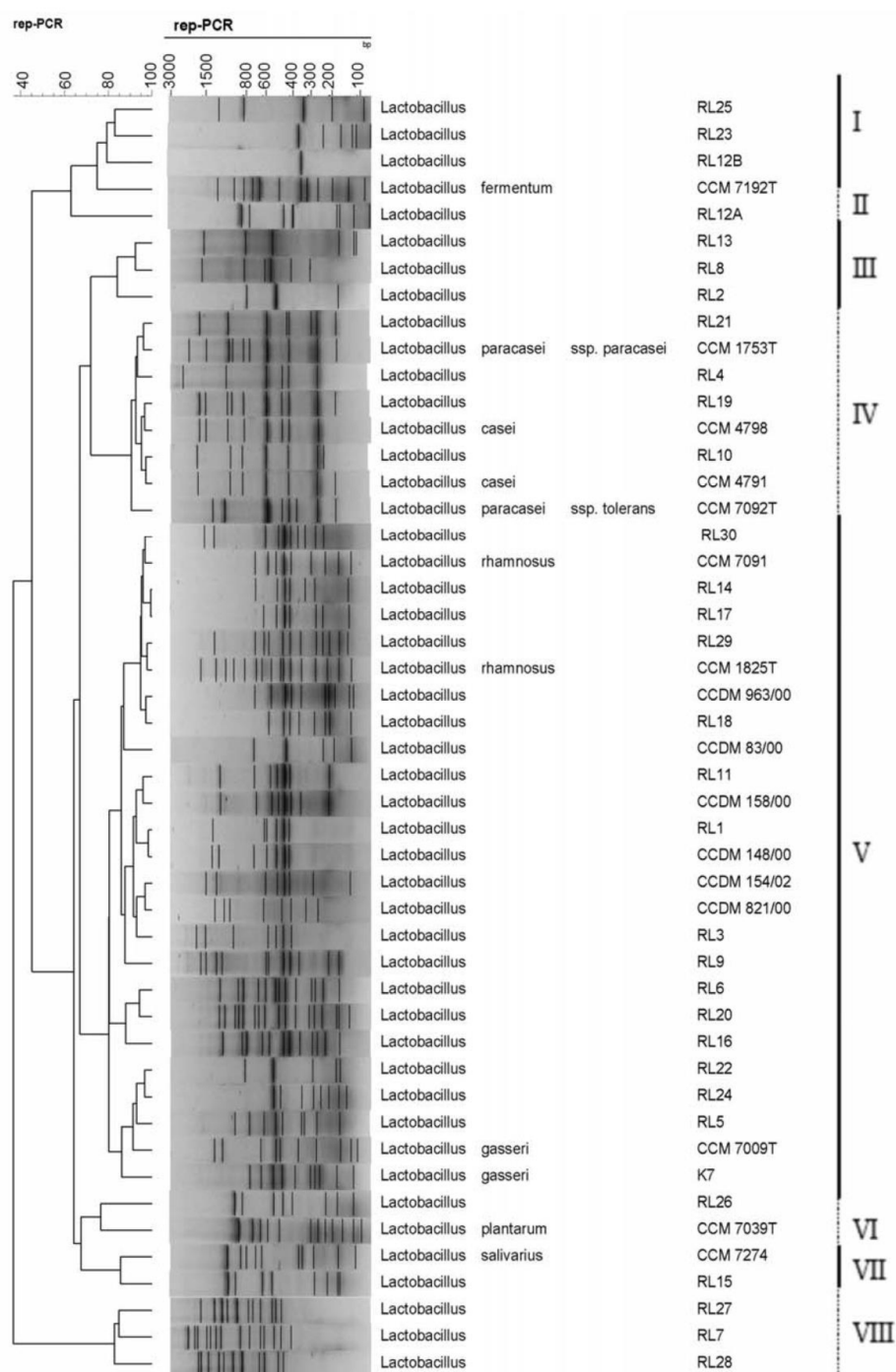
and RL28 (all unidentified) were clustered in group VIII.

The best results of species discrimination were achieved by a combination of rep-PCR with (GTG)<sub>5</sub> and RAPD-PCR profiles using M13 primer (Fig. 3). The strains were clustered according to species with the type and collection strains into 10 groups at a similarity level of 76 %, with some exceptions. *L. rhamnosus* strains formed a single group III (with the exception of RL20 strain identified using 16S rDNA sequencing as *L. helveticus*). Strains of *L. salivarius* (RL16 and CCM 7274) and *L. paracasei* (RL4, RL21, RL19, RL10, CCM 7092<sup>T</sup>, CCM 1735<sup>T</sup>, *L. casei* CCM 4791, and *L. casei* CCM 4798) formed species-specific groups II and IV, respectively. *L. gasseri* strains (RL22, RL24, RL5, RL2, RL13, RL8, CCM 7009<sup>T</sup>, and K7) were clustered into a single group (I) with the exception of RL6 (unidentified) and RL15 (*L. salivarius*) strains. Strains of *L. plantarum* (RL26 and CCM 7039<sup>T</sup>) formed one group at a similarity level of 70 % but two groups (V and VI) at a similarity level of 76 %. Strains of *L. fermentum* were divided into three groups: VII (RL25, RL23, and CCM 7192<sup>T</sup>), VIII (RL12A), and IX (RL12B) at a similarity level of 76 %. Groups VII, VIII, and IX formed one cluster at a similarity level of 65 % (Table 2). The remaining strains

RL7, RL27, and RL28 (all unidentified) formed group X.

It was also impossible to distinguish between strains isolated from infant faeces, from dairy products, and from silage. Moreover, the fingerprint profiles of strains *L. rhamnosus* RL11 (isolated from faecal samples) and CCDM 158/00 (isolated from silage) were very similar (similarity level exceeding 95 %). The fingerprint profiles of *L. rhamnosus* RL14 and RL17 (from faeces of 2 babies) were also almost identical (similarity level over 98 %).

The closely related species of *L. casei* group (*L. casei*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus*) have historically been difficult to distinguish using traditional methods. Despite its importance in the food industry, the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group is still unclear (Desai et al., 2006). Many strains have very similar physiological properties and nutritional requirements. In this study, the collection strains *L. casei* CCM 4798 and *L. casei* CCM 4791 formed one cluster with all *L. paracasei* strains in rep-PCR fingerprint profiles and RAPD-PCR ones and should be classified as *L. paracasei*. The results from species-specific PCRs and multiplex PCR were confirmed by fingerprinting. The problems in the taxonomy of *L. casei* and *L. paracasei* strains and their type strain *L. casei* ssp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> (= ATCC 393<sup>T</sup>) have long been known and the



**Fig. 2.** Dendrogram generated from rep-PCR patterns ((GTG)<sub>5</sub>) using UPGMA analysis and Pearson's correlation coefficient. DNAs of the collection and type strains and strains from faeces, dairy products, and silage were amplified for creating fingerprint profiles.

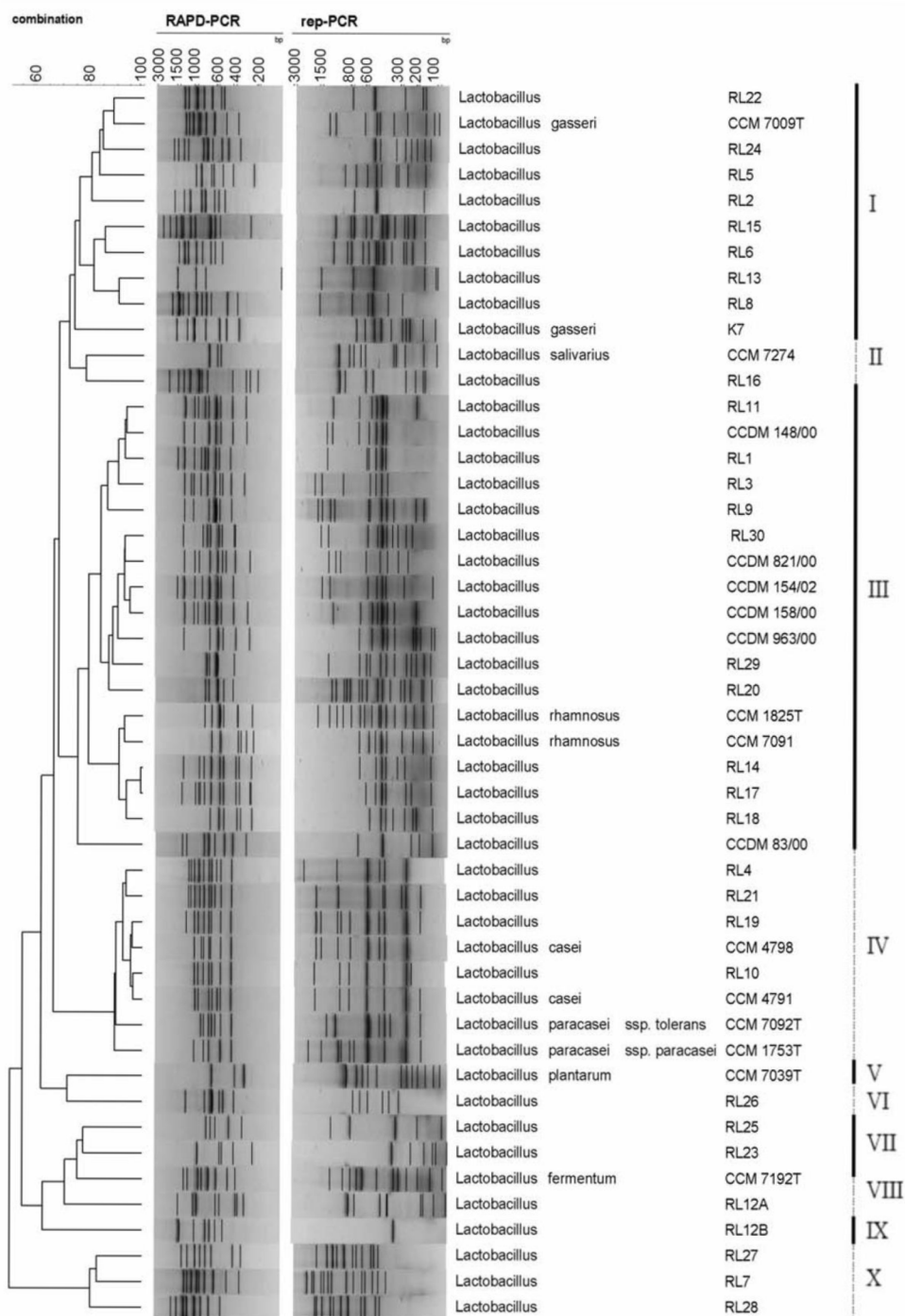


Fig. 3. Dendrogram generated from rep-PCR ((GTG)<sub>5</sub>) and RAPD-PCR (M13) patterns using UPGMA analysis and Pearson's correlation coefficient. DNAs of the collection and type strains and strains from faeces, dairy products, and silage amplified for fingerprint profiling.



taxonomic status of this species remains unclear (Dellaglio et al., 1991, 2002; Dicks et al., 1996; Klein, 2007; Švec et al., 2010).

### Conclusions

In total, 37 strains of the *Lactobacillus* genus were analysed using different DNA amplification methods. From the results of this work, 27 strains isolated from the faeces of full-term breastfed babies were identified as *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, and *L. helveticus*. Four strains remained unidentified. The strains isolated from dairy products and silage were identified as *L. rhamnosus*. The genotyping method rep-PCR with (GTG)<sub>5</sub> primer proved more reliable for the identification of *Lactobacillus* species; RAPD-PCR with M13 primer was more suitable for differentiation between strains and for evaluation of intra-species variability. A combination of both fingerprinting methods – rep-PCR and RAPD-PCR – enabled a more precise species identification at the same similarity level than rep-PCR alone.

*Acknowledgements.* Financial support from a long-term research programme of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (MSM 0021622415) and grant No. 2B06053 are gratefully acknowledged.

### References

- Ben Amor, K., Vaughan, E. E., & de Vos, W. M. (2007). Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition*, 137, 741S–747S.
- Bernardeau, M., Guguen, M., & Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 487–513. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x.
- Byun, R., Nadkarni, M. A., Chhour, K. L., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3128–3136. DOI: 10.1128/jcm.42.7.3128-3136.2004.
- Dellaglio, F., Dicks, L. M. T., Du Toit, M., & Torriani, S. (1991). Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 340–342. DOI: 10.1099/00207713-41-2-340.
- Dellaglio, F., Felia, G. E., & Torriani, S. (2002). The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 285–287.
- Desai, A. R., Shah, N. P., & Powell, I. B. (2006). Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. *Journal of Dairy Science*, 89, 3345–3351. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72371-2.
- Dicks, L. M. T., Du Plessis, E. M., Dellaglio, F., & Lauer, E. (1996). Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zaei* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 337–340. DOI: 10.1099/00207713-46-1-337.
- Dubernet, S., Desmaures, N., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiological Letters*, 214, 271–275. DOI: 10.1016/S0378-1097(02)00895-9.
- Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2005). Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 31–42. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.06.004.
- Ferchichi, M., Valcheva, R., Prévost, H., Onno, B., & Dousset, X. (2008). A one-step reaction for the rapid identification of *Lactobacillus mindensis*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus pontis* and *Lactobacillus frumenti* using oligonucleotide primers designed from the 16S–23S rRNA intergenic sequences. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1797–1807. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03712.x.
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31–36. DOI: 10.1016/S0378-1097(01)00439-6.
- Klein, G. (2007). International committee on systematics of prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1367–1369. DOI: 10.1099/ijs.0.65143-0.
- Lí, Y., & Nishino, N. (2011). Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 314–321. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2010.03000.x.
- Mitsou, E. K., Kirtzalidou, E., Oikonomou, I., Liosis, G., & Kyriacou, A. (2008). Fecal microflora of Greek healthy neonates. *Anaerobe*, 14, 94–101. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2007.11.002.
- Rossetti, L., & Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 135–144. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.03.001.
- Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual (II)* (3rd ed.). New York, NY, USA: Cold Spring Laboratory Harbor Press.
- Sisto, A., De Bellis, P., Visconti, A., Morelli, L., & Lavermicocca, P. (2009). Development of a PCR assay for the strain-specific identification of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 59–65. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.017.
- Štěpetova, J., Sepp, E., Kolk, H., Lõivukene, K., Songisepp, E., & Mikelsaar, M. (2011). Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly. *British Journal of Nutrition*, 105, 1235–1244. DOI: 10.1017/S0007114510004770.
- Švec, P., Kukletová, M., & Sedláček, I. (2010). Comparative evaluation of automated ribotyping and RAPD-PCR for typing of *Lactobacillus* spp. occurring in dental carries. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 85–92. DOI: 10.1007/s10482-010-9432-6.
- Verdenelli, M. C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianes, C., Cecchini, C., & Cresci, A. (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition*, 48, 355–363. DOI: 10.1007/s00394-009-0021-2.
- Wall, R., Fitzgerald, G., Hussey, S., Ryan, T., Murphy, B., Ross, P., & Stanton, C. (2007). Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal adult gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 127–137. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00202.x.



- Walter, J., Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D. M., Munro, K., & Alatossava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 297–303. DOI: 10.1128/aem.66.1.297-303.2000.
- Ward, L. J. H., & Timmins, M. J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 90–92. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00586.x.

## Příloha 2

### Mnohonásobné přiložení sekvencí pro gassericin K7A a acidocin LF221A s využití DNA RL2

#### Multiple sequence alignment - *gassericin K7A* a sekvence produktu PCR získaného s primery *GasA\_1F/R* a DNA kmene RL2

```
gassericinK7A      AGCCAGTTTCTGTAGGAACAGGTGCACTAATCGGTGCAAGTCTGGTGCAATTGGCGGAT 360
RL2                -----GACAGGTGCACTAATCGGTGCAAGTCTGGTGCAATTGGCGGAT 44
                  .*****

gassericinK7A      CAGTACAATGTGTGGGCTGGTTAGCTGGAGGTGGAAGATAATGATCGAAAAAGTTTCTAA 420
RL2                CAGTACAATGTGTGGGCTG-----GAA----- 66
                  *****                               ***
```

#### Multiple sequence alignment – *acidocin LF221A* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasA\_1F/R* a DNA kmene RL2

```
acidocin LF221A    GATCCTTTTTTGGTTCAGCCAGTTTCTGTAGGAACAGGTGCACTAATCGGTGCAAGTCTG 60
RL2                -----GACAGGTGCACTAATCGGTGCAAGTCTG 29
                  .*****

acidocin LF221A    GTGCAATTGGCGGATCAGTACAATGTGTGGGCTGGTTAGCTGGAGGTGGAAGATAATGAT 120
RL2                GTGCAATTGGCGGATCAGTACAATGTGTGGGCT-----GGAA----- 66
                  *****                               ****
```

#### Multiple sequence alignment - *gassericin K7A* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasA\_2F/R* a DNA kmene RL2

```
gassericinK7A      ATGTGGTAAAGGTGCAGTAATGGAAATATATTTTCGGGAATCCCATATTAGGGTGCGCTAA 540
RL2                -----ATATTAGGGTGCGCTAA 17
                  *****

gassericinK7A      CGGAGCTGCAACATCATTGGTTCTACAACTGCTAGTGAATATATAAAAATTATCAAAA 600
RL2                CGGAGCTGCAACATCATTGGTTCTACAACTGCTAGTGAAT----- 59
                  *****
```

#### Multiple sequence alignment – *acidocin LF221A* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasA\_2F/R* a DNA kmene RL2

```
acidocin LF221A    TAGTGTTGCAGGATCATGTGGTAAAGGTGCAGTAATGGAAATATATTTTCGGGAATCCCAT 240
RL2                -----AT 2
                  **

acidocin LF221A    ATTAGGGTGCGCTAACGGAGCTGCAACATCATTGGTTCTACAACTGCTAGTGAATATA 300
RL2                ATTAGGGTGCGCTAACGGAGCTGCAACATCATTGGTTCTACAACTGCTAGTGAAT--- 59
                  *****
```

**Multiple sequence alignment - *gassericin K7A* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasA\_3F/R* a DNA kmene RL2**

```

gassericinK7A      AATTATACCAATATAGTAGCTCTAATACAGACACTATTACATAAGAAAAATGAAAAATA 720
RL2                -----TA 2
                                     **

gassericinK7A      TTATTTTGATAAAATCTTTTGGAGCCTATGCAGGTAAAAATAATCCAAAATATCTGTTTAA 780
RL2                TTATTTTGATAAAATCTTTTGGAGCCTATGCAGGTAAAAATAATCCAAAATATA----- 55
                *****

gassericinK7A      TAATGTTGAACATCATGATTTTTTCCATGTATTTTATCAGTATTTTATTTGCTCATATAT 840
RL2                ----GTCG----- 59
                **.*
    
```

**Multiple sequence alignment – *acidocin LF221A* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasA\_3F/R* a DNA kmene RL2**

```

acidocin LF221A    GAAAAATGAAAAATATTATTTTGATAAAATCTTTTGGAGCCTATGCAGGTAAAAATAATCC 480
RL2                -----TATTATTTTGATAAAATCTTTTGGAGCCTATGCAGGTAAAAATAATCC 47
                *****

acidocin LF221A    AAAATATCTGTTTAATAATGTTGAACATCATGATTTTTTCCATGTATTTTATCAGTATTT 540
RL2                AAAATATA-----GTCG----- 59
                ***** **.*
    
```

**Mnohonásobné přiložení sekvencí pro *gassericin K7B* s využitím DNA RL2, RL2-P a RL22-P**

**Multiple sequence alignment - *gassericin K7B* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasB\_4F/R* a DNA kmene RL2**

```

gassericin K7B     TAAGAAATGTAATGGGTGGAAACAAGTGGGGGAATGCTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAG 2700
RL2                -----ATAGGAGCTGCTACGGGAG 19
                *****

gassericin K7B     CTACTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGACCATGGGGAATGACTGCCTGTGCGT 2760
RL2                CTACTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCG----- 53
                *****
    
```

**Multiple sequence alignment - *gassericin K7B* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasB\_5F/R* a DNA kmene RL2**

```

gassericin K7B     CAAATTATAAAGATGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTGGCCATATCGT 3120
RL2                -----GAATTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTGGCCATATCGT 40
                *****

gassericin K7B     TTGTAATAGGAAAAATATTAAGAAAGTAAATAAAAAGTAAATAAAAAGTAAATAAAAAGTAA 3180
RL2                TTGTAATAGGAAC----- 53
                *****
    
```

**Multiple sequence alignment - gassericin K7B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_4F/R a DNA kmene RL2-P**

```

gassericin K7B TAAGAAATGTAATGGGTGGAACAAGTGGGGGAATGCTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAG 2700
RL2-P          -----TGCTACGGGAG 11
                      *****

gassericin K7B CTA CTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGGACCATGGGGAATGACTGCCTGTGCGT 2760
RL2-P          CTA CTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCG----- 44
                      *****
    
```

**Multiple sequence alignment - gassericin K7B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_5F/R a DNA kmene RL2-P**

```

gassericin K7B CAAATTATAAAGATGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTTGGCCATATCGT 3120
RL2-P          -----AGATGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTTGGCCATATCGT 50
                      *****

gassericin K7B TTGTAATAGGAAAAATATTA AAAAGAATCATAAGAAAGTAATAATAAACTGAAAGTACT 3180
RL2-P          TTGTAA----- 56
                      *****
    
```

**Multiple sequence alignment - gassericin K7B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_4F/R a DNA kmene RL22-P**

```

gassericin K7B TAAGAAATGTAATGGGTGGAACAAGTGGGGGAATGCTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAG 2700
RL22-P         -----AGGAGCTGCTACGGGAG 19
                      *****

gassericin K7B CTA CTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGGACCATGGGGAATGACTGCCTGTGCGT 2760
RL22-P         CTA CTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGG----- 53
                      *****
    
```

**Multiple sequence alignment - gassericin K7B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_5F/R a DNA kmene RL22-P**

```

gassericin K7B CAAATTATAAAGATGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTTGGCCATATCGT 3120
RL22-P         -----TGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTTGGCCATATCGT 50
                      *****

gassericin K7B TTGTAATAGGAAAAATATTA AAAAGAATCATAAGAAAGTAATAATAAACTGAAAGTACT 3180
RL22-P         TTGTAA----- 56
                      *****
    
```

**Mnohonásobné přiložení sekvencí pro acidocin LF221B s využitím DNA RL2, RL2-P a RL22-P**

**Multiple sequence alignment – acidocin LF221B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_4F/R a DNA kmene RL2**

```

acidocinLF221B AAATGTAATGGGTGGAACAAGTGGGGGAATGCTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAGCTAC 1200
RL2            -----ATAGGAGCTGCTACGGGAGCTAC 23
                      *****

acidocinLF221B TCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGGACCATGGGGAATGACTGCCTGTGCGTTAGG 1260
RL2            TCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGG----- 53
                      *****
    
```

**Multiple sequence alignment – acidocin LF221B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_5F/R a DNA kmene RL2**

```

acidocinLF221B  TTATAAAGATGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTGGCCATATCGTTTGT 1620
RL2             -----GAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTGGCCATATCGTTTGT 44
                *****
acidocinLF221B  AATAGGAAAAATATTTAAAAGAATCATAAGAAAGTAATAATAAACTGAAAGTACTAAAT 1680
RL2             AATAGGAAC----- 53
                *****
    
```

**Multiple sequence alignment - acidocin LF221B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_4F/R a DNA kmene RL2-P**

```

acidocinLF221B  AAATGTAATGGGTGGAACAAGTGGGGAATGCTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAGCTAC 1200
RL2-P           -----TGCTACGGGAGCTAC 15
                *****
acidocinLF221B  TCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGGACCATGGGGAATGACTGCCTGTGCGTTAGG 1260
RL2-P           TCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCG----- 44
                *****
    
```

**Multiple sequence alignment - acidocin LF221B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_5F/R a DNA kmene RL2-P**

```

acidocinLF221B  TTATAAAGATGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTGGCCATATCGTTTGT 1620
RL2-P           -----AGATGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTGGCCATATCGTTTGT 54
                *****
acidocinLF221B  AATAGGAAAAATATTTAAAAGAATCATAAGAAAGTAATAATAAACTGAAAGTACTAAAT 1680
RL2-P           AA----- 56
                **
    
```

**Multiple sequence alignment - acidocin LF221B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_4F/R a DNA kmene RL22-P**

```

acidocinLF221B  AAATGTAATGGGTGGAACAAGTGGGGAATGCTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAGCTAC 1200
RL22-P          -----AGGAGCTGCTACGGGAGCTAC 21
                *****
acidocinLF221B  TCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGGACCATGGGGAATGACTGCCTGTGCGTTAGG 1260
RL22-P          TCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGG----- 51
                *****
    
```

**Multiple sequence alignment - acidocin LF221B a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_5F/R a DNA kmene RL22-P**

```

acidocinLF221B  TTATAAAGATGGAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTGGCCATATCGTTTGT 1620
RL22-P          -----TGGAAATAGAATTTTGGGTTTATTTTCGTAATAATTTGGCCATATCGTTTGT 51
                *****
acidocinLF221B  AATAGGAAAAATATTTAAAAGAATCATAAGAAAGTAATAATAAACTGAAAGTACTAAAT 1680
RL22-P          AA----- 53
                **
    
```

## Mnohonásobné přiložení sekvencí pro gassericin T s využitím DNA RL2, RL2-P a RL22-P

### Multiple sequence alignment – *gassericin T* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasB\_4F/R* a DNA kmene RL2

```
gassericinT   CTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAGCTACTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGGAC 2340
RL2           -----ATAGGAGCTGCTACGGGAGCTACTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGG-- 53
              *****
```

### Multiple sequence alignment – *gassericin T* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasB\_5F/R* a DNA kmene RL2

```
gassericin T  TTGAAGTTAAATTATATAATTCAACAAATATAAAGATGGAATAGAATTTGGGTTTATT 2700
RL2           -----GAATTTGGGTTTATT 16
              *****
```

```
gassericin T  TCGTACTAATTTGGCCATATCGTTTGTAAATAGGAAAAATATAAAAAGAATCATAAGAA 2760
RL2           TCGTACTAATTTGGCCATATCGTTTGTAAATAGGAAC----- 53
              *****
```

### Multiple sequence alignment – *gassericin T* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasB\_4F/R* a DNA kmene RL2-P

```
gassericinT   CTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAGCTACTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGGAC 2340
RL2-P         -----TGCTACGGGAGCTACTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCG--- 44
              *****
```

### Multiple sequence alignment – *gassericin T* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasB\_5F/R* a DNA kmene RL2-P

```
gassericinT   TTGAAGTTAAATTATATAATTCAACAAATATAAAGATGGAATAGAATTTGGGTTTATT 2700
RL2-P         -----AGATGGAATAGAATTTGGGTTTATT 26
              *****
```

```
gassericinT   TCGTACTAATTTGGCCATATCGTTTGTAAATAGGAAAAATATAAAAAGAATCATAAGAA 2760
RL2-P         TCGTACTAATTTGGCCATATCGTTTGTAA----- 56
              *****
```

### Multiple sequence alignment – *gassericin T* a sekvence PCR produktu získaného s primery *GasB\_4F/R* a DNA kmene RL22-P

```
gassericinT   CTGTAATAGGAGCTGCTACGGGAGCTACTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGGAC 2340
RL22-P        -----AGGAGCTGCTACGGGAGCTACTCGCGGAGTAAGTTGGTGCAGAGGATTCGG-- 51
              *****
```

*Multiple sequence alignment – gassericin T a sekvence PCR produktu získaného s primery GasB\_5F/R a DNA kmene RL22-P*

```
gassericinT      TTGAAGTTAAATTATATAATTCAACAAATATAAAGATGGAATAGAATTTGGGTTTATT 2700
RL22-P          -----TGAATAGAATTTGGGTTTATT 23
                *****

gassericinT      TCGTACTAATTTGGCCATATCGTTTGTAATAGGAAAAATATTAAGAATCATAAGAA 2760
RL22-P          TCGTACTAATTTGGCCATATCGTTTGTA----- 53
                *****
```

**DETECTION AND QUANTIFICATION OF PROBIOTIC STRAIN *LACTOBACILLUS GASSERI* K7 IN  
FAECAL SAMPLES BY TARGETING BACTERIOCIN GENES**

Primož Treven, Kristýna Turková, Aljoša Trmčič, Tanja Obermajer, Irena Rogelj, Bojana Bogovič  
Matijašič

*Folia Microbiologica* 58:623-630 (2013)

DOI:10.1007/s12223-013-0252-8



## Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes

Primož Treven · Kristyna Turkova ·  
Aljoša Trmčič · Tanja Obermajer · Irena Rogelj ·  
Bojana Bogovič Matijašič

Received: 5 October 2012 / Accepted: 12 April 2013 / Published online: 25 April 2013  
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2013

**Abstract** *Lactobacillus gasseri* K7 is a probiotic strain that produces bacteriocins gassericin K7 A and K7 B. In order to develop a real-time quantitative PCR assay for the detection of *L. gasseri* K7, 18 reference strains of the *Lactobacillus acidophilus* group and 45 faecal samples of adults who have never consumed strain K7 were tested with PCR using 14 pairs of primers specific for gassericin K7 A and K7 B gene determinants. Incomplete gassericin K7 A or K7 B gene clusters were found to be dispersed in different lactobacilli strains as well as in faecal microbiota. One pair of primers was found to be specific for the total gene cluster of gassericin K7A and one for gassericin K7B. The real-time PCR analysis of faecal samples spiked with K7 strain revealed that primers specific for the gene cluster of the gassericin K7 A were more suitable for quantitative determination than those for gassericin K7 B, due to the lower detection level. Targeting of the gassericin K7 A or K7 B

gene cluster with specific primers could be used for detection and quantification of *L. gasseri* K7 in human faecal samples without prior cultivation. The results of this study also present new insights into the prevalence of bacteriocin-encoding genes in gastrointestinal tract.

### Background

According to the old definition from the 1970s, bacteriocins are a heterogeneous group of ribosomal synthesised antimicrobial proteins from bacteria that act in a bactericidal or bacteriostatic manner toward closely related species (Tagg et al. 1976). It is now evident that bacteriocins may appear in many forms and elicit bactericidal activity beyond species that are closely related or confined within the same ecological niche (Cotter et al. 2005). Their production is found among Gram-negative and Gram-positive bacteria, including lactic acid bacteria and bifidobacteria representing the most common probiotics (Bogovič-Matijašič and Rogelj 2011). Many isolates from human faecal samples secrete bacteriocins (Collado et al. 2005; Itoh et al. 1995; Matijašič and Rogelj 1999). The overall portion of bacteriocin-secreting bacteria compared to the rest of faecal microbiota is still not known. The frequency of bacteriocin producers can vary depending on the host they were isolated from (Gillor et al. 2008; Hacin et al. 2008), the host's diet, temporal changes, and the type of bacteriocins produced.

*Lactobacillus gasseri* K7 is an isolate from a child's faeces with in vitro and in vivo established probiotic properties (Rogelj and Matijašič 2006). The gassericins K7 A (gassericin K7A [GenBank: EF392861]) and K7 B (gassericin K7 B [GenBank: AY307382]) produced by this strain are among the first characterised bacteriocins of human-derived probiotic bacteria (Zorič Peternel et al. 2010), which are particularly interesting due to a wide range of activity against

P. Treven (✉) · A. Trmčič · T. Obermajer · I. Rogelj ·  
B. B. Matijašič  
Biotechnical Faculty, Institute of Dairy Science and Probiotics,  
University of Ljubljana, Groblje 3,  
1230 Domžale, Slovenia  
e-mail: Primoz.Treven@bf.uni-lj.si

A. Trmčič  
e-mail: Aljosa.Trmcic@bf.uni-lj.si

T. Obermajer  
e-mail: Tanja.Obermajer@bf.uni-lj.si

I. Rogelj  
e-mail: Irena.Rogelj@bf.uni-lj.si

B. B. Matijašič  
e-mail: Bojana.Bogovic@bf.uni-lj.si

K. Turkova  
Faculty of Chemistry, Institute of Food Science and  
Biotechnology, Brno University of Technology,  
Purkyňova 464/118,  
612 00 Brno, Czech Republic  
e-mail: xoturkovak@fch.vutbr.cz

Gram-positive bacteria, including *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* (Bogovič-Matijašič and Rogelj 2000). Based on the typical characteristics of their genes, gassericin K7 A and gassericin K7 B (homologous to gassericin T produced by *L. gasseri* SBT2055 (Kawai et al. 2000)) have been classified as members of the two-peptide (class IIb) bacteriocins (Zorič Peternel et al. 2010). DNA sequence analysis of the 1,143-bp gassericin K7 A gene region identified three open reading frames (ORFs) encoding the putative complementary peptide, the active peptide and the putative immunity protein organised in one transcriptional unit (Fig. 1a). Similarly, gassericin K7 B gene region (3,276-bp SspI/HindIII fragment) is organised in one transcriptional unit but consists of six ORFs, coding for a putative ABC transporter, a putative accessory protein, a hypothetical protein, a putative complementary peptide to the active peptide, the active peptide and a putative immunity protein (Fig. 1b).

In a previous work of Matijašič et al. (2007), it was shown that PCR-targeting gassericin K7 A or K7 B gene determinants could be used for detection of *L. gasseri* K7 in cheese. However, the validation of such an approach on human faecal samples requires the assessment of the prevalence of tested gene determinants in faecal samples of individuals who have never consumed *L. gasseri* K7.

In a present study, 14 pairs of specific primers targeting different gene clusters of both bacteriocins were either constructed or selected from those used in the previous studies. Eighteen reference strains belonging to the *L. acidophilus* group and 45 faecal samples of adult volunteers who never consumed K7 strain were tested for the presence of gassericins K7 A and K7 B gene determinants. Two pairs of primers which gave no positive results after amplification of faecal samples were tested by real-time PCR using pure *L. gasseri* K7 culture and faecal samples spiked with K7 strain.

In addition to validation of the PCR-based approach targeting bacteriocin genes for the detection or quantification of *Lb. gasseri* K7 in faecal samples, the objective of this study was also to get some insight into the prevalence of bacteriocin genes in human gastrointestinal tract.

## Methods

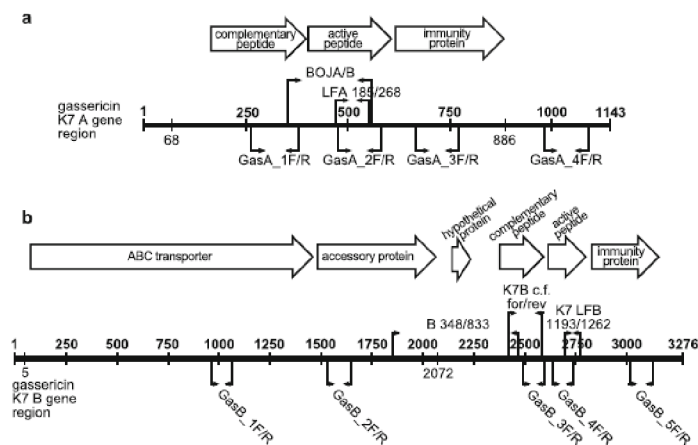
### Bacterial strains and growth conditions

*L. gasseri* K7 (Microbial Collection of Institute of Dairy Science and Probiotics, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia and the Czech Collection of Microorganisms CCM 7710, Czech Republic) was used as a positive control.

The following strains were tested for specific gassericins K7A and K7B gene determinants: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (American Type Culture Collection (ATCC, USA)), *L. acidophilus* CCDM 109 (Culture Collection of Dairy Microorganisms Lacto-Flora® (CCDM), Czech Republic), *L. acidophilus* CCDM 149, *L. gasseri* CCDM 214, *L. gasseri* CCDM 215, *L. gasseri* CCDM 332, *L. gasseri* CCDM 335, *L. gasseri* CCDM 340, *L. gasseri* CCDM 377, *L. gasseri* DSM 20243 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM), Germany), *L. gasseri* FAM 17266 (Federal Dairy Research Station (FAM), Switzerland), *L. gasseri* FAM 17828, *L. gasseri* LF221 (Microbial collection of the Institute of Dairy Science and Probiotics, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia), *Lactobacillus johnsonii* ATCC 11506, *L. johnsonii* FAM 1158, *L. johnsonii* NCC 533 (Nestlé Culture Collection, Switzerland) and *L. johnsonii* FAM 17265.

All bacterial strains used in this study were propagated in MRS broth (Merck, 64271 Darmstadt, Germany) at 37 °C in anaerobic conditions.

**Fig. 1** Scheme of gassericin K7 A and K7 B gene clusters. **a** Position of used primers is indicated in the upper line. *Wide arrows* above represent three ORFs of gassericin K7 A gene region. **b** The position of the used primers is indicated in the upper line. *Wide arrows* above represent six ORFs of the gassericin K7 B gene region



## Extraction of DNA

For the purposes of this study, 45 faecal samples of healthy adult volunteers (23 males and 22 females) who never consumed *L. gasseri* K7 were used. The collection of faecal samples was approved by The National Medical Ethics Committee of the Republic of Slovenia (36/12/11) and all volunteers gave written informed consent. After collection, the human faecal samples were stored at 70 °C until analysed. Thawed sample (0.1 g) was diluted with 9.9 mL of anaerobic diluent (1-g/L peptone water, 2-g/L porcine gelatine, 8.5-g/L NaCl, 0.557-g/L cysteine hydrochloride monohydrate). Diluted sample (1 mL) was centrifuged at 12,000 g for 5 min and washed two times with phosphate buffered saline (PBS). Pellet was re-suspended in 500 µL of TE buffer containing 5 mg/mL of lysozyme and 25 U/mL of mutanolysin. The mixture was incubated at 37 °C for 2 h. After lysis, the mixture was sonicated with Soniprep 150

(MSE Scientific Instruments, UK) together with cooling on ice. The programme of sonication was: 3 cycles of 30-s sonication with 15-s pause. DNA extraction was performed with Maxwell™ 16 Tissue DNA Purification kit (with Maxwell™ 16 instrument; Promega, USA). In order to remove PCR inhibitors, all eluted DNA was transferred to Zymo-spin™ IV-HRC column (Zymo Research, USA) and centrifuged according to the manufacturer's instructions.

To obtain DNA from the bacterial pure cultures, cells from 1 mL of the cultures were collected and the DNA was isolated using the same method.

## Conventional PCR

All the primers and PCR programmes used in this study are listed in Table 1. Primers targeting different parts of gassericin K7 A and K7 B genes were the same as described in previous studies or were designed for the purposes of this

Table 1 Oligonucleotide primers used in the PCR

Target operon	Position	Target gene	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)	PCR programme
gassericin K7 A	470	AcP	LFA 185 <sup>a</sup>	GTTCAGGATCATGTG	84	94 °C (60 s) 55 °C (30 s) 72 °C (30 s)
	553	AcP	LFA 268 <sup>a</sup>	TGTTGCAGCTCCGTTA		
	353	CP	BOJA <sup>b</sup>	TGGCGGATCAGTACAATGTG	204	94 °C (60 s) 52 °C (30 s) 72 °C (30 s)
	556	AcP	BOJB <sup>b</sup>	TGATGTTGCAGCTCCGTTAG		
	263	CP	GasA 1F	TGCATGGAGAGGTGCACG	118	95 °C (30 s) 60 °C (30 s) 72 °C (40 s)
	380	CP	GasA 1R	CCAGCCACACATTGTACTGAT		
	476	AcP	GasA 2F	GGATCATGTGGTAAAGGTGCAGTA	105	
	580	AcP	GasA 2R	TCCACTAGCAGTTTGTAGAACCAAT		
	667	IP	GasA 3F	CACCAATATAGTAGCTCTAATACAGACAC	106	
	772	IP	GasA 3R	ATATTTGGATTATTTTACCTGCATAGGC		
	981	ES	GasA 4F	GCITTAACCTGCITTAATTTGATTATCAACA	110	
	1,090	ES	GasA 4R	GCTAAGAACTCAAACGCTGCC		
	gassericin K7 B	1,852	AP	B 348 <sup>c</sup>	ACCTACAGTAGACGGCTTGA	616
2,467		CP	B 833 <sup>c</sup>	GCTCCACCTACTCCACCTAT		
2,423		CP	K7B c.f. for. <sup>c</sup>	TGGGAGAAATAATTGGGCTG	165	95 °C (60 s) 56 °C (30 s) 72 °C (20 s)
2,587		CP	K7B c.f. rev. <sup>c</sup>	TTCCGAATCCACCAGTAGC		
2,697		AcP	K7 LFB 1193 <sup>a</sup>	GGAGCTACTCGCGGAGTAAG	70	96 °C (30 s) 55 °C (30 s) 72 °C (30 s)
2,766		AcP	K7 LFB 1262 <sup>a</sup>	CTCCTAACGCACAGGCAGTC		
963		TP	GasB 1F	TGATAAGCATA CGTTGCGGTCAT	102	95 °C (30 s) 60 °C (30 s) 72 °C (40 s)
1,064		TP	GasB 1R	TCTGGCCTACAACCTAACAAACAAATTC		
1,529		AP	GasB 2F	AATTTCTCGACAATGATTATATTCCAGCC	118	
1,646		AP	GasB 2R	CCGTTGGTTCAACAACGCC		
2,491		CP	GasB 3F	GAAATGCAGTTTGGGTCCT	105	
2,595		CP	GasB 3R	TTCTTATCTTCCGAATCCACCAGTAG		
2,637		AcP	GasB 4F	GAATTAAGAAATGTAATGGGTGGAAACAAG	102	
2,738		AcP	GasB 4R	TGGTCCGAATCCTCTGCACCAA		
3,015		IP	GasB 5F	TTGTATTGGCCAATTTATGTTTTGAAGT	116	
3,130	IP	GasB 5R	CCTATTACAACGATATGGCCAAAATAGT			

AcP active peptide, CP complementary peptide, IP immunity protein, ES end sequence, AP accessory protein, TP transport protein

<sup>a</sup> (Majhenič et al. 2003)

<sup>b</sup> (Zorič Peternel et al. 2010)

<sup>c</sup> Andreja Čanžek Majhenič personal communication

study using LightCycler probe design software (v1.0, Roche Applied Science, Germany). DNA BLAST analysis (BLAST) was used for searching homologies with other known bacteriocins' genes. PCRs were performed in Mastercycler gradient (Eppendorf) using GoTaq® Flexi DNA polymerase kit (Promega, USA). PCR mixture (25 µL) contained 1 X final concentration of Green GoTaq® Flexi buffer, 1.5 mmol/L of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L of dNTPs, 0.5 µmol/L of each primer, 0.625 U of Taq polymerase and 2 µL of sample DNA. Each reaction was initiated with 2 min of denaturation at 95 °C followed by 30 cycles of denaturation, annealing, elongation under conditions specific for each primer set (Table 1) and finished with elongation for 5 min at 72 °C. Amplification products were detected by electrophoresis in TAE buffer using a 1.8 % agarose gel followed by staining in SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA).

#### Real-time PCR

PCR reaction was performed in 20-µL volume containing Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas, USA), 0.2 µmol/L of each primer and 1 µL of DNA. The PCR amplification was performed with an MX3000P

(Stratagene, USA) instrument. The amplification programme was 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, 45 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 40 s, and then 95 °C for 1 min and 55 °C for 30 s. All samples were subjected also to melting curve analysis in order to establish the specificity of the amplification.

For standard curve, 18-h culture of *L. gasseri* K7 was serially diluted (1:3) in anaerobic diluent and counted on MRS plates. DNA was extracted directly from 18-h culture of *L. gasseri* K7 and serially diluted (1:3).

For standard curve with spiked faeces, 50 mg of faecal matrix was re-suspended in 5 mL of PBS, added to pellet of *L. gasseri* K7 ( $6 \times 10^7$  CFU), vortexed and centrifuged (3,500 g, 10 min). The pellet was further processed by DNA extraction protocol. Three fold dilution series of DNA isolated from spiked faeces were prepared and amplified by real-time PCR. All reactions were made in triplicates. Correlation between Ct values and CFU/mL were determined by Stratagene MX3000P system's programme (Stratagene, USA). Reaction efficiency (*E*) was calculated from the slope of the standard curve as  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ . Theoretical limit of detection was calculated from the equation of the standard curve using Ct (dR)=45 as cut-off value since no signal above the detection threshold was obtained for the non-template control samples (Ct > 45).

**Table 2** Detection of gassericin K7 A genes in DNA of reference strains with different primers

Strain	Primers (Proteins encoded by target genes)					
	GasA 1F/R (CP)	BOJA/B (CP-AcP)	LEA 185/268 (AcP)	GasA 2F/R (AcP)	GasA 3F/R (IP)	GasA 4F/R (ES)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356						
<i>L. acidophilus</i> CCDM 109						
<i>L. acidophilus</i> CCDM 149						
<i>L. gasseri</i> CCDM 214						+
<i>L. gasseri</i> CCDM 215		+	+			
<i>L. gasseri</i> CCDM 332						+
<i>L. gasseri</i> CCDM 335	+	+	+		+	
<i>L. gasseri</i> CCDM 340		+	+		+	+
<i>L. gasseri</i> CCDM 377						+
<i>L. gasseri</i> DSM 20243						+
<i>L. gasseri</i> FAM 17266	+	+	+	+	+	+
<i>L. gasseri</i> FAM 17828						
<i>L. gasseri</i> K7	+	+	+	+	+	+
<i>L. gasseri</i> LF221	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506						
<i>L. johnsonii</i> FAM 1158	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> Ncc 533						
<i>L. johnsonii</i> FAM 17265						

+ PCR product of expected size was detected, – PCR product of expected size was not detected, CP complementary peptide, AcP active peptide, IP immunity protein, ES end sequence

**Table 3** Detection of gassericin K7 B genes in DNA of reference strains with different primers

Strain	Primers (Proteins encoded by target genes)							
	GasB 1F/R (TP)	GasB 2F/R (AP)	B 348/833 (AP-CP)	K7B c.f. for/rev (CP)	GasB 3F/R (CP)	GasB 4F/R (AcP)	LFB 1193/1262 (AcP)	GasB 5F/R (IP)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356								
<i>L. acidophilus</i> CCDM 109								
<i>L. acidophilus</i> CCDM 149								
<i>L. gasseri</i> CCDM 214			+	+			+	
<i>L. gasseri</i> CCDM 215				+				
<i>L. gasseri</i> CCDM 332			+	+			+	+
<i>L. gasseri</i> CCDM 335								
<i>L. gasseri</i> CCDM 340	+							
<i>L. gasseri</i> CCDM 377	+		+				+	
<i>L. gasseri</i> DSM 20243								
<i>L. gasseri</i> FAM 17266	+	+						
<i>L. gasseri</i> FAM 17828								
<i>L. gasseri</i> K7	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. gasseri</i> LF221	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506	+	+						
<i>L. johnsonii</i> FAM 1158								
<i>L. johnsonii</i> Ncc 533	+	+						
<i>L. johnsonii</i> FAM 17265								

+ PCR product of expected size was detected, – PCR product of expected size was not detected, TP transport protein, AP accessory protein, CP complementary peptide, AcP active peptide, IP immunity protein

## Results and discussion

Eighteen reference strains belonging to the *L. acidophilus* group were tested for the presence of gassericins K7 A and K7 B gene determinants. The results of PCR amplification are presented in Table 2 and in Table 3 respectively.

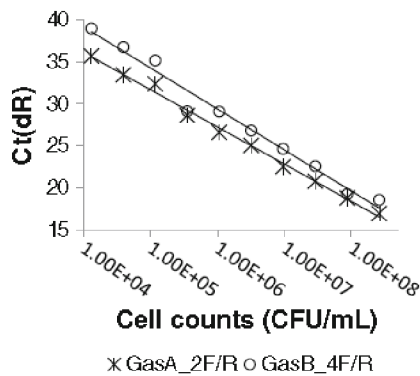
As shown in Table 2, some strains appear to possess only parts of the gassericin K7 A gene cluster, as positive results were not generated with all six primer pairs. While the most likely explanation is absence of the gene, it may also be due to slipped-strand mispairing or some other illegitimate recombination mechanisms (Treangen et al. 2009). The DNAs

of *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221, *L. gasseri* FAM 17266 (human salivary isolate) and *L. johnsonii* FAM 1158 (cheese isolate) were specifically amplified with all tested primer pairs, indicating the presence of complete gassericin K7 A gene cluster. The same was also confirmed with primers GasA\_1F and GasA\_4R (data not shown) which amplified all three ORFs. Nucleotide sequences of gassericin K7 A and K7 B are already known to be 100 % identical to acidocin LF221 A and LF221 B of *L. gasseri* LF221 (Majhenič et al. 2004). Strains K7 and LF221 belong to the same species and are both of human origin, however they differ in other characteristics such as the plasmid profile, RAPD profile, growth

**Table 4** Detection of gassericin K7 A and K7 B genes in faecal samples of adult individuals who never consumed *L. gasseri* K7

Primer name	Target genes	Presence in human faeces <sup>a</sup> [%]
LEA 185/268	gassericin K7 A active peptide	4.4
BOJA/B	gassericin K7 A complementary/active peptide	15.6
GasA 2F/R	gassericin K7 A active peptide	0.0
B 348/833	gassericin K7 B accessory protein/complementary peptide	22.2
K7B c.f. for/rev	gassericin K7 B complementary peptide	20.0
GasB 4F/R	gassericin K7 B active peptide	0.0

<sup>a</sup>Total number of samples tested—45



**Fig. 2** Real-time PCR analysis of DNA from *L. gasseri* K7 culture. Comparison of amplification of DNA from *L. gasseri* K7 culture by real-time PCR using GasA\_2F/R (reaction efficiency: 88.2 %; detection level:  $9.5 \times 10^1$  CFU/mL of pure culture) or GasB\_4F/R primers (reaction efficiency: 80.2 %; detection level:  $6.54 \times 10^2$  CFU/mL of pure culture)

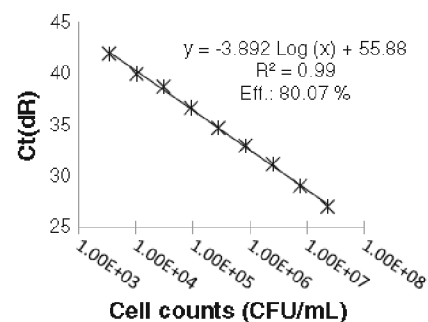
characteristics, the level of bacteriocin(s) production and the optimal conditions for both growth and bacteriocin production (Rogelj and Matijašić 2006). Lactacin F is, to our knowledge, the only bacteriocin described so far, to be produced by species *L. johnsonii* (Allison and Klaenhammer 1996). The presence of a gene cluster similar or identical to gassericin K7 A in *L. johnsonii* FAM 1158 indicates that this strain may be a new bacteriocin-producing *L. johnsonii* strain. Clearly, it remains to be determined whether gassericin K7 A gene cluster is fully functional and efficiently expressed in *L. johnsonii* FAM 1158 or *L. gasseri* FAM 17266, since isolates tested positively for the screened genes may not also produce active bacteriocins (Perin et al 2012).

Screening for gassericin K7 B gene determinants also revealed that only some gene cluster components are present in individual reference strains (Table 3). As expected, the complete gene cluster was observed only in *L. gasseri* LF221 and *L. gasseri* K7. Among 14 pairs of primers tested on 18 reference strains, one pair of primers targeting gassericin K7 A (GasA\_2F/R) and two pairs of primers targeting gassericin K7 B (GasB\_3F/R and GasB\_4F/R) showed good specificity for the complete gene clusters since positive results were observed only with the strains which contained the whole bacteriocin gene clusters.

To select appropriate primers for quantification of *L. gasseri* K7 we tested the presence of gassericin K7 A and K7 B gene determinants in bacterial DNA isolated from 45 faecal samples of adult non-treated volunteers who never consumed *L. gasseri* K7. We used four pairs of primers that were used in previous studies and two pairs of primers that showed total gene cluster specificity in tests with the reference strains performed in this study (Table 4). In accordance with the results obtained with reference strains, the presence

of different gene determinants varied among different samples. This is, to our knowledge, the first report about the prevalence of *Lactobacillus* bacteriocins' genetic determinants in human faeces. Mathys et al. (2007) showed by real-time PCR targeting the pediocin A gene, that strains containing the *pedA* gene are relatively widespread faecal material of babies (11/13) but were not found in the faecal samples of four adults. In our study, parts of gassericin K7 A and K7 B gene clusters were found in up to 22 % of the faeces of adults, depending on the primers used. These data indicates that strains producing similar bacteriocins or individual components of the K7 bacteriocin complexes are also present in the faeces of adults, although the producer strain *L. gasseri* K7 was originally isolated from a child. It would be interesting to examine the in vitro anti-microbial activity of reference strains containing different parts of bacteriocin genes, to establish the role of particular components. For instance, FAM 1158 contained all target sequences of gassericin K7 A and none of the gassericin K7 B sequences.

The absence of specific PCR products after amplification of faecal microbiomes from non-treated volunteers with GasA\_2F/R and GasB\_4F/R primers indicates that these primers could be used for specific detection of the gassericin K7 A or K7 B gene cluster in faecal samples. The identical annealing temperature for both primers enables multiplex PCR to detect both clusters at the same time in order to increase the specificity of *L. gasseri* K7 strain detection and to reduce false-positive results. The results of real-time PCR amplification of DNA extracted from K7 culture showed that the selected two pairs of primers were efficient and specific and could therefore also be used for quantification purposes (Fig. 2). The comparison of the results, however, demonstrated an approx. seven fold higher (i.e., less favourable) detection level with GasB\_4F/R primers. The real-time PCR analysis of faecal samples spiked with K7



**Fig. 3** Real-time PCR analysis of faecal samples spiked with *L. gasseri* K7 strain. Faecal samples were spiked with  $6 \times 10^7$  CFU of K7 strain. DNA isolated from spiked faeces was amplified with GasA\_2F/R primers. The detection level was  $10^4$  CFU of K7 strain/g of spiked faeces



strain revealed the detection level  $10^4$  CFU of K7 strain/g when GasA\_2F/R primers was used (Fig. 3). However, with GasB\_4F/R the amplification efficiency was unsatisfactory (data not shown) suggesting the unsuitability of this primer pair for quantitative analysis of faecal samples.

Probiotic characteristics are strain-specific features (Sanders and Huis in't Veld 1999) and it is therefore crucial to be able to distinguish a particular probiotic strain from the other strains of the same species. This is very important when we want to link the administration of a particular probiotic strain with the clinical observations found. This study shows that detection of specific bacteriocin genes could be used as a first step in detection as well as quantification of a specific probiotic strain in complex samples without prior cultivation, especially for analysing samples following clinical trials involving dosing with the probiotic strain *L. gasseri* K7. In this case, it is essential to compare the results with placebo group to exclude the effect of other strains producing targeted genes (Myllyluoma et al. 2005).

## Conclusions

In conclusion, the presence of gassericin K7 A or K7 B gene determinants was established in different strains of the *L. acidophilus* group and in faecal samples of adult individuals who have never consumed *L. gasseri* K7 strain. Different parts of those gene determinants are dispersed in tested lactobacilli strains and also in faecal microbiota. Two pairs of primers, namely GasA\_2F/R and GasB\_4F/R showed specificity for the total gene cluster of gassericin K7 A or gassericin K7 B respectively. The GasA\_2F/R primers were found to be useful also for real-time PCR quantification of the gassericin K7 A gene cluster in faecal samples and also for *L. gasseri* K7-specific detection or quantification in other biological samples, where proper control is included.

**Acknowledgments** This research was partly financed by a young researcher programme from the Slovenian Research Agency (Contract No. 1000-09-310201, Primož Treven) and partly from the project P4-0097 financed by the Slovenian Research Agency.

**Conflict of interest** The authors of this paper do not have any direct financial relationship with the commercial identities mentioned in this paper that might lead to a conflict of interest.

## References

- Allison GE, Klaenhammer TR (1996) Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, lafI, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl Environ Microbiol* 62(12):4450–4460
- BLAST. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Bogovič-Matijašič B, Rogelj I (2000) *Lactobacillus* K7—a new candidate for a probiotic strain. *Food Technol Biotech* 38:113–119
- Bogovič-Matijašič B, Rogelj I (2011) Bacteriocins of probiotics and enteric cytoprotection. In: Malago JJ, Koninkx JFJG, Marinsek-Logar R (eds) *Probiotic bacteria and enteric infections*. Springer, Dordrecht, pp 313–354. ISBN 978-94-007-0385-8
- Collado MC, Sanz Y, Gonzalez A, Gonzalez R, Hernandez M, Ferrus MA (2005) Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Ag* 25:385–391. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.01.017
- Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3:777–788. doi:10.1038/nrmicro1273
- Gillor O, Bt Zion A, Riley MA (2008) The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biot* 81:591–606. doi:10.1007/s00253-008-1726-5
- Hacin B, Rogelj I, Matijasic BB (2008) *Lactobacillus* isolates from weaned piglets' mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. *Folia Microbiol (Praha)* 53:569–576. doi:10.1007/s12223-008-0091-1
- Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Toba T, Saito T (1995) Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. *Lett Appl Microbiol* 21:137–141. doi:10.1111/j.1472-765X.1995.tb01025.x
- Kawai Y, Saitoh B, Takahashi O, Kitazawa H, Saito T, Nakajima H, Itoh T (2000) Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2201–2208. doi:10.1271/abb.64.2201
- Majhenič AC, Matijašič BB, Rogelj I (2003) Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *J Dairy Res* 70:199–203. doi:10.1017/S022029903006162
- Majhenič AC, Venema K, Allison GE, Matijašič BB, Rogelj I, Klaenhammer TR (2004) DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Appl Microbiol Biot* 63:705–714. doi:10.1007/s00253-003-1424-2
- Mathys S, von Ah U, Lacroix C, Staub E, Mini R, Cereghetti T, Meile L (2007) Detection of the pediocin gene *pedA* in strains from human faeces by real-time PCR and characterization of *Pediococcus acidilactici* UVA1. *BMC Microbiol* 7. doi:10.1186/1472-6750-7-55
- Matijašič BB, Rajsp MK, Perko B, Rogelj I (2007) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *Int Dairy J* 17:157–166. doi:10.1016/j.idairyj.2006.01.011
- Matijašič BB, Rogelj I (1999) Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technol Biotech* 37:93–100
- Myllyluoma E, Veijola L, Ahlroos T, Tynkkynen S, Kankuri E, Vapaatalo H, Rautelin H, Korpela R (2005) Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy—a placebo-controlled, double-blind randomized pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 21:1263–1272. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02448.x
- Perin LM, Moraes PM, Silva A Jr, Nero LA (2012) Lantibiotics biosynthesis genes and bacteriocinogenic activity of *Lactobacillus* spp. isolated from raw milk and cheese. *Folia Microbiol (Praha)* 57:183–190
- Rogelj I, Matijašič BB (2006) *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7—from isolation to application. *Biologia* 61:761–769. doi:10.2478/s11756-006-0154-1
- Sanders ME, Huis in't Veld J (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory

- and labeling issues. *Anton Leeuw Int J G* 76:293–315. doi:[10.1023/A:1002029204834](https://doi.org/10.1023/A:1002029204834)
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40:722–756
- Treangen TJ, Rocha EPC, Abraham AL, Touchon M (2009) Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiol Rev* 33:539–571. doi:[10.1111/j.1574-6976.2009.00169.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00169.x)
- Zorič Peternel M, Čanžek Majhenič A, Holo H, Nes I, Salehian Z, Berlec A, Rogelj I (2010) Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasserii* K7. *Probiotics Antimicrob Protein* 2:233–240. doi:[10.1007/s12602-010-9044-5](https://doi.org/10.1007/s12602-010-9044-5)



**EVALUATION OF *LACTOBACILLUS* STRAINS FOR SELECTED PROBIOTIC PROPERTIES**

Kristýna Turková, Anja Mavrič, Mojca Narat, Bohuslav Rittich, Alena Španová, Irena Rogelj,  
Bojana Bogovič Matijašič

*Folia Microbiologica* 58:261-267 (2013)

DOI:10.1007/s12223-012-0208-4

## Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties

Kristýna Turková · Anja Mavrič · Mojca Narat ·  
Bohuslav Rittich · Alena Španová · Irena Rogelj ·  
Bojana Bogovič Matijašič

Received: 15 February 2012 / Accepted: 23 October 2012 / Published online: 8 November 2012  
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2012

**Abstract** Eleven strains of *Lactobacillus* collected in the Culture Collection of Dairy Microorganisms (CCDM) were evaluated for selected probiotic properties such as survival in gastrointestinal fluids, antimicrobial activity, and competition with non-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7 for adhesion on Caco-2 cells. The viable count of lactobacilli was reduced during 3-h incubation in gastric fluid followed by 3-h incubation in intestinal fluid. All strains showed antimicrobial activity and the three most effective strains inhibited the growth of at least 16 indicator strains. Antimicrobial metabolites of seven strains active against *Lactobacillus* and *Clostridium* indicator strains were found to be sensitive to proteinase K and trypsin, which indicates their proteinaceous nature. The degree of competitive inhibition of non-toxicogenic *E. coli* O157:H7 adhesion on the surface of Caco-2 cells was strain-dependent. A significant decrease ( $P < 0.05$ ) in the number of non-toxicogenic *E. coli* O157:H7 adhering to Caco-2 cells was observed with all

lactobacilli. Three strains were selected for additional studies of antimicrobial activity, i.e., *Lactobacillus gasseri* CCDM 215, *Lactobacillus acidophilus* CCDM 149, and *Lactobacillus helveticus* CCDM 82.

### Introduction

*Lactobacillus* species, especially *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri* species, belong to a group of bacteria that forms part of the intestinal microflora. Strains of *L. acidophilus* and *L. gasseri* are important in the food (especially dairy) industry and are often used as probiotic cultures (Bernardeau et al. 2006). *Lactobacillus helveticus* is not only found in certain types of cheeses but may also be found in different types of fermented milk. During fermentation a high quantity of low molecular weight peptides are produced (Sadat-Mekmene et al. 2011). It has been demonstrated that *L. helveticus*, *L. acidophilus*, and *L. gasseri* strains have a potential to produce bioactive peptides such as angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented dairy products and/or to produce proteinaceous antimicrobial substances, thus demonstrating the therapeutic value and probiotic potential of these species (Slattery et al. 2010; Tabasco et al. 2009; Peternel et al. 2010).

Among the important criteria for potential probiotic strain selection, there are the acid and bile stability, the ability to inhibit the adhesion and growth of pathogenic bacteria, and the ability to adhere to surfaces of the human intestinal tract (Vesterlund et al. 2005). Antimicrobial compounds such as different organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide, or proteinaceous substances (e.g., bacteriocins) may play an inhibitory role against pathogenic bacteria. In recent years, bacteriocins produced by lactobacilli have been the subject of extensive studies, especially due to their prospective use

---

K. Turková (✉) · B. Rittich · A. Španová  
Institute of Food Science and Biotechnology,  
Faculty of Chemistry, Brno University of Technology,  
Purkyňova 118,  
61200 Brno, Czech Republic  
e-mail: xcturkovak@fch.vutbr.cz

A. Mavrič · I. Rogelj · B. B. Matijašič  
Institute of Dairy Science and Probiotics, Biotechnical Faculty,  
University of Ljubljana,  
Groblje 3,  
1230 Domžale, Slovenia

M. Narat  
Department of Animal Science, Biotechnical Faculty,  
University of Ljubljana,  
Groblje 3,  
1230 Domžale, Slovenia

as natural food preservatives (Gálvez et al. 2007). The antimicrobial activity against a wide range of pathogenic microorganisms (including *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus*) and also against closely related species of lactobacilli has been reported (Pan et al. 2009; Hacin et al. 2008).

For pathogenic bacteria, adhesion to the human epithelial cells is a critical step, since it allows the release of enzymes and toxins initiating necrotic processes directly into the target cell (Jankowska et al. 2008). Due to many disadvantages such as restricted availability, intestinal tissue cultures are used instead of intestinal epithelial cells. Tissue cultures most commonly used as models for enterocytes are Caco-2 cells. After culturing Caco-2 cells for 3 weeks, they are fully differentiated, express several markers characteristic of normal small intestinal villus cells, and are an appropriate in vitro model to study enterocyte–bacteria interactions (Jepson et al. 1996).

The aim of this study was characterization of 11 strains of the *Lactobacillus* genus deposited in the Culture Collection of Dairy Microorganisms (CCDM) with the aim of selecting strains with probiotic characteristics producing antimicrobial proteinaceous substances. Survival in simulated conditions of the gastrointestinal tract, antimicrobial activity, and competition with non-toxicogenic *E. coli* O157:H7 for well-differentiated human colon adenocarcinoma cells—Caco-2 cells—were investigated.

## Material and methods

### Bacterial strains and growth conditions

Eleven strains of *Lactobacillus* (*L. acidophilus* CCDM 109, *L. acidophilus* CCDM 149, *L. gasseri* CCDM 214, *L. gasseri* CCDM 215, *L. gasseri* CCDM 332, *L. gasseri* CCDM 335, *L. gasseri* CCDM 340, *L. gasseri* CCDM 377, *L. helveticus* CCDM 81, *L. helveticus* CCDM 82, *L. helveticus* CCDM 102) were obtained from the CCDM (Tábor, Czech Republic). Indicator strains (see Table 1 for the origin of strains) were chosen according to previous studies (Matijašić and Rogelj 2000; Matijašić et al. 2006; Hacin et al. 2008) and were acquired from the Institute of Dairy Science and Probiotics, University of Ljubljana. All *Lactobacillus* strains were grown in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium (Oxoid, UK) at 37 °C (at 30 °C for *Lactobacillus sakei* strains) for 18 h aerobically, with pH adjusted to 6.5. *Clostridium* strains were cultivated in RCM medium (Merck, Germany) at 37 °C for 48 h anaerobically. Strains of *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, and *Salmonella* were cultivated in brain–heart infusion (BHI, Merck, Germany) at 37 °C for 18 h aerobically. Non-toxicogenic *E. coli* O157:H7 is a clinical isolate (Laboratory

**Table 1** Indicator bacterial strains used for testing of antimicrobial activity

Indicator strain	The origin of strain
<i>Lactobacillus sakei</i> (ATCC 15521) IM 108	Starter for the sake
<i>Lactobacillus reuteri</i> IM 278	Feces of weaned pigs
<i>Lactobacillus crispatus</i> IM 300	Feces of weaned pigs
<i>Lactobacillus reuteri</i> IM 301	Feces of weaned pigs
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IM 304	Not available
<i>Lactobacillus gasseri</i> IM 340	Vaginal tract
<i>Lactobacillus gasseri</i> IM 341	Saliva
<i>Lactobacillus johnsonii</i> IM 345	Poultry feces
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (ATCC 11842 <sup>T</sup> ) IM 348	Not available
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> (ATCC 9649) IM 349	Not available
<i>Lactobacillus sakei</i> IM 398	Not available
<i>Clostridium difficile</i> IM 66	Human clinical isolate
<i>Clostridium perfringens</i> IM 72	Pigs
<i>Clostridium difficile</i> IM 83	Human clinical isolate
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (DSM 2637) IM 103	Not available
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> (NCDO 1754) IM 104	Not available
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213) IM 353	Not available
<i>Escherichia coli</i> IM 429	Broiler
<i>Escherichia coli</i> IM 430	Broiler
<i>Enterococcus faecalis</i> IM 435	Broiler
<i>Enterococcus faecalis</i> IM 436	Broiler
<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium IM 318	Not available
<i>Salmonella</i> spp. IM 423	Broiler
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Human clinical isolate

for Bacteriological Diagnostics of Intestinal Infections, University of Ljubljana) and was grown in BHI medium or violet red bile (VRB) medium (Merck, Germany) (VRB medium was used only in competition assay).

### Survival in simulated conditions of the gastrointestinal tract

The survival of strains in simulated gastrointestinal tract conditions was carried out in accordance with the protocol of Fernández et al. (2003), with slight modifications. Briefly, all tested strains were cultivated in MRS medium at 37 °C for 18 h and centrifuged (3,500×g, 5 min). After washing in physiological solution (0.9 % sodium chloride), the bacterial cells were resuspended in 20 mL of gastric fluid with the following composition: NaCl (125 mmol/L), NaHCO<sub>3</sub> (45 mmol/L), KCl (7 mmol/L), pepsin (3 g/L). The pH was adjusted at 2 and 3. The salts were purchased from Merck (Germany) and pepsin from Sigma-Aldrich (USA). The lactobacilli were incubated in gastric fluid at 37 °C. Aliquots (100 µL) taken after 0, 1, and 3 h were plated on MRS agar for enumeration (incubation for 3 days at 37 °C).

After 3-h incubation in gastric fluid, the bacteria were separated by centrifugation (3,500×g, 5 min), transferred into intestinal fluid (0.3 or 1.0 % bile salts (Biolife, Italy) and 0.1 % pancreatin (Sigma-Aldrich, USA), pH adjusted to 8), and incubated for 3 h at 37 °C. Samples (100 µL) for plate counting were taken after 1 and 3 h. The experiment was carried out twice.

#### Examination of antimicrobial activity

The antimicrobial assay against indicator strains was carried out by an agar spot test similarly to Jacobsen et al. (1999) on MRS agar with reduced concentration of glucose (0.2 % w/v). All tested CCDM strains (18-h cultures) were spotted (2 µL) on agar plates and incubated at 37 °C for 18 h aerobically. The indicator strains were grown in appropriate broth media (see “Material and methods”). The 18-h indicator cultures (50 µL) (200 µL of 48-h cultures of *Clostridium* strains) were added to 5 mL of appropriate soft agar, which was prepared by addition of agar (7.5 g/L) to the broth media, and poured over the bottom agar with outgrown spots of tested CCDM strains. Then, proteinase K (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA) and trypsin (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA) were applied (1.5 µL) beside the edge of bacterial spots. The plates were incubated under the growth conditions of indicator strains as defined in “Material and methods.” Then, the inhibition zones were measured. The experiment was carried out twice.

#### Competition assay

The competition assay was carried out according to Matijašić et al. (2003), with some modifications. Briefly, the Caco-2 cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) containing 10 % fetal bovine serum (Hyclone, Germany) and 0.1 % gentamicin (Sigma-Aldrich, USA). Monolayers of Caco-2 cells were seeded at a concentration of  $10^5$  cells per well in 24-well standard tissue plates and cultivated at 37 °C for 3 weeks to reach the confluence (after confluence, the concentration was  $3 \times 10^5$  cells per well). At least 24 h before the competition test, the DMEM medium with gentamicin was replaced by a medium without antibiotics.

Tested strains were cultivated at 37 °C for 18 h in MRS medium and centrifuged (3,500×g, 10 min). The direct comparison of the competition ability of 11 CCDM strains tested was possible by assuming that the concentration of the tested bacterial cells added to the wells was identical. Therefore, the cell density of lactobacilli was adjusted to 0.5 by measuring the absorbance at 660 nm. The lactobacilli were enumerated by plate counting (incubation at 37 °C for 3 days on MRS agar). The competition test was carried out in 24-well standard plates. The Caco-2 cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4), and

after that, the mixture of 1 mL of lactobacilli, 0.5 mL of DMEM, and 10 µL of *E. coli* O157:H7 was added into the wells and incubated for 30 min in 10 % CO<sub>2</sub> atmosphere. Unattached bacteria were removed by washing with PBS. Afterwards, 1 mL of 0.05 % Triton X-100 was added to the wells. After 10 min, the mixtures of lysed Caco-2 cells and bacteria were plated on VRB agar (Merck, Germany) for enumeration of *E. coli* O157:H7 (18 h, 37 °C aerobically).

Adhesion tests were carried out in two independent experiments. Each strain was tested in five wells. Statistical significance was determined by Student's *t* test, with the significance level set at  $P < 0.05$ .

## Results and discussion

### Survival of strains in simulated conditions of gastrointestinal tract

The acidic environment of the stomach and the presence of bile in the duodenum are major factors affecting the viability of probiotic bacteria after oral administration. The acidity, especially, is believed to be the most detrimental factor affecting the growth and viability of lactobacilli (Mainville et al. 2005). In our study viable counts (in colony-forming units (CFU) per milliliter) of all strains during the cultivation for 3 h in gastric fluid with pH3 was reduced (Table 2). The decrease of viable counts of all strains was the highest during the first hour of cultivation with the exception of *L. gasseri* CCDM 335, *L. helveticus* CCDM 81, and *L. helveticus* CCDM 82.

The treatment with intestinal fluid, which followed the incubation in gastric fluid, resulted in a decrease of viable counts (in CFU per milliliter) of all CCDM strains (Table 2). The only exception was *L. gasseri* CCDM 335, which was grown in the presence of 0.3 % bile salts and also 1.0 % bile salts. The tolerance or growth of lactobacilli in 0.3 % bile salt solution was observed before (Jacobsen et al. 1999; Hacin et al. 2008). The best survival in simulated conditions of gastrointestinal tract was determined for *L. acidophilus* CCDM 109, *L. gasseri* CCDM 332, and *L. gasseri* CCDM 335. The viable counts (in CFU per milliliter) of *L. acidophilus* CCDM 109 and *L. gasseri* CCDM 332 decreased by approximately  $10^2$  CFU/mL. Approximately 5-fold decrease of the viable counts (in CFU per milliliter) of *L. gasseri* CCDM 335 was observed during 3-h cultivation in gastric fluid (pH3) followed by 3-h cultivation in intestinal fluid (0.3 % of bile salts). It is interesting to highlight that the initial concentration of bacteria was quite different among the samples. This was due to different growth ability of the strains in MRS medium (Pitino et al. 2010).

No bacteria survived 3 h of treatment in gastric fluid with pH2. It was, however, observed before that although some strains did not survive in vitro in gastric juice with pH2 for



**Table 2** Survival of CCDM strains in gastric fluid and intestinal fluid

Strain	Initial viable counts (CFU/mL)	Viable counts (CFU/mL) after treatment in gastric fluid (h)/(pH3+pepsin 3 g/L)		% of bile salts in intestinal fluid	Viable counts (CFU/mL) after treatment in intestinal fluid (h)/(bile salts+0.1 % pancreatin)	
		1	3		1	3
		<i>L. acidophilus</i> CCDM 109	$5.62 \times 10^6$		$2.51 \times 10^5$	$2.08 \times 10^5$
<i>L. acidophilus</i> CCDM 149	$7.41 \times 10^7$	$1.02 \times 10^7$	$1.00 \times 10^7$	1.0	$7.76 \times 10^4$	$4.07 \times 10^4$
<i>L. gasseri</i> CCDM 214	$4.46 \times 10^8$	$1.44 \times 10^7$	$1.00 \times 10^7$	0.3	$1.51 \times 10^5$	$4.67 \times 10^4$
<i>L. gasseri</i> CCDM 215	$2.88 \times 10^8$	$3.01 \times 10^6$	$3.80 \times 10^6$	1.0	$5.01 \times 10^4$	$3.8 \times 10^4$
<i>L. gasseri</i> CCDM 332	$1.00 \times 10^7$	$1.02 \times 10^6$	$3.63 \times 10^5$	0.3	$1.00 \times 10^6$	$3.63 \times 10^5$
<i>L. gasseri</i> CCDM 335	$5.62 \times 10^6$	$5.62 \times 10^6$	$3.71 \times 10^5$	1.0	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$
<i>L. gasseri</i> CCDM 340	$6.16 \times 10^7$	$3.63 \times 10^5$	$3.63 \times 10^5$	0.3	$1.90 \times 10^5$	$1.77 \times 10^5$
<i>L. gasseri</i> CCDM 377	$3.16 \times 10^8$	$1.69 \times 10^7$	$1.00 \times 10^7$	1.0	$4.89 \times 10^4$	$2.51 \times 10^4$
<i>L. helveticus</i> CCDM 81	$1.00 \times 10^8$	$1.00 \times 10^8$	$4.78 \times 10^5$	0.3	$7.94 \times 10^4$	$1.00 \times 10^5$
<i>L. helveticus</i> CCDM 82	$1.00 \times 10^8$	$1.00 \times 10^8$	$1.04 \times 10^6$	1.0	$3.38 \times 10^5$	$7.94 \times 10^4$
<i>L. helveticus</i> CCDM 102	$7.94 \times 10^7$	$5.62 \times 10^6$	$1.09 \times 10^4$	0.3	$1.38 \times 10^6$	$1.00 \times 10^6$
				1.0	$8.51 \times 10^5$	$8.51 \times 10^5$
				0.3	$2.75 \times 10^5$	$2.08 \times 10^5$
				1.0	$1.00 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$
				0.3	$1.00 \times 10^6$	$1.00 \times 10^6$
				1.0	$2.51 \times 10^4$	$2.51 \times 10^4$
				0.3	$1.20 \times 10^5$	$1.00 \times 10^5$
				1.0	$3.54 \times 10^3$	$3.23 \times 10^3$
				0.3	$1.58 \times 10^6$	$1.02 \times 10^6$
				1.0	$9.33 \times 10^4$	$2.08 \times 10^4$
				0.3	$1.02 \times 10^4$	$1.00 \times 10^4$
				1.0	$1.00 \times 10^4$	$3.80 \times 10^3$

Gastric fluid (pH3+pepsin) and intestinal fluid (pH8+bile salts+pancreatin). The experiment was carried out twice

more than 15 min, they reached the colon in viable state and exerted a beneficial effect in vivo. It is important to consider also the buffering capacity of the ingested food. Actually, ingested bacteria are rarely subjected to pH below 3 (Mainville et al. 2005). In general the survival of CCDM strains in simulated condition of the gastrointestinal tract was not very good in comparison to the results of some previous studies. In this study only a cultivable part of the microbial population was quantified, but not viable noncultivable cells which may still exert some activity in the gut, although there are no experimental data available. The importance of cultivability or viability for beneficial effects of probiotics is not well defined since it is well known that UV-inactivated or heat-killed cells also have immunological and health-promoting effects (Lopez et al. 2008; Kataria et al. 2009).

#### Examination of antimicrobial activity

Lactobacilli are known for their production of various antimicrobial compounds which can inhibit different food pathogens (Nespolo and Brandelli 2010). In our study lactobacilli were

screened for their antimicrobial activity against selected Gram-positive and Gram-negative strains which were isolated from different sources (Table 1). The good probiotics should present their antimicrobial activity particularly against the pathogens. Pathogenic indicator strains (*E. coli* IM 429, *E. coli* IM 430, *Enterococcus faecalis* IM 435, *E. faecalis* IM 436, *Salmonella* spp. IM 423) were used. *Clostridium difficile* IM 66, *Clostridium perfringens* IM 72, *Clostridium tyrobutyricum* IM 103, and *C. tyrobutyricum* IM 104 were used as indicator strains because they are sensitive to bacteriocins produced by strains of the *L. acidophilus* group (Matijašić and Rogelj 2000). *Lactobacillus* indicator strains were chosen because the bacteriocins produced by different bacteria are in general active particularly against closely related species (Villiani et al. 2001).

All tested strains were antagonistic against at least two indicator strains. The most effective strains, which inhibited at least 12 indicator strains, were *L. acidophilus* CCDM 149, *L. gasseri* CCDM 214, *L. gasseri* CCDM 215, *L. gasseri* CCDM 377, and *L. helveticus* CCDM 82 (Table 3). All strains have shown antimicrobial activity,

**Table 3** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* CCDM strains

Indicator strain	<i>Lactobacillus</i> strain tested										
	<i>L. acidophilus</i> CCDM 109	<i>L. acidophilus</i> CCDM 149	<i>L. gasseri</i> CCDM 214	<i>L. gasseri</i> CCDM 215	<i>L. gasseri</i> CCDM 332	<i>L. gasseri</i> CCDM 335	<i>L. gasseri</i> CCDM 340	<i>L. gasseri</i> CCDM 377	<i>L. helveticus</i> CCDM 81	<i>L. helveticus</i> CCDM 82	<i>L. helveticus</i> CCDM 102
<i>L. sakei</i> (ATCC 15521) IM108	10	7	4	6	–	–	5	7	–	5	–
<i>L. reuteri</i> IM278	–	–	–	2	–	–	–	4	–	–	–
<i>L. crispatus</i> IM300	–	4	1.5	0.5	–	–	–	3	–	0.5	–
<i>L. reuteri</i> IM301	–	3	3	1.5	–	–	–	5	–	2	–
<i>L. acidophilus</i> IM304	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. gasseri</i> IM340	3	4P	4P	2P	2	–	–	6P	–	3P	–
<i>L. gasseri</i> IM341	–	–	2P	2P	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. johnsonii</i> IM345	–	6	6P	4P	–	–	0.5	5P	–	5P	–
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> (ATCC 11842 <sup>T</sup> ) IM348	5P	7P	7P	5P	–	–	5P	6	2	6P	5
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> (ATCC 9649)IM349	2P	5P	5P	6P	–	2	4P	7P	–	5P	–
<i>L. sakei</i> IM398	–	4P	5P	3P	–	–	2	5P	–	2P	–
<i>C. difficile</i> IM66	–	4P	3P	2	–	–	–	4	–	–	–
<i>C. perfringens</i> IM72	–	10	10	–	7	8	8	10	–	–	–
<i>C. difficile</i> IM83	–	4	3	3P	3	–	–	4	–	2	–
<i>C. tyrobutyricum</i> (DSM 2637) IM103	–	3P	2	–	–	2	–	3	–	–	–
<i>C. tyrobutyricum</i> (NCDO 1754) IM104	–	2P	3	4P	–	–	–	10	–	–	–
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213) IM353	–	4	5	–	3	3	5	4	–	–	–
<i>E. coli</i> IM429	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i> IM430	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	–
<i>E. faecalis</i> IM435	–	0.2	–	–	–	–	–	0.5	–	–	–
<i>E. faecalis</i> IM436	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5	–
<i>S. enterica</i> sv. Typhimurium IM318	3	–	0.5	–	2	–	–	0.5	4	2	6
<i>S. sp.</i> IM423	–	–	–	–	0.5	–	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i> O157:H7	0.5	1	0.1	0.1	–	0.5	–	1	–	–	–

The experiment was carried out twice (diameters of inhibition zone are given in millimeters).

P inhibition zone constricted in the presence of proteinase K or trypsin, – no inhibition zone detected

which was caused by substances sensitive to proteinase K and trypsin with the exception of *L. gasseri* CCDM 332, *L. gasseri* CCDM 335, *L. helveticus* CCDM 81, and *L. helveticus* CCDM 102. The proteinaceous compound-dependent activity was observed against selected *Lactobacillus* and *Clostridium* representatives but not against the indicator strains belonging to the other genera. Antimicrobial proteinaceous substances which are most effective against closely related strains and are sensitive to proteolytic enzymes could be bacteriocins or bacteriocin-like substances (Nespolo and Brandelli 2010). Bacteriocins are extracellularly released antibacterial peptides or proteins which typically display inhibitory activity against closely related Gram-positive bacteria. Some of them, however, exhibit also a broader inhibitory spectrum. Probiotic strains of *Lactobacillus* producing bacteriocins could be used in the food industry due to increasing consumers' demand for natural products (Villiani et al. 2001). One of the possible disadvantages is that bacteriocins produced by probiotic strains added in dairy products may inhibit starter cultures.

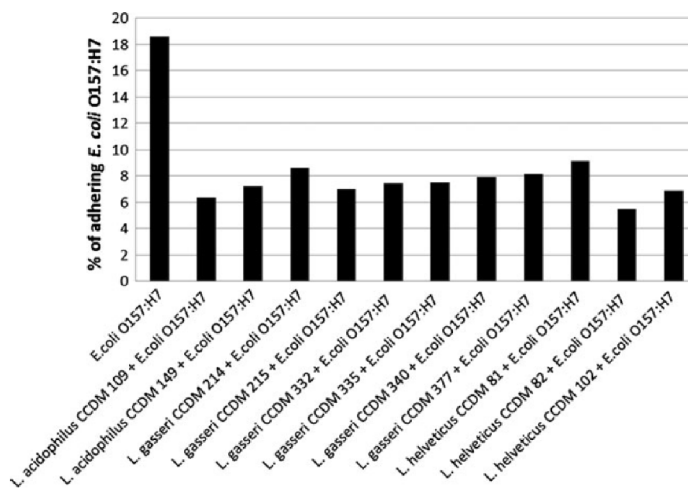
#### Competition assay

When selecting new probiotic strains, the screening of adhesion properties and competitive exclusion are considered as important steps (Pan et al. 2009). We compared *E. coli* O157:H7 incubated alone and with lactobacilli. Coincubation of *E. coli* O157:H7 with *Lactobacillus* strains for 30 min decreased *E. coli* O157:H7 adhesion to Caco-2 cells. The results are expressed as the percentage of adhered *E. coli* O157:H7 to total counts of added *E. coli* O157:H7 to Caco-2 cells (Fig. 1). The figure contains data of a representative experiment. A significant decrease ( $P < 0.05$ ) in the number of *E. coli* O157:H7 adhering to Caco-2 cells was

observed with all lactobacilli. The degree of competitive inhibition of adhesion was strain-dependent. *L. acidophilus* CCDM 109 and *L. helveticus* CCDM 82 showed the highest degree of inhibition with respect to both trials. *L. acidophilus* CCDM 109 decreased the adhesion of *E. coli* O157:H7 2.9 and 2.4 times, and *L. helveticus* CCDM 82 3.4 and 2.3 times in the first and second trials, respectively. It was shown before that the coincubation of Gram-negative strains (*Salmonella* sp. or *E. coli*) and *Lactobacillus* strains reduced the inhibition of pathogen adhesion. The ability to inhibit the adhesion of pathogens is variable depending on both *Lactobacillus* and pathogen strains (Jankowska et al. 2008).

The mechanism for *Lactobacillus* strains to inhibit Gram-negative bacteria (*Salmonella* sp. or *E. coli*) invasion appears to be multifactorial. The number of adhering pathogenic bacteria to Caco-2 cells includes the adhesion of *Lactobacillus* strains to the host intestinal epithelium and could be decreased by the antimicrobial compounds secreted by lactobacilli (Lin et al. 2008). The second most effective strain, *L. acidophilus* CCDM 109, produced antimicrobial substances against *E. coli* O157:H7 as demonstrated by the agar spot test. The inhibition of adhesion could be also at least partially caused by secreted antimicrobial compounds. However, the most effective strain, *L. helveticus* CCDM 82, did not produce antimicrobial compounds against *E. coli* O157:H7 in the agar spot test, and the inhibition was probably due to competing for adhesion sites. No difference was observed in the decrease of adhesion of *E. coli* O157:H7 between the strains which produced antimicrobial substances against *E. coli* O157:H7 in the agar spot test and between the strains which did not. Additional experiments are needed to determine the precise mechanism of inhibition.

**Fig. 1** The percentage of adhered *E. coli* O157:H7 incubated alone and with lactobacilli to total counts of *E. coli* O157:H7 added to Caco-2 cells. The total count of *E. coli* O157:H7 (100 %) added to Caco-2 cells was  $4.5 \times 10^7$  CFU/mL. Each strain was tested in five wells. Adhesion tests were carried out in two independent experiments. The figure contains the data from a representative experiment. A significant decrease ( $P < 0.05$ ) in the number of *E. coli* O157:H7 adhering to Caco-2 cells was observed with all CCDM lactobacilli



## Conclusion

In this work we tested *Lactobacillus* strains from CCDM for some probiotic properties with the aim of finding strains with beneficial probiotic properties producing antimicrobial proteinaceous substances. Seven strains producing antimicrobial substances sensitive to proteolytic enzymes against *Lactobacillus* and *Clostridium* indicator strains were found. The best probiotic characteristics of tested CCDM strains (survival in gastrointestinal fluid and competition assay) were found for *L. acidophilus* CCDM 109. However, *L. acidophilus* CCDM 109 inhibited the growth of four indicator strains only (the production of antimicrobial proteinaceous substances only against two indicator strains). On the other side, *L. gasseri* CCDM 215 and *L. acidophilus* CCDM 149 did not show very good survival and competition for adhesion ability (in comparison to *L. acidophilus* CCDM 109) and produced antimicrobial substances active against at least 13 indicator strains. The production of antimicrobial proteinaceous substances against at least seven indicator strains was observed. Also, *L. helveticus* CCDM 82 produced proteinaceous substances against five indicator strains and successfully inhibited the adherence of *E. coli* O157:H7 in the competition assay. With respect to the above-mentioned results, the strains *L. gasseri* CCDM 215, *L. acidophilus* CCDM 149, and *L. helveticus* CCDM 82 were selected for additional studies of antimicrobial activity and production of proteinaceous antimicrobial substances.

**Acknowledgments** The financial support by grant no. 2B06053 of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic and of the Slovenian Research Agency (contract no. P4-0097) is gratefully acknowledged. Non-toxicogenic *E. coli* O157:H7 was kindly provided by Alenka Andlovic, Laboratory for Bacteriological Diagnostics of Intestinal Infections, University of Ljubljana. The authors are grateful to Ana Jakopič (Chair for Genetics, Animal Biotechnology and Immunology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana) for help with the competition assay.

## References

- Bernardeau M, Guguen M, Vernoux JP (2006) Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol Rev* 30:487–513
- Fernández MF, Boris S, Barbés C (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 94:449–455
- Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 120:51–70
- Hacin B, Rogelj I, Matijašič BB (2008) *Lactobacillus* isolates from weaned piglets mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. *Folia Microbiol* 53:569–576
- Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Pærregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M (1999) Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 65:4949–4956
- Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E (2008) Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotechnol* 2008:357964
- Jepson MA, Lang TF, Reed KA, Simmons NL (1996) Evidence for a rapid, direct effect on epithelial integrity and trans-epithelial transport in response to *Salmonella* invasion. *Eur J Physiol* 432:225–233
- Kataria J, Li N, Wynn JL, Neu J (2009) Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutr Rev* 67:546–550
- Lin CK, Tsai HC, Lin PP, Tsen HY, Tsai CC (2008) *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. *Anaerobe* 14:251–255
- Lopez M, Li N, Kataria J, Russell M, Neu J (2008) Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 138:2264–2268
- Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER (2005) A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol* 99:287–296
- Matijašič BB, Rogelj I (2000) *Lactobacillus* K7—a new candidate for a probiotic strain. *Food Technol Biotechnol* 38:113–119
- Matijašič BB, Narat M, Zorič M (2003) Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technol Biotechnol* 41:83–88
- Matijašič BB, Stojković S, Rogelj I (2006) Survival and *in vivo* adhesion of human isolates *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 in weaned piglets and their effects on coliforms, clostridia and lactobacilli viable counts in faeces and mucosa. *J Dairy Res* 73:417–422
- Nespolo CR, Brandelli A (2010) Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. *Braz J Microbiol* 41:1009–1018
- Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z (2009) The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control* 20:598–602
- Petermel MZ, Majhenič AČ, Holo H, Nes IF, Salehian Z, Berlec A, Rogelj I (2010) Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics Antimicro Prot* 2:233–240
- Pitino I, Randazzo CL, Mandalari G, Lo Curto A, Faulks RM, Le Marc Y, Bisignano C, Caggia C, Wickham MSJ (2010) Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiol* 27:1121–1127
- Sadat-Mekmene L, Genay M, Atlan D, Lortal S, Gagnaire V (2011) Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Int J Food Microbiol* 146:1–13
- Slattery L, O'Callaghan J, Fitzgerald GF, Beresford T, Ross RP (2010) Invited review: *Lactobacillus helveticus*—a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *J Dairy Sci* 93:4435–4454
- Tabasco R, García-Cayuela T, Peláez C, Requena R (2009) *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int J Food Microbiol* 132:109–116
- Vesterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand AC (2005) Measurement of bacterial adhesion—in vitro evaluation of different methods. *J Microbiol Methods* 60:225–233
- Villiani F, Apone M, Blaitta G, Maurello G, Pepe O, Moschetti G (2001) Detection and characterization of a bacteriocin, garvicin L-15, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from cow's milk. *J App Microbiol* 88:877–886