



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH MIKROORGANISMŮ V KOSMETICKÉM PRODUKTU POMOCÍ TECHNIKY POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE (PCR)

IDENTIFICATION OF PROBIOTICS IN COMETIC PRODUCT USING PCR TECHNIQUE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adelina Akmalova

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1636/2021 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Adelina Akmalova**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Smetana, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Identifikace probiotických mikroorganismů v kosmetickém produktu pomocí techniky polymerázové řetězové reakce (PCR)

Zadání bakalářské práce:

- 1) literární rešerše dané problematiky
- 2) zvládnutí techniky izolace bakteriální DNA z kosmetických produktů
- 3) kvantifikace a kontrola kvality DNA
- 4) zvládnutí techniky PCR a interpretace jejich výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Adelina Akmalova
studentka

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá identifikací probiotických mikroorganismů v kosmetických přípravcích pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Cílem této práce bylo potvrdit přítomnost bakteriální DNA v kosmetických výrobcích obsahujících probiotické mikroorganismy.

Teoretická část práce se zaměřuje na úlohu probiotických mikroorganismů při udržování zdraví pokožky a na jejich účinky na lidský organismus. Rovněž jsou zdůrazněny různé metody identifikace probiotik se zaměřením na molekulárně genetické přístupy. V experimentální části práce byly testovány dva kosmetické výrobky s deklarovanou přítomností probiotických mikroorganismů. Pro extrakci DNA z výrobků byly použity dvě metody: fenolová extrakce a metoda pomocí komerčního kitu. Dále byla provedena amplifikace specifické oblasti genu 16S rRNA pomocí PCR. Produkty PCR byly podrobeny elektroforéze na agarosovém gelu a byly vizualizovány pomocí ultrafialového světla. Všechny kosmetické produkty prokázaly přítomnost domény *Bacteria* a rodu *Lactobacillus*. Druhově specifická PCR navíc potvrdila přítomnost deklarovaných probiotických druhů *Lactobacillus pentosus* a *Lactobacillus bulgaricus* ve výrobcích.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the identification of probiotic microorganisms in cosmetic products by polymerase chain reaction (PCR). The aim of this work was to confirm the presence of bacterial DNA in cosmetic products containing probiotic microorganisms.

The theoretical part of the thesis focuses on the role of probiotic microorganisms in maintaining skin health and their effects on the human body. Different methods for the identification of probiotics are also highlighted with a focus on molecular genetic approaches. In the experimental part of the work, two cosmetic products with declared presence of probiotic microorganisms were tested. Two methods were used to extract DNA from the products: phenol extraction and commercial kit method. Furthermore, amplification of a specific region of the 16S rRNA gene was performed by PCR. The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis and visualized by ultraviolet light. All cosmetic products showed the presence of the *Bacteria* domain and the genus *Lactobacillus*. In addition, species-specific PCR confirmed the presence of the declared probiotic species *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus bulgaricus* in the products.

KLÍČOVÁ SLOVA

probiotika, kosmetické výrobky, *Bacteria*, *Lactobacillus*, PCR, izolace DNA

KEYWORDS

probiotics, cosmetic products, *Bacteria*, *Lactobacillus*, PCR, DNA isolation

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

AKMALOVA, Adelina. Identifikace probiotických mikroorganismů v kosmetickém produktu pomocí techniky polymerázové řetězové reakce (PCR). Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/139202>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jan Smetana.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych vyjádřila hluboké poděkování za pomoc při přípravě mé bakalářské práce vedoucímu Mgr. Janovi Smetanovi, Ph.D. Po celou dobu od výběru tématu až po dokončení práce mi pomáhal doporučeními, cennými radami a poskytoval mi morální podporu. Ráda bych také poděkovala své rodině a kamarádům, kteří mě podporovali během studia na Vysokém učení technickém v Brně.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Probiotické organismy	8
2.1.1 Druhy probiotických organismů.....	8
2.1.2 Vliv probiotik na lidské zdraví	9
2.1.3 Jaký účinek má kosmetický přípravek s probiotiky	9
2.2 Prebiotika	9
2.3 Postbiotika.....	10
2.4 Kůže	10
2.4.1 Vrstvy kůže	10
2.4.2 Mikroflóra kůže.....	12
2.4.3 Onemocnění kůže.....	13
2.5 Kosmetologie a kosmetika	14
2.5.1 Historie využívání probiotik v kosmetologii.....	15
2.5.2 Aplikace probiotických produktů na kůže	15
2.6 Metody identifikace probiotických organismů	15
2.6.1 Fenotypové metody	16
2.6.1.1 Morfologické metody.....	16
2.6.1.2 Biochemické a fyziologické metody	16
2.6.2 Molekulárně diagnostické metody	16
2.6.2.1 Metoda PCR.....	17
2.6.2.2 Metoda PCR v reálném čase	18
2.6.3 Detekce DNA pomocí elektroforézy	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1 Materiály	20
3.1.1 Použité probiotické kosmetické výrobky	20
3.1.2 Chemikálie	21
3.1.3 Roztoky	21
3.1.4 Komponenty pro PCR	22
3.1.5 Přístroje a pomůcky.....	23
3.1.6 DNA použitá pro pozitivní kontrolu	23
3.2 Metody	23

3.2.1	Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk z výrobků.....	23
3.2.2	Izolace DNA fenolovou extrakcí.....	24
3.2.3	Srážení DNA etanolem.....	24
3.2.4	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí Omni Bacterial DNA Purification kitu.....	24
3.2.5	Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky	25
3.2.6	Provedení PCR	25
3.2.7	Amplifikační programy pro DNA	27
3.2.8	Detekce produktů PCR agarósovou gelovou elektroforézou	27
4	VÝSLEDKY	29
4.1	Izolace DNA	29
4.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	29
4.3	Průkaz přítomnosti DNA domény <i>Bacteria</i> pomocí PCR	29
4.4	Průkaz přítomnosti DNA rodu <i>Lactobacillus</i> pomocí PCR.....	31
4.5	Průkaz přítomnosti bakteriální DNA druhu <i>Lactobacillus pentosus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii</i> pomocí PCR	32
4.6	Průkaz přítomnosti bakteriální DNA domény <i>Bacteria</i> pomocí PCR v reálném čase 33	
4.7	Průkaz přítomnosti bakteriální DNA rodu <i>Lactobacillus</i> pomocí PCR v reálném čase 35	
5	DISKUZE	38
5.1	Izolace bakteriální DNA ze vzorků.....	38
5.2	Stanovení čistoty a kvality izolované DNA	38
5.3	Identifikace domény <i>Bacteria</i>	39
5.4	Identifikace rodu <i>Lactobacillus</i>	39
5.5	Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus pentosus</i>	40
5.6	Druhově specifická PCR pro <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	40
6	ZÁVĚR.....	41
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRÁTEK	47

1 ÚVOD

V posledních desetiletích se spotřeba přírodních a ekologických produktů stala důležitou součástí zdravého životního stylu. Tento trend ovlivnil i kosmetický průmysl, kde stále více spotřebitelů věnuje pozornost složení výrobků a dává přednost těm, které obsahují přírodní a bezpečné složky.

Probiotika, živé mikroorganismy, jsou jednou z klíčových složek přírodních kosmetických výrobků. Mají schopnost obnovovat a udržovat rovnováhu mikrobiomu pokožky, což pozitivně ovlivňuje její zdraví a vzhled. Aby však mohly být probiotické mikroorganismy v kosmetických přípravcích účinně využívány, musí být jejich přítomnost přesně identifikována. V praxi se ke zkoumání přítomnosti probiotických mikroorganismů v kosmetických přípravcích běžně používají molekulárně biologické metody založené na analýze bakteriální DNA. Z těchto metod je nejběžnější, nejjednodušší a nejrychlejší polymerázová řetězová reakce (PCR). Identifikace probiotik v kosmetických výrobcích pomocí PCR umožňuje nejen zjistit a potvrdit přítomnost probiotických mikroorganismů, ale také identifikovat jejich konkrétní druhy a kmeny. To umožňuje výrobcům sledovat kvalitu a účinnost probiotických výrobků a spotřebitelům poskytuje spolehlivé informace o obsahu jejich oblíbených kosmetických výrobků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotické organismy

V literatuře je možno nalézt více než jednu definici probiotik. Modernější a komplexnější definici však poskytuje Fric: „probiotika jsou nepatogenní mikroorganismy, většinou lidského původu, které poskytují hostiteli zdravotní přínos a umožňují předcházet nebo zlepšovat některé nemoci, pokud jsou podávány v přiměřeném množství“ [1]. První zdokumentovanou studii o probiotikách provedl Mechnikov a jeho kolegové, kteří se zabývali mikroflórou dolní části střeva a příznivými účinky fermentovaných mléčných výrobků na lidské zdraví a dlouhověkost. Od té doby byly provedeny rozsáhlé studie o příznivých účincích probiotik u lidí a jejich vztahu k prevenci a léčbě onemocnění souvisejících se střevním traktem, jako jsou infekční průjemy a průjemy z antibiotik, dráždivý tračník atd [2].

Poptávka po potravinách obsahujících probiotika v současné době masivně roste díky neustálému hromadění vědeckých důkazů, které poukazují na jejich potenciální zdravotní přínos [3].

Nejnovější vědecký a klinický výzkum potvrzuje, že střevní mikrobiom ovlivňuje vzdálené orgány, jako je kůže, prostřednictvím komplexních mechanismů, včetně osy střevokůže. Použití prebiotik, probiotik a symbiotik v péči o pokožku vykazuje slibné výsledky v prevenci a léčbě různých zánětlivých kožních onemocnění, jako je akné a atopická dermatitida. S příchodem nových výrobků na trh však výzkumné týmy provádějí další studie, aby zjistily jejich účinnost, mechanismy účinku, bezpečnost a indikace k použití [4].

2.1.1 Druhy probiotických organismů

Nejčastějšími typy mikroorganismů, používanými jako probiotika, jsou bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie, i když se používají i jiné bakterie a některé kvasinky. Je třeba poznamenat, že biologické účinky probiotik závisí na kmeni a že úspěch nebo neúspěch jednoho kmene nelze extrapolovat na jiný kmen [5].

- Rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou distribuovány v různých ekologických výklencích v gastrointestinálním a genitálním traktu a tvoří důležitou součást mikroflóry u lidí. Jsou charakterizovány jako grampozitivní, nesporující, nemagelované tyčinky nebo kokobacily. Jsou buď mikroaerofilní nebo anaerobní a přísně fermentační. V současné době bylo identifikováno pouze 56 druhů rodu *Lactobacillus* ze 106 popsáných. Z nich se jako probiotika používají následující druhy: *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Lactobacillus brevis* atd. Nejvíce studovaným pro použití ve stravě je *Lactobacillus acidophilus*, který je jedním z hlavních druhů bakterií mléčného kvašení kolonizujících střeva zvířat a lidí [6] [7] [8].

- Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie patří mezi první mikroorganismy, které kolonizují střevo novorozence a poté se rychle stávají dominantní flórou. Bifidobakterie jsou klasifikovány jako grampozitivní, nesporující, nehybné a katalázově negativní obligátní anaerobní bakterie. Jsou pleomorfní s tvary včetně krátkých, zakřivených tyčí. V současné době bylo identifikováno a studováno 30

druhů bifidobakterií, z nichž 8 má probiotické vlastnosti a používají se jako probiotika: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *Bifidobacterium infantis* a *Bifidobacterium lactis*. Bifidobakterie produkují kyselinu octovou a mléčnou bez tvorby CO₂, s výjimkou degradace glukonátu [6] [7].

2.1.2 Vliv probiotik na lidské zdraví

Stále více se uznává, že podávání nebo konzumace probiotik upravuje střevní mikroflóru hostitele. Tím se zajistí zdravotní přínosy pro lidské zdraví, jsou dobrou prevencí a léčbou řady infekčních onemocnění a střevních poruch. Navíc zdravotní přínos probiotických mikroorganismů závisí na kmeni. Žádný jednotlivý kmen neposkytuje všechny nabízené výhody, dokonce ani kmeny stejného druhu nejsou účinné proti některým onemocněním.

Střevní mikrobiota a sliznice gastrointestinálního traktu (GIT) dobře interaguje s probiotickými mikroorganismy. Probiotické bakterie zabraňují kolonizaci patogenním bakteriím. Adherují na střevní stěnu, čímž vytvářejí konkurenci pro adhezivní místa a živiny. Produkují také inhibiční látky (kyselinu mléčnou atd.), které činí prostředí nevhodné pro růst a množení patogenů.

Studie ukázaly, že probiotické bakterie mají perspektivu při léčbě zánětlivých onemocnění trávicího traktu. Probiotika byla testována při zmírňování příznaků Crohnovy choroby, syndromu dráždivého tračníku, průjmu a dalších [9] [10] [11].

2.1.3 Jaký účinek má kosmetický přípravek s probiotiky

V poslední době se věnuje velká pozornost lokální aplikaci probiotik. Vychází z předpokladu, že aplikace probiotik přímo na kůži má pozitivní vliv na její lokální mikrobiom – soubor mikroorganismů (plísní, roztočů, bakterií), které žijí na povrchu kůže a interagují s epidermálními buňkami. Studie ukazují, že mohou zabránit růstu škodlivých bakterií prostřednictvím kompetitivního vyloučení, produkce chemických látek, jako jsou bakteriociny (biokonzervační látky), organické kyseliny a peroxid vodíku, dále stimulují sekreci mucinu, což vede ke zlepšení bariérové funkce, stimulují uvolňování defensinů (peptidů imunitního systému) z hostitelských buněk, produkují růstové látky (vitaminy) a konkurence o živiny. [12] Kromě toho nelze probiotika podceňovat při léčbě kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida, akné, růžovka, psoriáza atd. Můžou léčit kožní onemocnění produkcí určitých analogů cytokinů, které inhibují růst patogenních bakterií [13].

2.2 Prebiotika

Lidská výživa je hlavním zdrojem energie pro růst mikroorganismů. Složení a funkci střevní mikroflóry silně ovlivňují nestravitelné sacharidy tzv. prebiotika, které hostitel nemůže strávit v tenkém střevě a které přecházejí do tlustého střeva. Rozkladem těchto nestrávených látek místní střevní flóra fermentuje a získává z toho energii k přežití. Nejčastěji používanými prebiotiky jsou fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy a transgalaktooligosacharidy. Najdeme je v dietních potravinách, včetně pšenice, červené řepy, cibule, rajčat, chřestu, medu, kravského mléka, banánů, hrachu atd. Současné užívání probiotik a prebiotik má navíc vynikající vliv na lidské zdraví, protože zlepšuje přežívání probiotických mikroorganismů v trávicím traktu. A pro kombinaci synergicky působících probiotik a prebiotik byl zaveden

pojem „synbiotikum“. „Synbiotikum“ znamená synergický, proto by se tato definice měla používat pro výrobky, v nichž prebiotická složka selektivně zvýhodňuje probiotický mikroorganismus [14] [15].

2.3 Postbiotika

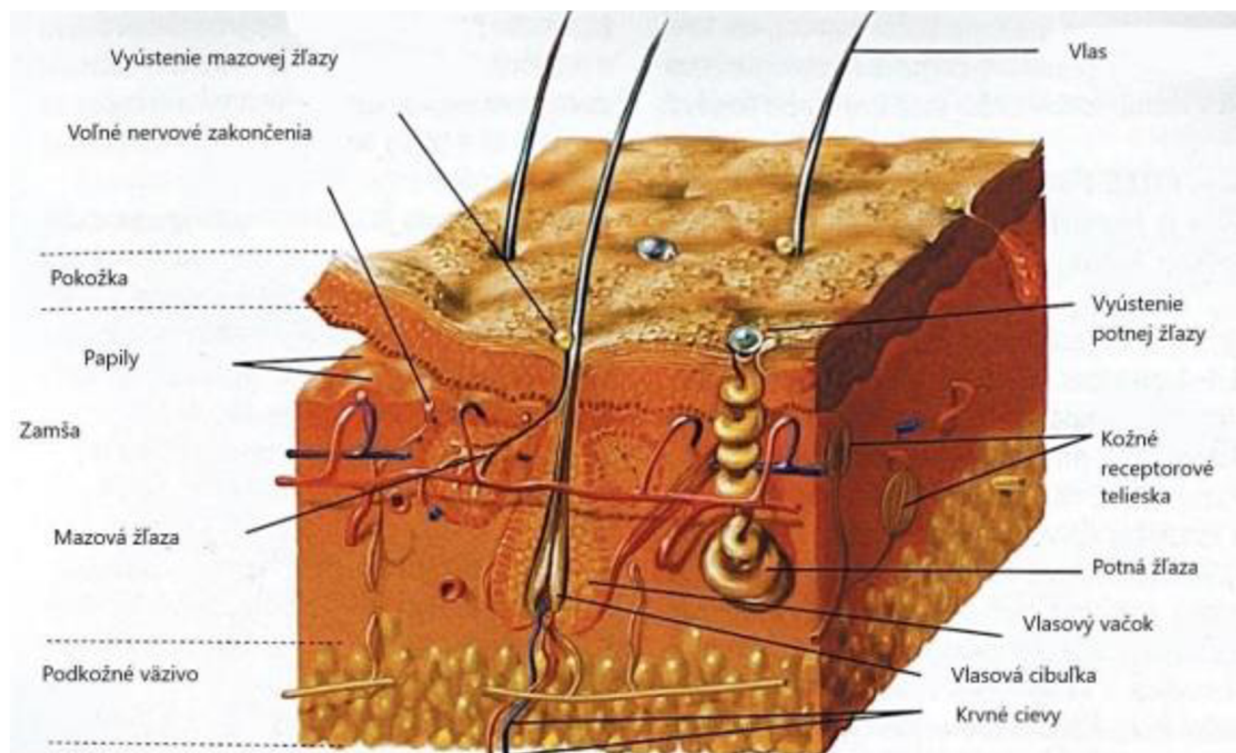
Také složení střevní mikrobioty je ovlivněno jejím metabolickým a funkčním fenotypem. V souladu s tím se metabolické hladiny složek mikrobioty u jednotlivých osob liší. Navíc při přijímání probiotik, prebiotik nebo synbiotik do lidského těla jsou jejich pozitivní účinky na organismus člověka založeny na konečné produkci složek, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem, funkční proteiny, mikrobiální frakce, vylučované polysacharidy, extracelulární polysacharidy, buněčné lyzáty, kyselina teichoová. To podnítilo podrobnější studium fermentace potravin a vznik nového termínu postbiotika. Postbiotika jsou všechny látky, které vznikají metabolickou činností mikroorganismů a ve spojení se složkami potravin mohou mít vliv na podporu zdraví. Podle existujících údajů mají postbiotika imunomodulační účinky, protizánětlivé, antioxidační a protinádorové vlastnosti [16] [17].

2.4 Kůže

Kůže je největším lidským orgánem, její plocha odpovídá téměř 2 metrům čtverečním a váží až 10 kg. Slouží jako ochranná bariéra proti vnějšímu prostředí a zároveň udržuje vnitřní homeostázu, poskytuje základní funkce, jako je snímání a imunologická ochrana. Kůže také poskytuje fyzickou ochranu před zraněním a pomáhá při kontrole tělesné teploty a našeho vnímání okolního prostředí prostřednictvím smyslových nervů. V souladu s tím je kůže komplexním orgánem obsahujícím více tkáňových vrstev a různé typy buněk, včetně melanocytů, endotelových buněk, keratinocytů, fibroblastů a imunitních buněk spojených s kůží. Obsahuje také vysokou hustotu extracelulární matrice (ECM), která přispívá k její pevnosti v tahu a pružnosti [18].

2.4.1 Vrstvy kůže

Kůže se skládá ze tří vrstev: epidermis a dermis, které leží na tukové vrstvě zvané hypodermis (podkožní tuková tkáň). Všechny tři se výrazně liší svou anatomií a funkcí. Epidermis i dermis se zase skládají z podvrstev.



Obrázek 1: Schéma jednotlivých vrstev kůže (převzato z [19])

- Epidermis

Epidermis (pokožka) je vrchní vrstva kůže, která se skládá z mnoha vrstev dlaždicového epitelu. Spodní vrstvy epitelu obsahují živé buňky, které se neustále dělí a vytlačují staré buňky na povrch kůže. Vrstvy také obsahují barvivo melanin, které chrání orgány pod kůží před škodlivými účinky ultrafialového záření. Povrchové kožní buňky pigmentují a odumírají, čímž se vytváří tenká vrstva rohoviny. Rohovina se skládá z keratinu, díky němuž je kůže odolnější vůči mechanickým a chemickým vlivům, což zlepšuje její ochranné vlastnosti [20].

- Dermis

Dermis (škára) je vrstva kůže uložená pod epidermem, která se skládá z elastického vaziva. Tato vrstva obsahuje mnoho krevních, lymfatických cév a taky nervových vláken.

Cévy tvoří složitou síť, která je zásobárnou krve a hraje důležitou roli v termoregulaci organismu. Kromě toho dermis obsahuje fibroblasty – buňky, které syntetizují kolagen a elastin, důležité bílkoviny, zajišťující pružnost a pevnost kůže.

V dermisu se nacházejí také potní žlázy. Vypadají jako svinuté kuličky, z nichž póry na povrchu kůže vychází trubicovitý vývod. Póry jsou všude na povrchu kůže a jejich produkt se nazývá pot. Odpařováním potu z povrchu kůže se kůže ochlazuje.

V pokožce se nacházejí také mazové žlázy, které produkují kožní maz. Ten se dostává na povrch pokožky prostřednictvím chloupků a chrání pokožku před podrážděním a ztrátou vlhkosti [20].

- Hypodermis

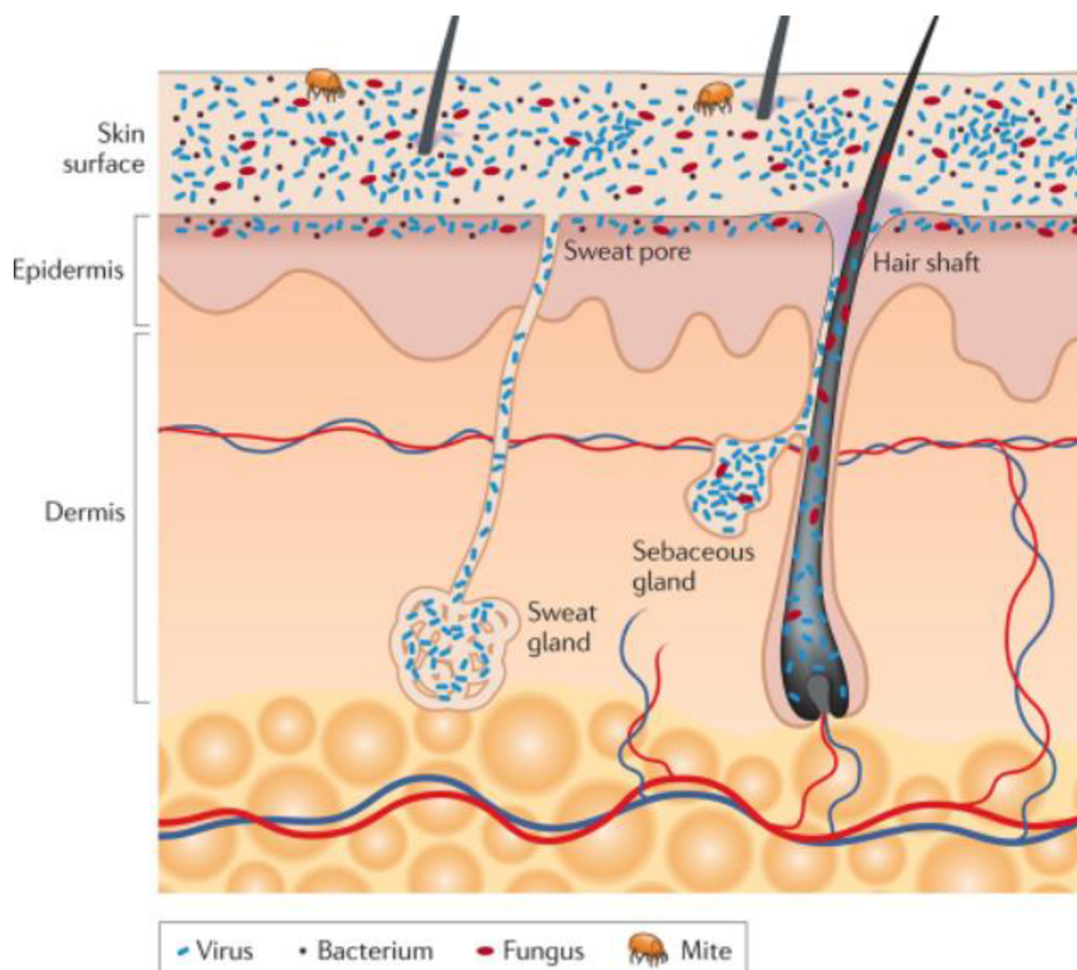
Hypodermis (podkoží) je třetí vrstva kůže, která se skládá z tukových buněk a pojivové tkáně. Nachází se přímo mezi škárkou a svaly, kostmi nebo jinými vnitřními orgány. Jednou z hlavních funkcí podkoží je energetická rezerva. Tukové buňky v této vrstvě uchovávají energii ve formě tuku. Když tělo potřebuje energii, tuk se rozkládá a uvolňuje energii, kterou lze využít.

Kromě toho podkoží obsahuje cévy a nervy, které pomáhají regulovat tělesnou teplotu a citlivost kůže. Hypodermis také hraje důležitou roli v mechanické obraně těla, stejně jako při hojení ran a regulaci cyklu růstu vlasů [21].

2.4.2 Mikroflóra kůže

Kůže je ekosystém složený z různých stanovišť s množstvím záhybů, invaginací a specializovaných výklenků, které podporují širokou škálu mikroorganismů. Hlavní úlohou kůže je sloužit jako fyzická bariéra, která chrání naše tělo před možným útokem cizích organismů nebo toxických látek. Kůže je také rozhraním s vnějším prostředím a jako taková je kolonizována různorodou sbírkou mikroorganismů — včetně bakterií, hub, virů a roztočů. Mnoho z těchto mikroorganismů je neškodných a v některých případech poskytují životně důležité funkce, bez kterých by se lidský genom nevyvinul. Symbiotické mikroorganismy zauímají širokou škálu kožních výklenků a chrání před invazí patogenními nebo škodlivými organismy. Porušení rovnováhy mezi hostitelem a mikroorganismem může vést ke kožním onemocněním nebo infekcím [22].

Rozmanitost a relativní hojnost mikrobiálních komunit těla se liší jak u jednotlivců, tak ve fyziologii kožních míst, která byla rozdělena do čtyř hlavních mikroprostředí kůže: mastná, vlhká, suchá a kůže chodidla. Mazovým místům, jako je obličej a trup, dominovaly druhy rodů *Cutibacterium* a *Staphylococcus*, zatímco vlhkým oblastem, jako jsou záhyby loktů a kolen, dominovaly druhy *Corynebacterium* a *Staphylococcus* [23].



Obrázek 2: Schéma histologie kůže v průřezu s mikroorganismy a kožními přídatky (převzato z [22])

2.4.3 Onemocnění kůže

Kožní mikrobiom získal v posledních letech významnou pozornost v dermatologii, kožních problémech a jeho propojení a vlivu na imunitní systém. Mnoho kožních stavů je spojeno s nerovnováhou v mikrobiomu kůže. Stále více studií ukázalo obohacené patogeny a mikrobiotu, které jsou spojeny s kožními stavy, z nichž některé jsou zřejmé a jiné překvapivější. Je však obtížné určit, zda změněný mikrobiom kůže je příčinou nebo důsledkem kožní poruchy [24].

Tabulka 1: Kožní mikrobiota spojená s devíti běžnými kožními chorobami. (převzato z [24])

Nemoc	Přidružená kožní mikrobiota	Další poznámky
Akné vulgaris	Zvláštní kmeny <i>C. acnes</i>	Podávané probiotické bakterie mohou hrát ochrannou roli.
Atopická Dermatitida	Snížená bakteriální rozmanitost. Zvýšená hojnost <i>S. aureus</i> .	Virus Herpes simplex a virus Coxsackie mohou infikovat AD * kůži
Psoriáza	Vyšší množství <i>Staphylococcus</i> a <i>Streptococcus</i> .	Léčba proti psoriáze vede k mikrobiálním změnám kůže.
Hidradenitis suppurativa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (kvasinky), <i>Prevotella</i> , a <i>Porphyromonas</i> (bakterie)	Anaerobní druhy v lézích.

Pokračování tabulky 1: ...

Růžovka	<i>Demodex folliculorum</i> (roztoci)	<i>C. acnes</i> se sníží a <i>Snodgrassella alvi</i> se zvýší. <i>Geobacillus</i> a <i>Gordonia</i> .
Lupy a seboroická dermatitida	<i>Malassezia</i> spp. (kvasinky)	Potenciální bakteriální nerovnováha.
Alopecie areata	Omezené údaje. Možná nerovnováha <i>C. acnes</i> / <i>S. epidermidis</i> .	Potenciální role cytomegaloviru a / nebo hub <i>Alternaria</i> .
Rakovina kůže	Merkel bell Polyomavirus, <i>Fusobacterium</i> , a <i>Trueperella</i> , <i>S. aureus</i> .	Zvýšení některých kmenů <i>S. aureus</i> v kombinaci se snížením kožních komenzálů.
Hojení	<i>S. aureus</i> a bakterie tvořící biofilm	Laktobacily a fermentované produkty mohou být prospěšné.

Rosacea, akné a atopická dermatitida (AD) jsou nejčastějšími kožními onemocněními.

Rosacea je chronické kožní onemocnění, které postihuje především obličej lidí středního a staršího věku. I když patologická rosacea je stále neznámá, její vývoj pravděpodobně souvisí s přítomností některých mikroorganismů, jako je *Helicobacter pylori*, *S. epidermidis* (β-hemolytická) a roztoc *Demodex*. Studie o použití probiotik a / nebo prebiotik k léčbě růžovky jsou stále omezené.

Akné je běžné kožní onemocnění, které postihuje především dospívající. Faktory, které mohou způsobit akné vulgaris, jsou hyperkeratinizace, obstrukce mazových folikulů vyplývající z abnormální keratinizace infundibulárního epitelu, stimulace sekrece mazových žláz androgeny a mikrobiální kolonizace pilosebaceózních jednotek *P. acnes*.

Atopická dermatitida je nejčastějším chronickým nebo opakujícím se zánětlivým onemocněním kůže, které často předchází astmatu a alergickým onemocněním. AD je běžná u dětí a často se vyskytuje v dospívání nebo dospělosti. Dysfunkce kožní bariéry a nevyvážený imunitní systém jsou dvě z několika příčin těchto kožních onemocnění [25].

2.5 Kosmetologie a kosmetika

Kosmetologie je obor, který se zaměřuje na estetickou péči o tělo a příslušné procedury. Pojem kosmetika se používá k popisu vlastností krásy a také označuje výrobky nebo materiály, které slouží k zlepšení vzhledu. V souladu se zákonem o potravinách, léčivech a kosmetice (FDC) se kosmetika definuje jako výrobky určené k aplikaci na tělo nebo jeho části za účelem čištění, zkrášlení, zvýšení atraktivity nebo změny vzhledu. Kosmetika může být také součástí jiných kosmetických výrobků, s výjimkou mýdla [26] .

K dispozici je nepřetržitá řada produktů pro lokální použití, od dekorativních až po léčebné. Kosmetické výrobky lze rozdělit do několika kategorií podle jejich účelu. Dekorativní kosmetika je určena ke zlepšení vzhledu zakrytím nedokonalostí a zvýrazněním předností. Výrobky pro péči o pleť jsou, naproti tomu, určeny k dosažení jemné a pružné pleti

a k její ochraně před negativními vlivy prostředí, jako je slunce, chlad, vítr a další faktory [27].

2.5.1 Historie využívání probiotik v kosmetologii

Historie využívání probiotik v kosmetologii sahá až do počátku 20. století, kdy Ilya Mechnikov představil koncept probiotik a jejich potenciálního přínosu pro lidské zdraví. V současné době je průmysl probiotik globálně hodnocen na miliardy dolarů s očekávaným ročním růstem 7 %. S narůstajícím množstvím studií zaměřených na probiotika a mikrobiální společenství trávicího systému se také zvažuje jejich možné využití v produktech osobní péče, jako jsou pleťové vody, krémy a zubní pasty. V oblasti péče o pleť se již dlouhodobě zkoumají možnosti využití probiotik k posílení funkce a krásy pokožky, a vědci se zabývají otázkou, zda by probiotika mohla být účinná při léčbě některých kožních onemocnění. Předpokládá se, že trend začleňování probiotik do výrobků osobní hygieny bude nadále pokračovat a rozšiřovat se [28].

2.5.2 Aplikace probiotických produktů na kůži

Většina probiotik je obsažena v potravinách nebo doplňcích stravy a je zaměřena na fungování ve střevě. Nestřevních aplikací probiotik je málo; hlavně pokud jde o urogenitální trakt. Probiotický princip však bude pravděpodobně použitelný pro jakékoli prostředí, kde existuje normální mikrobiota. Kůže má také normální mikrobiotu, i když méně složitou než střevní kvůli drsnému prostředí, které lidská kůže poskytuje. Tato normální mikrobiota kůže se pravděpodobně podílí na kompetitivním vyloučení patogenů, což je funkce, která by mohla být vylepšena použitím probiotik [29].

Ačkoli probiotika jsou široce studovány, mechanismy jejího působení při prevenci nebo léčbě bakteriálních infekcí na jiných částech těla, jako je kůže, ženský urogenitální trakt a dýchací cesty, se stále studují. Postuluje se však, že mohou existovat mechanismy podobné mechanismům střevního epitelu. Je dokázáno, že probiotika mohou zlepšit lidské zdraví při perorálním užívání a lokálním užívání.

Možné mechanismy působení probiotik na kůži, ženský urogenitální trakt a dýchací cesty při lokální aplikaci:

- Konkurenční vyloučení škodlivých mikroorganismů
- Výroba chemických látek (organické kyseliny, bakteriociny, peroxid vodíku atd.) k potlačení škodlivých MO
- Inhibice adheze MO
- Podpora sekrece mucinů (pro zlepšení bariérové funkce a vyloučení MO)
- Stimulace uvolňování defenzinů z hostitelských buněk
- Produkce růstových substrátů (vitaminů) pro jiné bakterie
- Konkurence o živiny [25].

2.6 Metody identifikace probiotických organismů

Během posledních desetiletí se zvýšily možnosti mikrobiologické diagnostiky. Existuje celá řada identifikačních metod, které jsou rozlišeny podle diskriminačních schopností, reprodukovatelnosti a pracnosti. Stále častěji se používají metody umožňující v krátkém čase

izolovat a identifikovat mikroorganismy a získat konečné výsledky testů. Tyto metody se vyznačují vysokou reprodukovatelností, přesností a cenovou dostupností [30] [31].

2.6.1 Fenotypové metody

V průmyslové nebo aplikované mikrobiologii se k identifikaci bakterií mléčného kvašení v potravinách stále hojně používají fenotypové metody. Tyto metody zahrnují morfologickou a fyziologickou charakterizaci, modely fermentace sacharidů a profilování proteinů. Jsou oblíbené především proto, že většina testů nevyžaduje speciální vybavení a identifikační databázi. Přesný taxonomický základ těchto databází však není vždy znám nebo dobře zdokumentován. Fenotypové metody však mají také svá omezení. Tyto testy umožňují rozlišení pouze na úrovni rodu, protože mají poměrně špatnou reprodukovatelnost a nízké taxonomické rozlišení [31].

2.6.1.1 Morfologické metody

Ve většině případů je prvním znakem používaným k identifikaci a charakterizaci bakterie její buněčná morfologie. Morfologická metoda zahrnuje pozorování tvaru, velikosti, zbarvení a dalších fyzikálních vlastností bakteriálních buněk. Tato metoda může rychle pomoci určit typ bakterií přítomných ve vzorcích. Pomocí mikroskopu lze například určit tvar bakterií, jejich pohyb a přítomnost specifických struktur, jako jsou spory a kapsule. K rozlišení bakterií mléčného kvašení se nejčastěji používají metody barvení podle Grama, barvení endospor a enkapsulace. Tyto metody umožňují rozdělit bakterie na grampozitivní a gramnegativní organismy na základě jejich reakce na barviva použítá při barvení [32].

2.6.1.2 Biochemické a fyziologické metody

Identifikace mikroorganismů pomocí fyziologických a biochemických testů zahrnuje údaje o růstu organismu za různých podmínek, jako je teplota, hodnoty pH, koncentrace solí, atmosférické podmínky (aerobní/anaerobní), a také údaje o přítomnosti nebo aktivitě různých enzymů, metabolismu sloučenin atd. Například test katalýzy oxidace glukózy může určit, zda je bakterie schopna využívat glukózu jako zdroj energie [33].

2.6.2 Molekulárně diagnostické metody

Molekulárně diagnostické techniky rozšířily možnosti mikrobiologie a zvýšily počet známých mikrobiálních druhů. Genetické metody identifikace bakterií se začaly používat v roce 1985 s vynálezem polymerázové řetězové reakce (PCR). Od té doby bylo vyvinuto a zkonstruováno mnoho metod založených na různých principech, jako je sekvenování DNA, sekvenování 16S rRNA a hybridizace [34].

Většina metod molekulární identifikace bakterií je založena na různých variantách analýzy DNA zahrnující amplifikaci nebo sekvenování. Tyto metody mohou být jednoduché, například PCR, PCR v reálném čase a RAPD-PCR, nebo složitější, například analýza restričních fragmentů, cílené sekvenování genů a celého genomu a hmotnostní spektrometrie [34].

Pro kontrolu kvality probiotik je nutné spolehlivě identifikovat jejich druhy a kmeny. K tomuto účelu se používají rychlé metody založené na PCR, které zkoumají místo intergenového spaceru 16S-23S rRNA a vytvářejí rodově a druhově specifické primery. Tyto

metody umožňují nejen identifikaci schválených kmenů, ale také popis nových kmenů. Sekvenování genu 16S rRNA je však považováno za zlatý standard a je široce používáno k získání užitečných taxonomických informací na úrovni druhů. Umožňuje přesnější identifikaci bakteriálního druhu a kmene, což je důležité pro zajištění bezpečnosti a účinnosti probiotik [35].

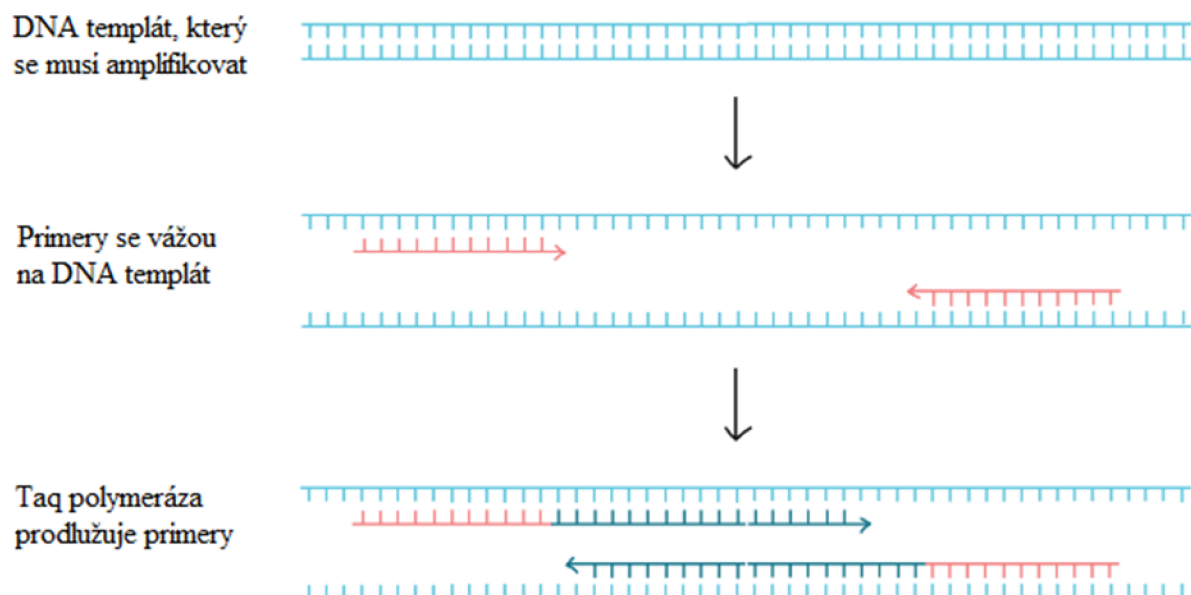
2.6.2.1 Metoda PCR

PCR je v laboratořích hojně používaná metoda, která dokáže vytvořit několik kopií (miliony nebo miliardy!) určitého kusu DNA. K vytvoření kopií pro analýzu běžnými laboratorními metodami je zapotřebí pouze malé množství původní DNA, díky tomu je PCR citlivým testem. PCR vyžaduje templátovou DNA, primery, nukleotidy a DNA polymerázu [36].

Klíčový enzym, který vytváří nová vlákna DNA s využitím stávajících vláken jako matrice se nazývá DNA polymeráza. Při PCR se obvykle používá Taq polymeráza izolovaná z termostabilní bakterie *Thermus aquaticus* [36].

Nukleotidy se skládají ze čtyř bází – adenin, thymin, cytosin a guanin (A, T, C, G), které se nacházejí v DNA. Jsou to stavební kameny, z nichž polymeráza DNA vytváří konečný produkt PCR. V reakci primery určují přesný produkt DNA, který má být amplifikován [36].

Pro každou reakci PCR se používají dva primery, které hybridizují s opačnými vlákny DNA: jeden se nachází vlevo (5') od cílové sekvence a druhý vpravo (3'). Primery jsou sekvence, které se vážou na matricová vlákna DNA přesně na okrajích kopírované oblasti. Když se primery navážou na matrici, vytvoří komplementární páry s bázemi DNA [37].



Obrázek 3: schéma uspořádání DNA a primerů (upraveno dle [38])

Proces PCR se skládá ze tří hlavních kroků:

1. Denaturace

Je oddělení dvou vláken DNA, které se získá zvýšením teploty. V této první fázi reakce se teplota zvýší na 94 – 96 °C, což se nazývá denaturační teplota. Při této teplotě se vodíkové

vazby mezi nukleotidy rozpadnou a dvouřetězcová DNA se rozdělí na jednotlivé jednořetězcové fragmenty.

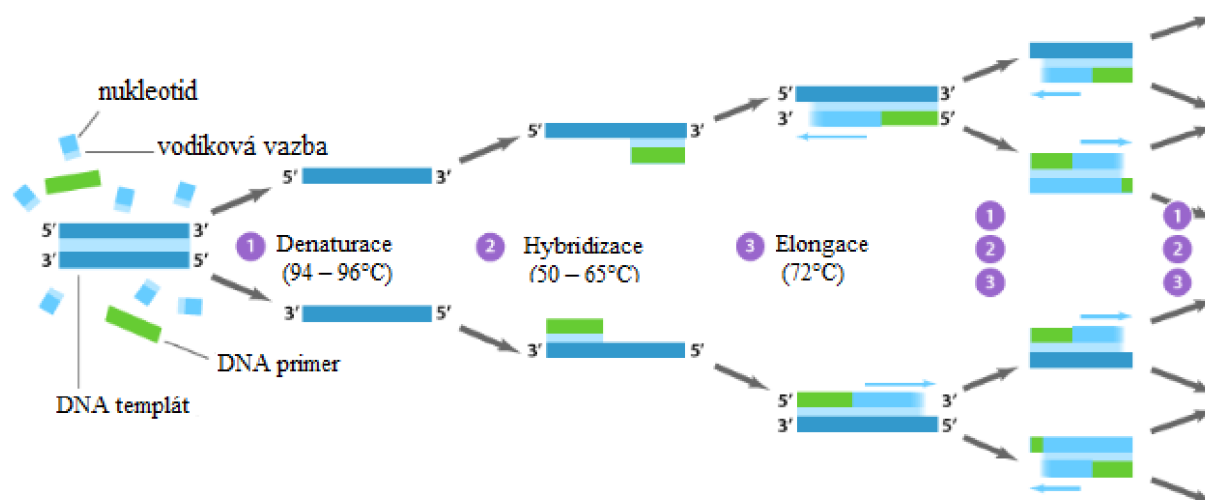
2. Hybridizace

Druhým krokem v procesu PCR je hybridizace, která probíhá při teplotě obvykle mezi 50 a 65 °C. Při snížení teploty se obnoví vodíkové vazby, což umožní primerům navázat se na své komplementární sekvence na jednořetězcovém vlákně DNA.

3. Elongace

Ve třetím kroku probíhá syntéza komplementárního řetězce při teplotě 72 °C. Taq polymeráza se naváže na jednořetězcovou DNA a zahájí replikaci pomocí deoxyribonukleosidtrifosfátů v reakční směsi. Výsledkem je, že Taq polymeráza prodlužuje primery a syntetizuje nová vlákna DNA [39].

Každý cyklus zdvojnásobí množství DNA přítomné v předchozím cyklu. Tento cyklus se ve standardní reakci PCR opakuje 25 až 35krát a obvykle trvá 2 až 4 hodiny v závislosti na délce kopírovaného úseku DNA [34].



Obrázek 4: schematické znázornění PCR reakce (upraveno dle [40])

Cílem PCR je obvykle získat dostatečné množství cílového fragmentu DNA pro následnou analýzu nebo výzkum. DNA získanou pomocí PCR lze například sekvenovat, vizualizovat pomocí gelové elektroforézy nebo klonovat do plazmidu pro další experimenty [34].

2.6.2.2 Metoda PCR v reálném čase

Nástup PCR v reálném čase přinesl významné změny do oblasti měření genové exprese. Tato metoda umožňuje současnou amplifikaci a kvantifikaci množství DNA v každém reakčním cyklu. Ke stanovení množství DNA se používá fluorescenční substrát, který se váže na DNA v reakční směsi. Tento substrát má schopnost emitovat světlo, když je excitován určitou vlnovou délkou světla, což umožňuje zaznamenat úroveň fluorescence v každém reakčním cyklu. Množství výchozího templátu lze určit podle úrovně fluorescence substrátu, který odráží množství přítomné DNA. Signál se zesiluje podle počtu kopií DNA ve vzorku [41].

PCR v reálném čase používá různé fluorescenční markery, jako jsou SYBR Green, TaqMan sondy a Molecular Beacon sondy. Metoda SYBR green používá fluorescenční substrát, který se váže na dvouřetězcovou DNA v nespecifickém pořadí, a v každém cyklu se měří světlo. U metody TaqMan sonda se váže na cílovou sekvenci DNA a je hydrolyzována enzymem, který uvolňuje fluorescenční signál. Tyto sondy jsou stejně přesné jako jiné používané v metodě PCR, ale jsou specifitější, protože měří pouze specifickou sekvenci DNA [42]. Přestože přesnost výsledků při použití SYBR greenu může být nižší než u jiných metod, díky své univerzálnosti a relativně nízkým nákladům je nejběžnější metodou kvantifikace v PCR v reálném čase [43].

PCR v reálném čase si získala širokou oblibu díky své rychlosti, přesnosti, spolehlivosti a snížené pravděpodobnosti kontaminace vzorků. Hlavní nevýhodou této metody je však potřeba drahého vybavení a reagensů [41] [43].

2.6.3 Detekce DNA pomocí elektroforézy

Gelová elektroforéza v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu je nejběžnější metodou vizualizace amplikonů získaných PCR [37]. Tato metoda se široce používá v biochemii, molekulární biologii, genetice a klinické chemii k separaci smíšených populací makromolekul a k posouzení úspěšnosti reakcí PCR. Elektroforéza v agarosovém gelu je neúčinnější pro oddělení fragmentů DNA mezi 100 bp a 25 kbp [44]. Fragmenty DNA menší než 100 bp jsou účinněji odděleny elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Agarosa je izolována z mořských řas a tvoří síť svazků, jejichž velikost pórů určuje molekulární přenosové vlastnosti gelu. Na rozdíl od agarosových gelů se matrice polyakrylamidového gelu tvoří chemickou reakcí s volnými radikály. Takové polyakrylamidové gely mají obvykle vyšší koncentraci a lepší rozlišení [45].

Metoda elektroforézy spočívá v tom, že se DNA vloží do jamek naplněných agarosovým gelem, zalije se roztokem pufru a připojí se elektrický proud. Protože fosfátová skupina molekuly DNA je záporně nabitá, budou molekuly v elektrickém poli migrovat směrem ke kladně nabitě anodě. Jedním z modelů pohybu DNA v gelu je „offsetové odpuzování“, při němž se přední okraj molekuly pohybuje dopředu a táhne se sebou svůj zbytek. Rychlost migrace molekuly DNA závisí na velikosti molekuly, koncentraci agarosy, konformaci molekuly, napětí, přítomnosti ethidium bromidu, typu agarosy a pufru. Jakmile je DNA oddělena, lze ji vizualizovat pod ultrafialovým světlem [45].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

Pro experimentální část byly použity kosmetické produkty, které byly zakoupené v komerční síti

3.1.1 Použité probiotické kosmetické výrobky

RYOR

Kosmetický výrobek

Krém proti zarudnutí a rozšířeným žilkám s probiotiky

Charakteristika:

Vysoce účinný krém na bázi tekutých krystalů s výrazným zklidňujícím účinkem, který je vhodný pro všechny typy podrážděné pokožky. Působí proti zarudnutí, pleť hydratuje, zklidňuje a vytváří na pokožce ochrannou bariéru. Obsahuje kombinaci složek, včetně extraktu z dubu korkového a mořských řas, probiotické kultury *Lactobacillus pentosus* a komplexu vitaminů A, C a E.



Obrázek 5:
Výrobek Ryor

Složení:

Voda, avokádový olej, triglycerid kyseliny kapronové, cetearylolivát, sorbitanolivát, hydrogenovaný polyisobuten, glycerin, cetearylalkohol, cetylpalmitát, sorbitanpalmitát, sorbitanoleát, *Lactobacillus fermentační lyzát*, kaproylprolinát sodný, oleylerukát, olej z kokosovníku ořechoplodého, extrakt z kořenu dubu korkového, extrakt z mořských řas, tokoferol acetát, jojobový olej, pentylenglykol, lacinin, alkohol, askorbylpalmitát, tokoferol, retinol, polysorbát 20, fenoxylethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, parfém, alfa-isomethylionon, benzylsalicylát, butylfenylmethylpropional, citronellol, geraniol, hexylcinnamal, linalol.

Výrobce:

Ryor, a.s., Pod Spiritkou 4, 150 00 Praha 5, Czech Republic

YOGHURT OF BULGARIA

Kosmetický výrobek

Probiotický krém na obličej

Charakteristika:

Kombinuje lehkou a jemnou strukturu s mimořádně účinnými přísadami pro boj proti stárnutí pokožky. Obsahuje hydrolyzovaný (syrovátkový) protein z jogurtu a organický bulharský růžový olej. Obsahuje jogurtovou kulturu *Lactobacillus bulgaricus*.



Obrázek 6: Výrobek
Yoghurt of Bulgaria

Složení:

Voda, glycerin, cyklopentasiloxan, glyceryl stearát-citrát, cetearyl alkohol, glycerylstearát, máslo z máslovníku afrického, makadamový olej, dikaprylyl karbonát, cetearylethylhexanoát, ethylhexylmethoxycinamát, fermentační filtrát *Lactobacillus bulgaricus*, stearová kyselina, fenoxylethanol, kaprylylglykol, kopolymer hydroxyethyl akrylátu a akryloyldimethyltaurátu sodného, kreatin, benyofenon-3, hydrolyzovaný protein z jogurtu, parfém, methylisothiazolinon, BHT, citronellol, alfa-isomethyl ionone, geraniol, hydroxycitronelal, butylfenylmethylpropional, linalol.

Výrobce:

BIO FRESH LTD 36, Polk. Sava Moutkourov St., Plovdiv, Bulharsko

3.1.2 Chemikálie

- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SNR)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Amresco, Solon, USA)
- Hydroxid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SNR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Proteináza K (100 µg/ml vody) (Sigma, Saint-Louis, USA)
- Fenol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA)
- CIZ (chloroform-izoamylalkohol v poměře 24:1) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA)
- Octan sodný (Erba Lachema, Brno, ČR)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DLB pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI International, USA)
- BB pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI International, USA)
- CBH pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI International, USA)
- DW pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI International, USA)
- EB pufr (Bacterial DNA Kit, OMNI International, USA)
- Proteáza (Bacterial DNA Kit, OMNI International, USA)
- Agaróza FastGene (Nippon Genetics Europe, Duren, Německo)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- LD Green EliDNA (Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR)
- PS Green EliDNA (Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR)
- DNA standart FastGene (Nippon Genetics Europe, Duren, Německo)
- Nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)

3.1.3 Roztoky

- 1 M Tris -HCl

121,1 g Tris- HCl bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na 7,8. Roztok byl doplněn na objem 1 000 ml a sterilovaný 20 min. při teplotě 121 °C.

- 0,5 M EDTA

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na 8,0. Roztok byl doplněn na objem 1 000 ml a sterilovaný 20 min. při teplotě 121 °C.

- 20 % SDS

20 g pevného SDS bylo za stálého míchání rozpuštěno v 80 ml destilované vody a roztok byl zahřát na teplotu 68 °C. Hodnota pH byla upravena na 7,0 koncentrovanou HCl a objem doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

- Lyzační roztok A

Bylo smícháno 0,5 ml 1 M EDTA (pH 8,0) a 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) a objem doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

- Lyzační roztok B

Bylo smícháno 0,5 ml 1 M EDTA (pH 8,0), 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) a lysozymu tak, aby výsledná koncentrace lysozymu v roztoku byla 3 mg/ml.

- Octan sodný (3 M)

40,81 g trihydrátu octanu sodného bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody a hodnota pH byla upravena na 5,2. Roztok byl následně doplněn na objem 100 ml a sterilovaný 20 min. při 121 °C.

- TE pufr

Bylo smícháno 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 1 ml 1M Tris-HCl (pH 7,8) a objem doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

- 0,5 TBE pufr

V objemu 600 ml destilované vody bylo rozpuštěno 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité. Následně bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a roztok doplněn na objem 1000 ml. Před použitím byl roztok 10× zředěn

3.1.4 Komponenty pro PCR

- PCR Ultra voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- qPCR 2× SYTO-9 Master-mix (reakční pufr kompletní 10x koncentrovaný, Taq DNA-polymerasa, směs dNTP) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub) (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Primery specifické pro rod *Lactobacillus* (F_allact, R_allact) (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus pentosus* (F_pent, R_pent) (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* (F_delb, R_delb) (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

- Matrice DNA

3.1.5 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga miniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- DNA/RNA UV-Dekontaminační box (UVC/T-AR)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exsikátor typ N 86 KN.18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)
- Nanodrop 2000c UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Omni DNA Mini kolony (Bacterial DNA Kit, OMNI International, USA)
- PCR box EuroClone (LAF Technologies, Austrálie)
- Sběrné zkumavky (2 ml) (Omni Bacterial DNA Purification Kit)
- Thermo-Shaker TS-100C (BioSan, Riga, Latvia)
- Transiluminátor Azure biosystems C200 (Dublin, Irsko)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Laboratorní sklo a pomůcky

3.1.6 DNA použitá pro pozitivní kontrolu

Pro pozitivní kontrolu byla použita bakteriální DNA *Lactobacillus plantarum*, která byla poskytnuta panem Mgr. Janem Smetanou, Ph.D. DNA byla izolována metodou fenolové extrakce a zředěna na koncentraci 10 ng·μl⁻¹.

3.2 Metody

Použité metody byly provedeny na základě protokolu paní docentky Aleny Španové a pana docenta Bohuslava Ritticha [46].

3.2.1 Příprava hrubých lyzátů bakteriálních buněk z výrobků

Příprava hrubých lyzátů byla provedena dvěma způsoby:

1. Navážka 1 g kosmetického produktu byla smíchaná s 3 ml destilované vody a byla důkladně promíchána. Vzorky byly centrifugovány při 14 000 ot·min⁻¹ po dobu 5 min. Pak byla opatrně odstraněna lipidová vrstva, sediment byl promyt 3 ml destilované vody a opět byl centrifugován za stejných podmínek. Promytí se opakovalo 5×.

2. Navážka 1 g kosmetického produktu byla smíchaná s 3 ml destilované vody a byla důkladně promíchána. Vzorky byly centrifugovány při $14\,000\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 5 min. Pak byla opatrně odstraněna lipidová vrstva, sediment byl slit a ke vzorku bylo přidáno 500 μl TE pufru.
 - Do dvou 1,5 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 0,5 ml vzorku krému a přidáno 1ml lyzačního roztoku B.
 - Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě.
 - Dále bylo napipetováno ke směsi 25 μl 20 % SDS a 5 μl proteinasy K ($0,1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).
 - Vzorky byly inkubovány do příštího dne při teplotě $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Izolace DNA fenolovou extrakcí

- K 500 μl lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu. Směs byla kývavým pohybem promíchána po dobu 4 minut a následně byla centrifugována při $15\,000\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ 5 minut.
- Do čisté zkumavky byla odebrána vodní fáze s DNA a byla doplněna TE pufrům na objem 500 μl .
- Do vzorků bylo přidáno 700 μl roztoku CIZ (chloroform:isoamylalkohol, 24:1) a směs byla opět kývavým pohybem promíchána po dobu 4 minut.
- Následně byla směs centrifugována 5 minut při $15\,000\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Poté byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky.

3.2.3 Srážení DNA etanolem

- Ke vzorkům DNA bylo napipetováno 20 μl 3M octanu sodného a roztok byl promíchán.
- Poté byl přidán 1 ml 96 % etanolu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a směs byla opět promíchána a ponechána k vysrážení 30 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po inkubaci vzorky byly zcentrifugovány 15 minut při $14\,500\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$, pak byl opatrně slit supernatant.
- Sediment byl vysušen v exsikátoru po dobu 10 – 15 minut.
- Následně byly vzorky rozpuštěny v 50 μl TE pufru.
- Takto připravená DNA byla uchovávána při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 Izolace DNA z hrubých lyzátoů buněk pomocí Omni Bacterial DNA Purification kitu

- K 0,5 ml vzorku krému bylo přidáno 1 ml lyzačního roztoku B.
- Vzorky byly ponechány 10 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Následně bylo přidáno 25 μl roztoku protázy a 100 μl DLB pufru.
- Směsi byly promíchány a inkubovány na termobloku 1 hodinu při teplotě 55 $^{\circ}\text{C}$.
- Vzorky byly centrifugovány 2 minuty při 10 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Do nové sterilní 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky byl odpipetován supernatant tak, aby se nenarušil pelet.
- K tomuto supernatantu bylo přidáno 220 μl BB pufru, směs byla promíchána a ponechána inkubovat 10 min při 65 $^{\circ}\text{C}$.
- Ke vzorkům bylo přidáno 220 μl ethanolu a zkumavky byly důkladně promíchány.
- Omni DNA Mini kolonka byla vložena do 2 ml sběrné zkumavky a vzorky byly přepipetovány na kolonku, včetně sraženin.
- Kolonky byly centrifugovány 1 minutu při 10 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Následně byl odstraněn supernatant a bylo napipetováno na kolonku 500 μl CBH pufru.
- Vzorky byly zase centrifugovány 1 minutu při 10 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Byl odstraněn supernatant a napipetováno na kolonku 700 μl DW pufru.
- Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 10 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Byl odstraněn supernatant a kolonky byly opět centrifugovány 2 min při 10 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Kolonka byla vložena do nové sterilní Eppendorfovy zkumavky a na ni bylo
- napipetováno 100 μl EB pufru předehřátého na 65 $^{\circ}\text{C}$.
- Vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a následně centrifugovány 1 minutu při 10 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2.5 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Na spektrofotometrickém zařízení Nanodrop 2000 byla určena koncentrace a čistota vzorků DNA izolovaných z probiotických bakterií. Pro nastavení spektrofotometru byl nejprve proměřen blanc v podobě TE pufru. Poté byly proměřeny vzorky DNA (vzorek byl nanášen o objemu 2 μl). Po uzavření prostoru byla změřena absorbance v rozsahu vlnových délek 220 – 330 nm. Koncentrace byla stanovena z hodnoty absorbance při 260 nm a čistota z poměru A_{260}/A_{280} .

3.2.6 Provedení PCR

- Před provedením polymerázové řetězové reakce byly všechny její komponenty rozmrazeny a centrifugovány.
- V tabulce (Tabulka 2) jsou uvedeny sekvence primerů používaných pro jednotlivé reakce, včetně primerů specifických pro bakteriální doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druhově specifickou PCR.

Tabulka 2: Použité primery pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druhově specifické PCR (převzato z [45], [46])

Primery	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost produktů PCR [bp]
Doména <i>Bacteria</i> [47]		
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
Rod <i>Lactobacillus</i> [47]		
F_all lact	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92
R_all lact	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT	
Druh <i>Lactobacillus pentosus</i> [48]		
F_pent	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	218
R_pent	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
Druh <i>Lactobacillus delbrueckii</i> [47]		
F_delb	CAC TTG TAC GTT GAA AAC TGA ATA TCT TAA	94
R_delb	CGA ACT CTC TCG GTC GCT TT	

- Směs pro PCR byla namíchána ve sterilním PCR boxu. Bylo připraveno o celkovém objemu 25 µl směsi pro PCR s DNA matricí všech zkoumaných mikroorganismů. Komponenty byly přidávány v pořadí uvedených v tabulkách (Tabulka 3, Tabulka 4, Tabulka 5). Jako pozitivní kontrola byla do reakční směsi přidána DNA z matricových kultur uvedených v podkapitole 3.1.6, a jako negativní kontrola byla použita PCR voda.

Tabulka 3: Směs pro konvenční PCR pro doménu *Bacteria* a rod *Lactobacillus*

Pořadí	Komponenta	Objem [µl]
1	voda pro PCR	18,0
2	SYTO-9 qPCR 2x Master Mix	4,0
3	Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0
4	Primer 2 (10 pmol/µl)	1,0
5	matrice DNA	1,0
	celkem	25,0

Tabulka 4: Směs pro konvenční druhově specifickou PCR (druhy *Lactobacillus pentosus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*)

Pořadí	Komponenta	Objem [µl]	
		<i>L. pentosus</i>	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
1	voda pro PCR	16,0	17,0
2	SYTO-9 qPCR 2x Master Mix	4,0	4,0
3	Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0	1,0
4	Primer 2 (10 pmol/µl)	1,0	1,0
5	matrice DNA	3,0	2,0
	celkem	25,0	25,0

Tabulka 5: Směs pro PCR v reálném čase dle doporučení výrobce Master Mix

Pořadí	Komponenta	Objem [μl]
1	oda pro PCR	9,5
2	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3	Primer 1 (10 pmol/μl)	1,0
4	Primer 2 (10 pmol/μl)	1,0
5	matrice DNA	1,0
	celkem	25,0

3.2.7 Amplifikační programy pro DNA

- Byla provedena amplifikace izolované DNA.
- Optimalizované teplotní programy všech vzorků byly zvoleny v závislosti na použitých primerech, viz tabulka (Tabulka 6).
- Amplifikační křivky byly analyzovány programem RotorGene 6000 Series Software.

Tabulka 6: Teplotní programy

Prodloužená denaturace DNA	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza nových řetězců DNA	Dosyntetizování DNA
Doména <i>Bacteria</i>				
95 °C/5 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	30 cyklů			
Rod <i>Lactobacillus</i>				
95 °C/5 min	94 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	30 cyklů			
Druh <i>Lactobacillus pentosus</i>				
94 °C/5 min	94 °C/1 min	56,8 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/10 min
	40 cyklů			
Druh <i>Lactobacillus delbrueckii</i>				
95 °C/5 min	94 °C/1 min	58 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/10 min
	35 cyklů			

3.2.8 Detekce produktů PCR agarósovou gelovou elektroforézou

- Byl připraven 1,6 % agarosový gel (rozpuštění 3,2 g agarosy v 200 ml 0,5 × TBE pufre) v Erlenmeyerově baňce. Dále byla suspenze rozvařena v mikrovlnné troubě.
- Po vychladnutí na teplotu kolem 60 °C k ní bylo přidáno fluorescenční barvivo GoldView (1 μl barviva/100 ml). Suspenze byla po promíchání opatrně nalita do elektroforézní vaničky, do které byl následně vložen hřebínek.
- Gel byl ponechán ke ztuhnutí cca 1 hodinu a do komůrek vzniklých po vyjmutí hřebínku byly napipetovány produkty PCR smíchané se 6 × koncentrovaným nanášecím pufrem Yeallow load.
- Do každé komůrky bylo napipetováno 18 μl vzorku PCR produktu a do jedné komůrky byl pipetován DNA standard (100 bp) o objemu 5 μl (dle doporučení

výrobce). A také do dalších komůrek byly naneseny vzorky s pozitivní i negativní kontrolou o objemu 18 μ l.

- Po vložení do elektroforetické vany byl gel přelit 0,5 \times TBE pufrem cca 0,5 cm nad výšku gelu.
- Elektroforéza probíhala 2 hodiny při konstantním napětí 70 V. Po skončení elektroforézy byl gel přesunut do UV transiluminátoru TVR- 3121 a byl vyhodnocen při vlnové délce 305 nm.

4 VÝSLEDKY

4.1 Izolace DNA

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z výrobků Ryor a Yoghurt of Bulgaria ve dvou opakováních. DNA z těchto vzorků byla izolována dvěma metodami – fenolovou extrakcí podle postupu 3.2.2 a také pomocí kitu Omni Bacterial DNA Purification dle 3.2.4. Poté byly vzorky přesráženy ethanolem v souladu s postupem 3.2.3.

4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Ke stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA byl použit spektrofotometr NanoDrop 2000 podle kapitoly 3.2.5. Pro měření koncentrace nukleové kyseliny (NA) ve vzorcích byla měřena absorbance v rozsahu vlnových délek 230 – 280 nm. Čistota extrahované DNA byla stanovena na základě poměrů absorbancí při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm. Výsledky měření vzorků z kosmetického výrobku Ryor jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 7) a výsledky měření vzorků z kosmetického výrobku Yoghurt of Bulgaria jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 8).

Tabulka 7: Spektrofotometrické stanovení NK izolovaných z kosmetického výrobku Ryor

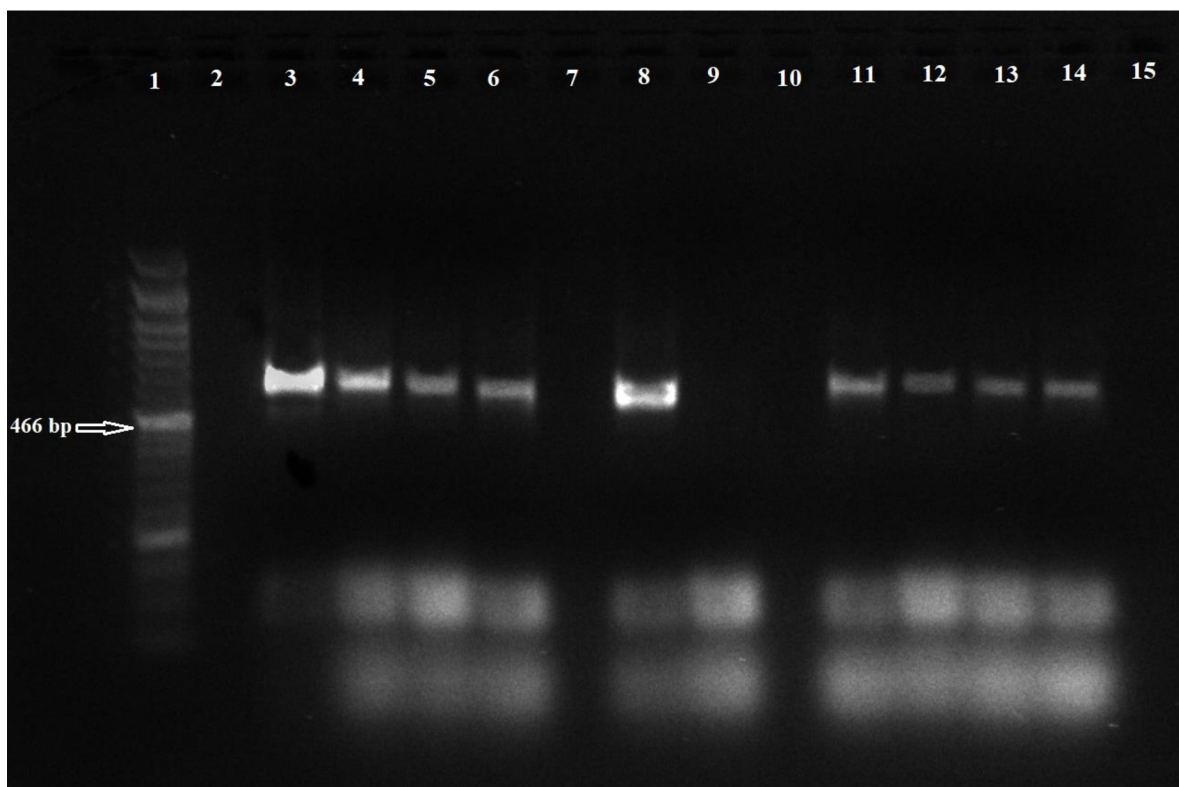
Vzorek	Metoda izolace	Koncentrace NK (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
1	fenolová extrakce	20,9	0,418	0,273	1,53	1,58
2		11,6	0,232	0,148	1,56	1,13
1	komerční kit	0,9	0,017	0,030	0,59	0,04
2		0,4	0,009	0,021	0,42	0,01

Tabulka 8: Spektrofotometrické stanovení NK izolovaných z kosmetického výrobku Yoghurt of Bulgaria

Vzorek	Metoda izolace	Koncentrace NK (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
1	fenolová extrakce	17,6	0,351	0,218	1,61	1,14
2		15,0	0,299	0,194	1,55	0,87
1	komerční kit	0,6	0,011	0,022	0,51	0,01
2		0,2	0,005	0,014	0,35	0

4.3 Průkaz přítomnosti DNA domény *Bacteria* pomocí PCR

K ověření přítomnosti domény *Bacteria* ve vzorcích produktů Ryor a Yoghurt of Bulgaria byla provedena polymerázová řetězová reakce podle postupu 3.2.6. V práci byly použity specifické primery pro doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub), kde velikost jejich produktu je podle literatury 466 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039. Výsledky detekce PCR produktů pomocí elektroforézy v agarósovém gelu jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 9) a znázorněny na obrázku (Obrázek 7).



Obrázek 7: Gelová agarosová elektroforéza po PCR na doménu Bacteria

Tabulka 9: Schéma detekce PCR produktů pro doménu Bacteria (466 bp) k obrázku 7, amplifikována DNA z výrobků Ryor a Jogurt of Bulgaria

Běh č.	DNA	Detekce
1	DNA standart (100 bp)	-
2		
3	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	+++
4	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	++
5	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	++
6	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	++
7		
8	pozitivní kontrola	+++
9	negativní kontrola	-
10		
11	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	++
12	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	++
13	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	++
14	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	++

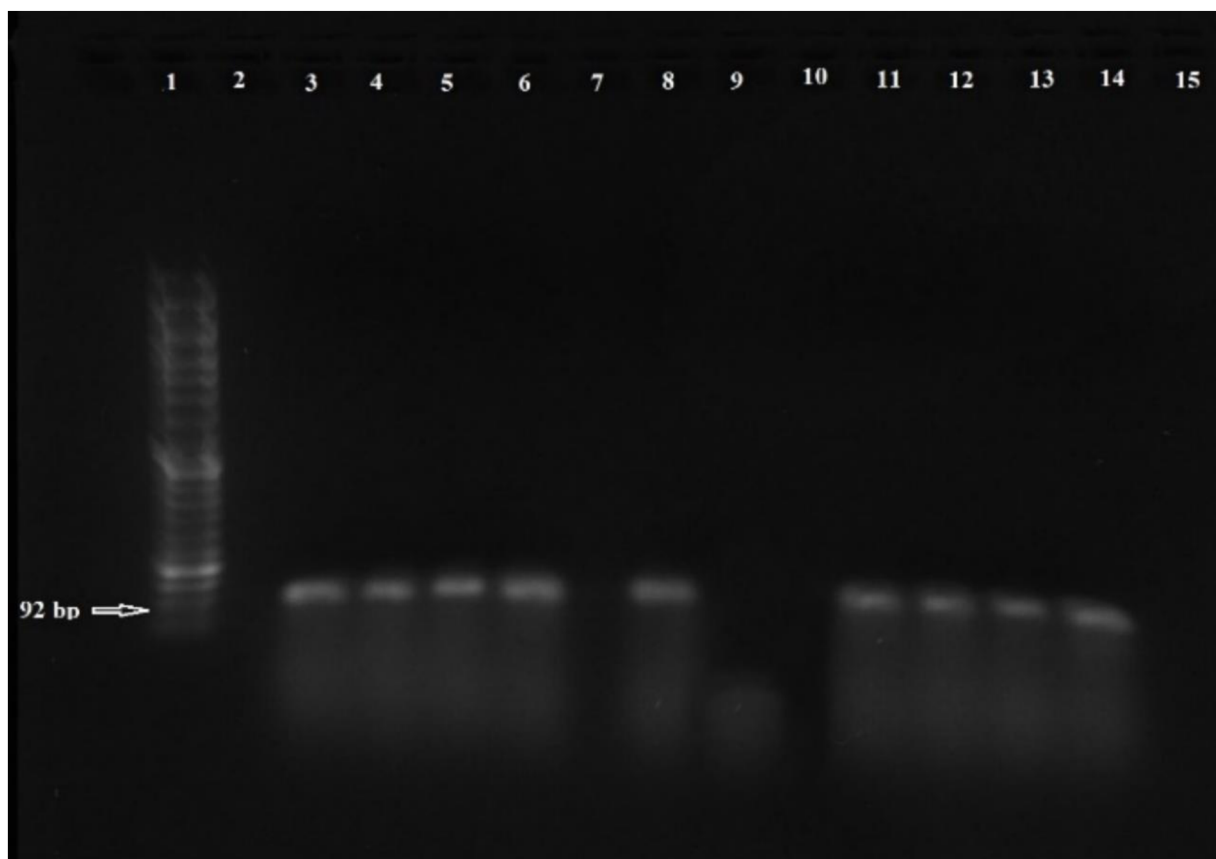
(PCR produkt: - nedetekován, + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Po amplifikaci izolované DNA byly detekovány produkty PCR značné intenzity. Silnější intenzitu vykazoval první vzorek z krému Ryor izolovaný fenolovou extrakcí. V obou

výrobcih byla prokázána přítomnost bakteriální DNA. Pozitivní kontrola potvrdila správnou funkčnost PCR reakce. Negativní kontrola neprokázala žádnou amplifikaci.

4.4 Průkaz přítomnosti DNA rodu *Lactobacillus* pomocí PCR

K ověření přítomnosti rodu *Lactobacillus* ve vzorcích byla provedena PCR podle postupu 3.2.7. Pomocí specifických primerů rodu *Lactobacillus* (F_allact, R_allact), s očekávanou velikostí produktu 92 bp dle literatury, byla zjištěna přítomnost bakteriální DNA v obou vzorcích. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039. Výsledky detekce PCR produktů pomocí elektroforézy v agarosovém gelu jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 10) a znázorněny na obrázku (Obrázek 8).



Obrázek 8: Gelová agarosová elektroforéza po PCR na rod *Lactobacillus*

Tabulka 10: Schéma detekce PCR produktů pro rod *Lactobacillus* (92 bp) k obrázku 8, amplifikována DNA z výrobků Ryor a Jogurt of Bulgaria

Běh č.	DNA	Detekce
1	DNA standart (100 bp)	-
2		
3	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	++
4	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	++
5	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	++
6	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	++
7		
8	pozitivní kontrola	++

Pokračování tabulky 10: ...

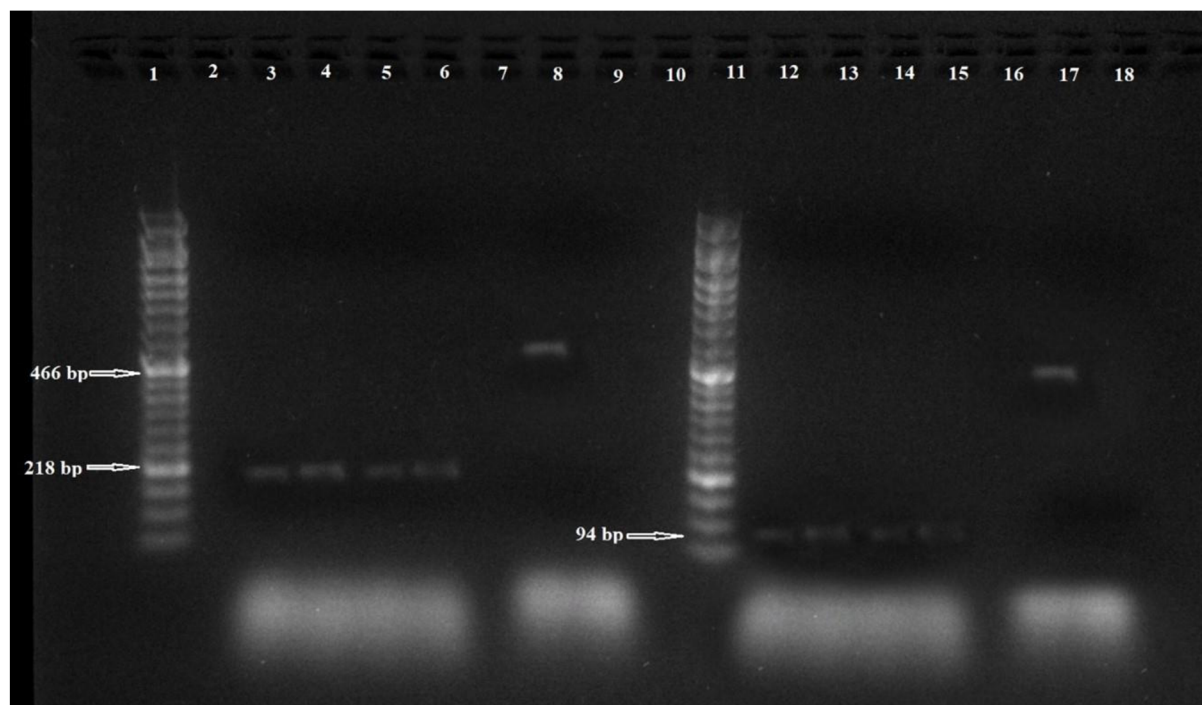
9	negativní kontrola	-
10		
11	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	++
12	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	++
13	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	++
14	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	++

(PCR produkt: - nedetekován, + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Produkty PCR byly detekovány středné intenzity. V obou výrobcích byla prokázána přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*. Pozitivní kontrola potvrdila správnou funkčnost PCR reakce. Negativní kontrola neprokázala žádnou amplifikaci.

4.5 Průkaz přítomnosti bakteriální DNA druhu *Lactobacillus pentosus* a *Lactobacillus delbrueckii* pomocí PCR

K ověření přítomnosti druhů *L. pentosus* a *L. delbrueckii* ve vzorcích produktů Ryor a Yoghurt of Bulgaria byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR) podle postupu 3.2.7. V práci byly použity specifické primery pro druh *L. pentosus* (F_pent a R_pent), kde velikost jejich produktu je podle literatury 218 bp a pro druh *L. delbrueckii* (F_delb a R_delb) s velikostí produktu podle literatury 94 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z kmene *Lactobacillus plantarum* CCM 7039. Výsledky detekce PCR produktů pomocí elektroforézy v agarózovém gelu jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 11) a znázorněny na obrázku (Obrázek 9).



Obrázek 9: Gelová agarosová elektroforéza po PCR pro druhy *Lactobacillus pentosus* a *Lactobacillus delbrueckii*

Tabulka 11: Schéma detekce PCR produktů specifických pro druhy *Lactobacillus pentosus* (218 bp) a *Lactobacillus delbrueckii* (94 bp) k obrázku 9, amplifikována DNA z výrobků Ryor a Jogurt of Bulgaria

Běh č.	DNA	Detekce
1	DNA standart (100 bp)	-
2		
3	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	+
4	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	+
5	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	+
6	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	+
7		
8	pozitivní kontrola	+
9	negativní kontrola	-
10		
11	DNA standart (100 bp)	-
12	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	+
13	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	+
14	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	+
15	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	+
16		
17	pozitivní kontrola	+
18	negativní kontrola	-

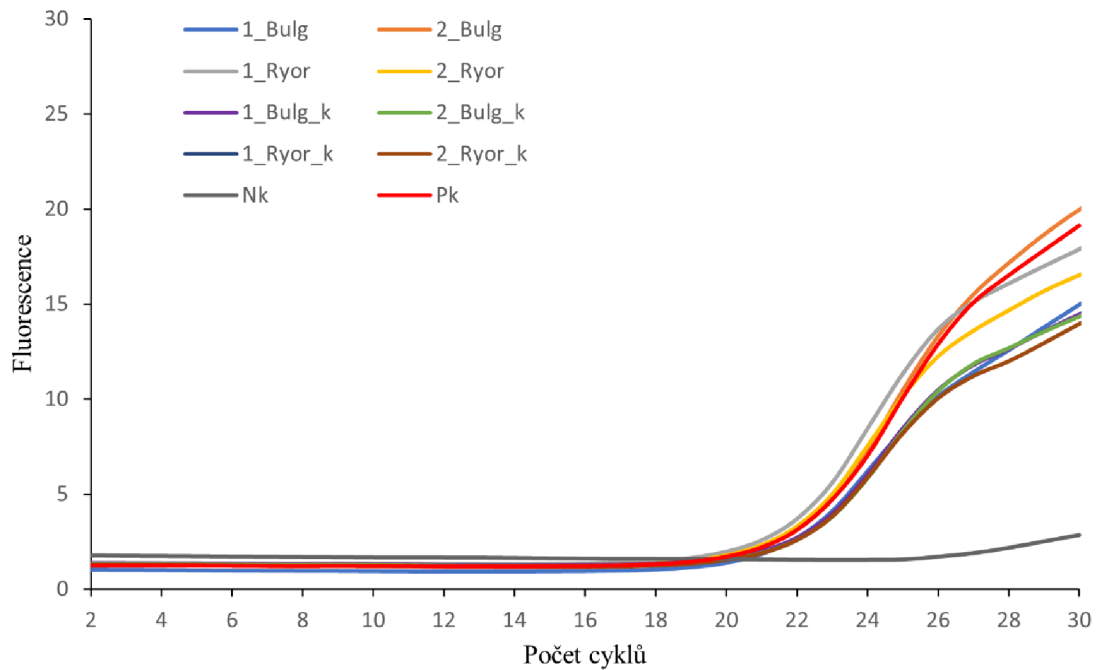
(PCR produkt: - nedetekován, + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Produkty PCR byly detekovány slabé intenzity. V obou výrobcích byla prokázána přítomnost PCR produktů specifických pro druh *Lactobacillus pentosus* a druh *Lactobacillus delbrueckii*. Také pozitivní kontrola potvrdila správnou funkčnost PCR reakce. Negativní kontrola neprokázala žádnou amplifikaci.

4.6 Průkaz přítomnosti bakteriální DNA domény *Bacteria* pomocí PCR v reálném čase

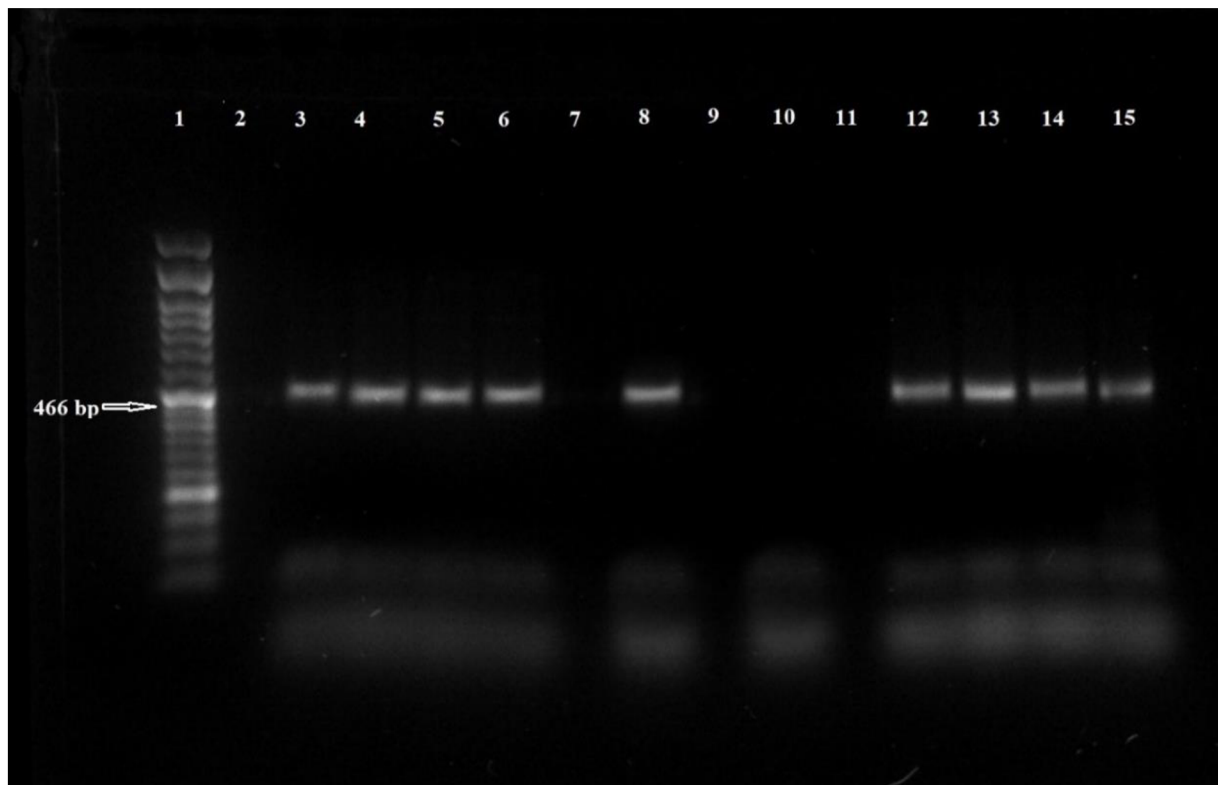
Také byla provedena reakce PCR v reálném čase pro doménu *Bacteria*. Reakce byla provedena s použitím primerů F_eub a R_eub. Směs pro PCR v reálném čase byla připravena podle tabulky (Tabulka 5). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *L. plantarum* CCM 7039.

Na obrázku (Obrázek 10) jsou zobrazeny křivky amplifikace, které ukazují průběh reakce qPCR pro různé vzorky. Všechny vzorky vykazují podobnou amplifikační schopnost, což je znázorněno podobnými trendy a rychlostmi amplifikace.



Obrázek 10: Křivky amplifikace produktů pro doménu Bacteria

Na obrázku (Obrázek 11) je zobrazena detekce PCR produktů z vzorků vybraných kosmetických výrobků, které byly izolovány fenol-chloroformovou metodou a pomocí komerčního kitu. Všechny vzorky prokázaly vysokou intenzitu detekce PCR produktů.



Obrázek 11: Gelová agarosová elektroforéza po RT – PCR pro doménu Bacteria

Tabulka 12: Schéma detekce produktů PCR pro doména *Bacteria* (466 bp) k obrázku 11, amplifikována DNA z výrobků Ryor a Jogurt of Bulgaria

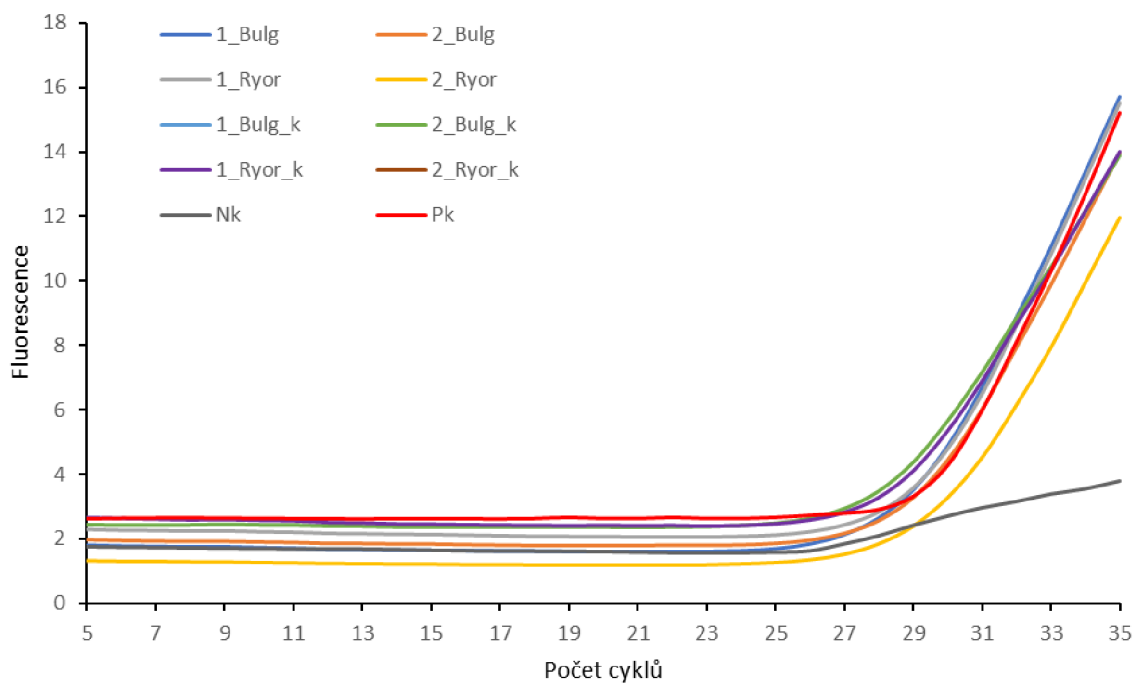
Běh č.	DNA	Detekce
1	DNA standart (100 bp)	-
2		
3	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	++
4	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	++
5	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	++
6	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	++
7		
8	pozitivní kontrola	++
9	negativní kontrola	-
10		
11	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	++
12	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	++
13	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	++
14	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	++

(PCR produkt: - nedetekován, + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

4.7 Průkaz přítomnosti bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* pomocí PCR v reálném čase

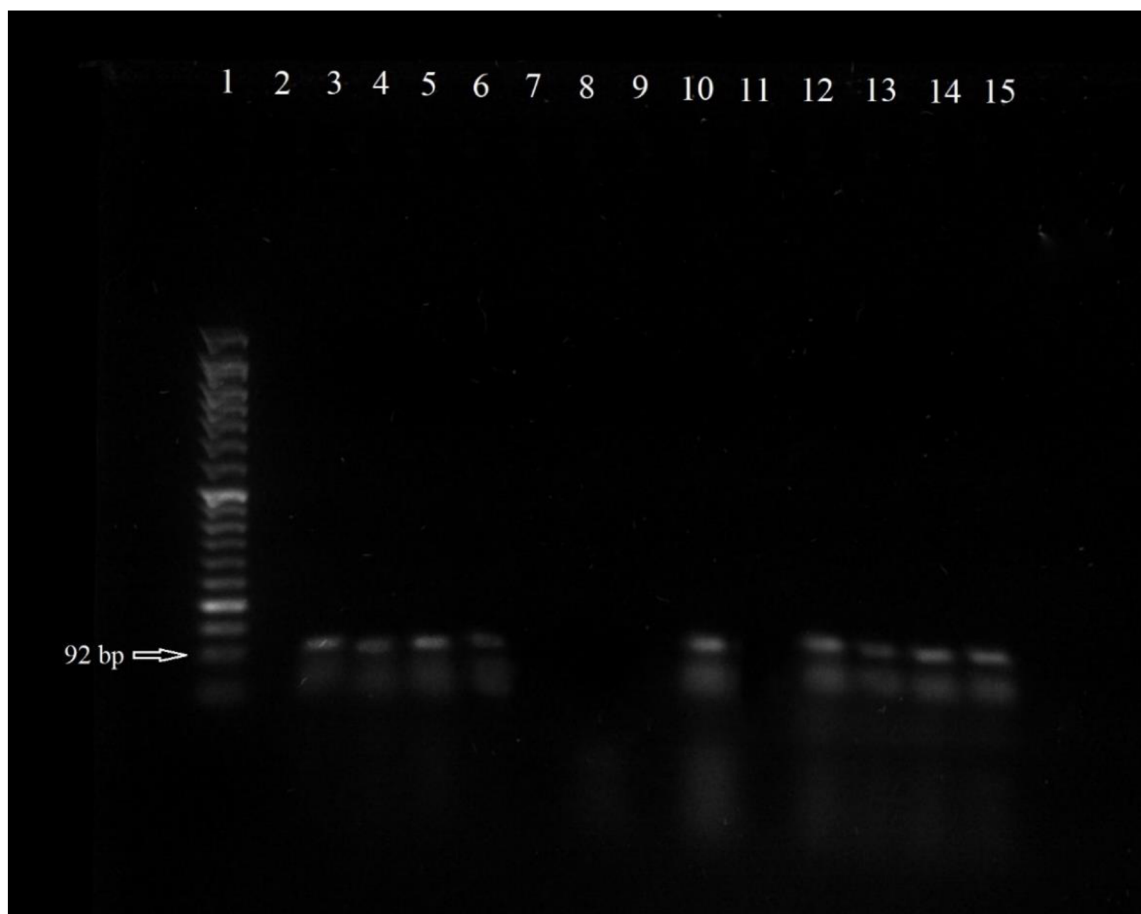
Také byla provedena reakce PCR v reálném čase pro rod *Lactobacillus*. Reakce byla provedena s použitím primerů F_allact a R_allact. Směs pro PCR v reálném čase byla připravena podle tabulky (Tabulka 5). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *L. plantarum* CCM 7039.

Na obrázku (Obrázek 11) jsou zobrazeny amplifikační křivky, které ukazují, jak se vyvíjí qPCR reakce pro jednotlivé vzorky. Všechny vzorky projevují podobnou schopnost amplifikace, což je znázorněno podobnými trendy a rychlostmi amplifikace.



Obrázek 12: Křivky amplifikace produktů pro rod *Lactobacillus*

Na obrázku (Obrázek 13) je znázorněna detekce PCR produktů z vybraných vzorků kosmetických výrobků, které byly izolovány buď fenol-chloroformovou metodou, nebo pomocí komerčního kitu. Většina vzorků vykazovala střední intenzitu detekce PCR produktů.



Obrázek 13: Gelová agarosová elektroforéza po RT – PCR pro rod *Lactobacillus*

Tabulka 13: Schéma detekce PCR produktů pro rod *Lactobacillus* (92 bp) k obrázku 13, amplifikována DNA z výrobků Ryor a Joghurt of Bulgaria

Běh č.	DNA	Detekce
1	DNA standart (100 bp)	-
2		
3	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	++
4	Ryor – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	++
5	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	++
6	Ryor – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	+
7		
8	pozitivní kontrola	++
9	negativní kontrola	-
10		
11	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 1	++
12	J. of Bulgaria – izolovaná fenolovou extrakcí, vzorek 2	++
13	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 3	++
14	J. of Bulgaria – izolovaná komerčním kitem, vzorek 4	++

(PCR produkt: - nedetekován, + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

5 DISKUZE

5.1 Izolace bakteriální DNA ze vzorků

Z kosmetických výrobků Ryor a Yoghurt of Bulgaria obsahujících probiotické bakterie, byly připraveny hrubé buněčné lyzáty pomocí dvou způsobů popsaných v kapitole 3.2.1. Vzhledem k tomu, že krémy měly vysoký obsah tuků, hlavně Yoghurt of Bulgaria, byl proces přípravy lyzátů optimalizován delší dobou centrifugací při vyšších otáčkách, aby se získala co nejvyšší koncentrace DNA. Poté byly použity dvě metody izolace DNA: fenol-chloroformová metoda a OMNI Bacterial DNA kit.

Fenol-chloroformová metoda je běžnou metodou izolace DNA s vysokou účinností pro různé typy vzorků, včetně kosmetických výrobků. Použití fenolu a chloroformu však vyžaduje určitá bezpečnostní opatření a může být nebezpečné. Kromě toho může fenol ovlivnit kvalitu izolované DNA a může nastat problém s její čistotou.

Druhá metoda je izolace DNA pomocí komerčně dostupné OMNI Bacterial DNA kitu. Výhodou této metody je, že je rychlejší a není třeba používat nebezpečné chemikálie. Také kit obsahoval všechna potřebná činidla a návod, což zjednodušuje proces izolace DNA a zabraňuje chybám při práci. Tato metoda má však i některé nevýhody, například vysoká cena. Kromě toho může být tato metoda méně účinná při izolaci DNA z produktu s vysokým obsahem tukových složek, protože tuk může inhibovat činnost některých složek kitu, které jsou nezbytné pro správnou izolaci DNA.

Bakteriální DNA byla úspěšně izolována ze vzorků všemi výše uvedenými izolačními metodami a byla přímo použita pro PCR reakci.

5.2 Stanovení čistoty a kvality izolované DNA

Pro stanovení koncentrace a čistoty bakteriální DNA v každém vzorku byla použita UV spektrofotometrická metoda s použitím přístroje NanoDrop 2000. Absorbance všech vzorků DNA izolovaných z kosmetických přípravků, byla měřena v rozsahu vlnových délek 230–280 nm. Koncentrace DNA se do značné míry lišila v závislosti na použité separační metodě a pohybovala se v rozsahu od 0,2 do 20,9 ng/μl, jak je uvedeno v tabulkách (Tabulka 7 a Tabulka 8). DNA získaná fenolovou extrakcí měla vyšší koncentraci, než DNA získaná extrakcí pomocí OMNI Bacterial DNA kit. Tento rozdíl může být způsoben vysokým obsahem tuku v krémech, jak je popsáno v kapitole 5.1. Také rozdíl v koncentracích mohl být způsoben tím, že DNA při izolaci z kitu byla rozpuštěna ve 100 μl EB pufru a DNA izolovaná metodou fenol-chloroform byla rozpuštěna v 50 μl TE pufru. Rozdíl v koncentraci DNA byl nevýznamný, ale patrný v závislosti na metodě přípravy lyzátu, tj. mezi prvním a druhým vzorkem u obou krémů. To znamená, že přidání 500 μl TE pufru do vzorku, místo jeho dalšího centrifugování, ovlivnilo koncentraci DNA. Z tohoto důvodu je lepší připravovat hrubé lyzáty bez přidání pufru.

Poměr A260/A280 udává čistotu DNA a pro čistou DNA by se tento poměr měl pohybovat mezi 1,8 a 2,0. Nižší hodnota ukazuje na kontaminaci DNA proteiny, které vykazují maximum absorbance při 280 nm a nižších vlnových délek. Vyšší hodnota poměru absorbance ukazuje na přítomnost RNA ve vzorku [49]. Jak ukazují výsledky, všechny

vzorky měly hodnoty mnohem nižší než referenční hodnota, tj. nižší než 1,8. To znamená, že všechny vzorky byly kontaminovány bílkovinami nebo jinými složkami, jako jsou tuky, emulgátory atd. Kromě toho byla DNA izolovaná pomocí komerčního kitu nejvíce kontaminovaná.

Absorbance při vlnové délce 230 nm je brána jako výsledek jiné kontaminace, proto byl také vypočten poměr A260/ A230. Pro čistou DNA by měl být poměr A260/A230 mezi 2,0 a 2,2. Samozřejmě i při tomto poměru byly získány významné rozdíly. U obou metod extrakce DNA jsou hodnoty těchto poměrů mnohem nižší než v literatuře, což svědčí o značné kontaminaci organickými rozpouštědly. Použití metody Bacterial DNA kit však vedlo k obzvláště nízkým hodnotám. Také nízký poměr A260/A230 by mohl být důsledkem zbytkového fenolu po extrakci DNA. [50]

V důsledku toho můžeme konstatovat, že při extrakci DNA z kosmetického přípravku pomocí Bacterial DNA kitu dochází k větší kontaminaci DNA, protože kosmetické produkty jako krémy obsahují velké množství obtížně odstranitelných látek (tuky, konzervační látky, emulgátory).

5.3 Identifikace domény *Bacteria*

Bakteriální DNA z kosmetických výrobků Ryor a Yoghurt of Bulgaria byla amplifikována pomocí klasické PCR a PCR v reálném čase s použitím specifických primerů F_eub a R_eub. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA *L. plantarum*. Získaný produkt PCR byl vyhodnocen elektroforeticky.

Grafy amplifikačních křivek poskytly informace o počátku exponenciální fáze amplifikace, která je charakterizována geometrickým nárůstem množství amplikonů v každém cyklu.

Při konvenční PCR a kvantitativní PCR všechny produkty hodnocené elektroforeticky, měly pásy v oblasti 466 bp. První vzorek DNA z produktu Ryor, izolovaný fenol-chromoformovou metodou, detekoval na agarósovém gelu nejsilnější intenzitu. Jak ukazuje tabulka 8, tento vzorek měl nejvyšší koncentraci nukleových kyselin a byl nejméně kontaminovaný ve srovnání s ostatními vzorky.

To vše dokazuje, že izolovaná DNA pochází z buněčných kultur patřících do domény *Bacteria*.

5.4 Identifikace rodu *Lactobacillus*

Byla provedena amplifikace DNA izolované z kosmetických výrobků Ryor a Yoghurt of Bulgaria pomocí konvenční a kvantitativní PCR s použitím specifických primerů F_all lact a R_all lact. Produkty PCR byly detekovány elektroforézou v agarosovém gelu. Pro pozitivní kontrolu byla zase použita DNA *L. plantarum*.

Analýzou grafů amplifikačních křivek jsme zjistili, ve kterém cyklu se začíná exponenciální fáze, kdy se počet amplikonů zdvojnásobuje s každým cyklem.

Všechny produkty amplifikované PCR konvenční a v reálném čase měly pásy v oblasti 92 bp a vykazovaly více méně stejnou střední intenzitu.

Závěry lze vyvodit z výsledků PCR a elektroforézy, které potvrzují, že DNA z kosmetických produktů pochází z buněčných kultur, které patří do rodu *Lactobacillus*.

5.5 Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus pentosus*

Byla provedena konvenční PCR s použitím specifických primerů F_pent a R_pent pro amplifikaci DNA izolované z kosmetických výrobků Ryor. Produkty PCR byly detekovány elektroforézou v agarosovém gelu. Pro ověření správnosti amplifikace byla použita pozitivní kontrola DNA *L. plantarum*. Byly detekovány specifické produkty PCR o velikosti 218 bp. Výsledků PCR a elektroforézy potvrzují, že DNA z kosmetického produktu Ryor pochází z buněčných kultur druhu *Lactobacillus pentosus*.

5.6 Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus bulgaricus*

Pro ověření přítomnosti DNA druhu *Lactobacillus bulgaricus* v kosmetickém výrobku Yoghurt of Bulgaria byla provedena konvenční PCR s použitím specifických primerů F_delb a R_delb. Produkty PCR byly následně detekovány agarosovou gelovou elektroforézou. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA druhu *L. plantarum*. Produkty PCR byly detekovány v gelu o velikosti 94 bp a to všechno ukazuje, že DNA z kosmetického produktu Yoghurt of Bulgaria pochází z buněčných kultur druhu *Lactobacillus bulgaricus*.

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo ověřit přítomnost bakteriální DNA v kosmetických přípravcích, obsahujících probiotické mikroorganismy. Teoretická část práce se zaměřila na probiotické mikroorganismy a jejich vliv na lidské zdraví a popisovala metody identifikace těchto mikroorganismů. Přehled literatury naznačil, že fenotypové metody jsou stále často používány k identifikaci mikroorganismů v laboratořích. Nicméně, molekulárně genetické metody jsou v současné době nejčastěji používané, protože umožňují rychlou a přesnou identifikaci mikrobiálních druhů a kmenů.

V rámci experimentální části práce byla provedena analýza kosmetických produktů Ryor a Yoghurt of Bulgaria s deklarovanou přítomností probiotických mikroorganismů. Pro izolaci DNA z těchto produktů byly použity dvě metody, a to fenolová extrakce a extrakce pomocí komerčního kitu Omni Bacterial. Kvalita a množství bakteriální DNA byly poté stanoveny spektrofotometricky. Výsledky obou extrakcí ukazují, že izolace fenolovou extrakcí poskytla vyšší množství DNA. Následně byla provedena amplifikace specifického úseku 16S rRNA genů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Produkty PCR byly následně separovány elektroforézou na agarósovém gelu a vizualizovány pomocí UV osvětlení. Ve všech kosmetických přípravcích byla potvrzena přítomnost domény *Bacteria* a rodu *Lactobacillus*. Druhově specifická PCR rovněž potvrdila přítomnost deklarovaných probiotických druhů *Lactobacillus pentosus* a *Lactobacillus bulgaricus* v kosmetických výrobcích.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FIGUEROA-GONZÁLEZ, I., G. QUIJANO, G. RAMÍREZ a , CRUZ-GUERRERO. Probiotics and prebiotics—perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2011, **91**(8), 1341-1348 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.4367>
- [2] NAZIR, Yusuf, Syed HUSSAIN, Aidil HAMID a Yuanda SONG. Probiotics and Their Potential Preventive and Therapeutic Role for Cancer, High Serum Cholesterol, and Allergic and HIV Diseases. *BioMed Research International* [online]. 2018, 17 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1155/2018/3428437>
- [3] SHI, LH, K BALAKRISHNAN, K THIAGARAJAH, NI MOHD ISMAIL a OS YIN. Beneficial Properties of Probiotics. *Trop Life Sci Res* [online]. 2016, **27**(2), 73-90 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: doi:[10.21315/tlsr2016.27.2.6](https://doi.org/10.21315/tlsr2016.27.2.6)
- [4] FRANÇA, K. Topical Probiotics in Dermatological Therapy and Skincare: A Concise Review. *Dermatology and Therapy* [online]. 2021, **11**(1), 71-77 [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: doi:[10.1007/s13555-020-00476-7](https://doi.org/10.1007/s13555-020-00476-7)
- [5] FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health* [online]. 2014, **11**(5), 4745–4767 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: doi:[10.3390/ijerph110504745](https://doi.org/10.3390/ijerph110504745)
- [6] БЕРЕЗНЯКОВ, В.И. Прокариотические и эукариотические пробиотики. *Болезни и антибиотики* [online]. 2012, **2**(7) [cit. 2023-03-19]. ISSN 2307-1117. Dostupné z: <http://www.mifua.com/archive/article/34691>
- [7] KASIPATHY, Kailasapathy. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits - a review. *International Journal of Fermented Foods* [online]. 2013, (21), 1-17 [cit. 2022-04-01].
- [8] BRZOZOWSKI, B., W. BEDNARSKI a B. DZIUBA. Functional properties of *Lactobacillus acidophilus* metabolites. *Science of Food and Agriculture* [online]. 2009, **89**(14), 2467-2476 [cit. 2022-05-14]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.3749>
- [9] SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J.M. SCHMITTER, P. BRESSOLLIER a Sueli RODRIGUES. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(1), 1-16 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: doi:[10.1016/j.lwt.2012.05.014](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014)
- [10] CARAMIA, G., A. ATZEI a V. FANOS. Probiotics and the skin. *Clinics in Dermatology* [online]. 2008, **26**(1), 4-11 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0738081x. Dostupné z: doi:[10.1016/j.clindermatol.2007.10.008](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.10.008).

- [11] RIVERA-ESPINOZA, Y. a Y. GALLARDO-NAVARRO. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* [online]. 2010, **27**(1), 1-11 [cit. 2023-03-20]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2008.06.008.
- [12] Probiotics and skin health. In: LIZARDO, Mariana a Freni TAVARIA. *Probiotics* [online]. Centro de Biotecnologia e Química Fina—Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Diogo Botelho, Porto, Portugal: Adriano Brandelli, 2022, s. 389-405 [cit. 2022-04-01]. ISBN 9780323851701. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323851701000208>
- [13] JINYAN, Yu, Ma XUMIN a Wang XIAOYU. Application and mechanism of probiotics in skin care: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2022, **21**(3), 886-894 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/jocd.14734>
- [14] DAVANI-DAVARI, D, M NEGAHDARIPOUR, I KARIMZADEH, M SEIFAN, M MOHKAM, SJ MASOUMI, A BERENJIAN a Y GHASEMI. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* [online]. 2019, **8**(3) [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: doi:10.3390/foods8030092
- [15] MARKOWIAK, P a K ŚLIŻEWSKA. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* [online]. 2017, **9**(9) [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: doi:10.3390/nu9091021
- [16] WEGH, CAM, SY GEERLINGS, J KNOL, G ROESELERS a C BELZER. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *Int J Mol Sci* [online]. 2019, **20**(19) [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20194673
- [17] ŻÓŃKIEWICZ, J, A MARZEC, M RUSZCZYŃSKI a W FELESZKO. Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(8) [cit. 2023-03-28]. 32717965. Dostupné z: doi:10.3390/nu12082189
- [18] DYRING-ANDERSEN, B. a M.B. LØVENDORF. Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin. *Nature Communications* [online]. 2020, **11**(1) [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-19383-8
- [19] KOČÁREK, Eduard. *Biologie člověka*. Praha: Scientia, 2010. ISBN 978-80-86960-47-0.
- [20] MACHOVÁ, Jitka. *Biologie člověka pro specialní pedagogy*. 1. Statní pedagogické nakladatelství Praha: Karolinum, 1993. ISBN 80-04-23795-9.
- [21] ZIMOCH, J., D. ZIELINSKA a K MICHALAK-MICKA. Bio-engineering a prevascularized human tri-layered skin substitute containing a hypodermis. *Acta Biomaterialia* [online]. 2021, **134**, 215-227 [cit. 2022-04-09]. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.07.033>

- [22] GRICE, E.A. a J.A. SEGRE. The skin microbiome. *Nature reviews Microbiology* [online]. 2011, **9**(4), 244–253 [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2537
- [23] HONG, Zhou, Shi LINLIN a Ren YUANYUAN. Applications of Human Skin Microbiota in the Cutaneous Disorders for Ecology-Based Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2020, **10** [cit. 2022-04-10]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.570261
- [24] DE PESSEMIER, B., L. GRINE, M. DEBAERE a A. MAES. Gut–Skin Axis: Current Knowledge of the Interrelationship between Microbial Dysbiosis and Skin Conditions. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(2), 353 [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9020353
- [25] BUSTAMANTE, M., B. OOMAH a W.P. OLIVEIRA. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia microbiologica* [online]. 2020, **65**(2), 245-264 [cit. 2022-04-16]. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-019-00759-3
- [26] ABRAMOVITS, William. Definition of cosmetology, cosmetics, and other pertinent terms. *Clinics in Dermatology* [online]. 1988, **6**(3), 5-8 [cit. 2022-05-16]. ISSN 0738-081X. Dostupné z: doi:10.1016/0738-081X(88)90025-9
- [27] COTTERILL, J. Cosmetology. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2014, **2**, 101-101 [cit. 2022-05-16]. Dostupné z: doi:10.1111/j.1473-2130.2004.00021.x
- [28] JO HUANG, Mei-Chiung a Jane TANG. Probiotics in personal care products. *Microbiol Discovery* [online]. 2015, **3**(5) [cit. 2022-05-16]. ISSN 2052-6180. Dostupné z: doi:10.7243/2052-6180-3-5
- [29] OUWEHAND, A., A. BÅTSMAN a S. SALMINEN. Probiotics for the skin: a new area of potential application?. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2003, **36**, 327-331 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01319.x
- [30] *Методы идентификации бактерий* [online]. ФГБОУ ВО Амурская Государственная Медицинская Академия, кафедра микробиологии и вирусологии, 2018 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: https://www.amursma.ru/upload/iblock/433/Methody_identifikacii_bakterij._Metodicheskoe_posobie_dlya_samopodgotovki_studentov.pdf. Metodický příspěvek. Vedoucí práce Г. И. Чубенко.
- [31] TEMMERMAN, Robin, Geert HUYS a Jean SWINGS. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2004, **15**(7-8), 348-359 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2003.12.007
- [32] PATEL, Ami, Jashbhai PRAJAPATI a Baboo NAIR. Methods for isolation

- characterization and Identification of probiotic bacteria to be used in functional foods. *International Journal of Fermented Foods* [online]. 2012, **1**(1), 1-14 [cit. 2023-04-11]. ISSN 23193549.
- [33] QINYUAN, Li, Chen XIU, Jiang YI a Jiang CHENGLIN. *Actinobacteria: Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria* [online]. IntechOpen: Dharumadurai, 2016 [cit. 2023-04-11]. ISBN 978-953-51-2248-7. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/49273>
- [34] FRANCO-DUARTE, R, L ČERNÁKOVÁ, S KADAM a KS KAUSHIK. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms* [online]. 2019, **7**(5) [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7050130
- [35] KUMAR, R., S. GROVER a V.K. BATISH. Molecular Identification and Typing of Putative Probiotic Indigenous *Lactobacillus plantarum* Strain Lp91 of Human Origin by Specific Primed-PCR Assays. *Probiotics & Antimicro.* [online]. 2011, **3**, 186–193 [cit. 2023-05-12]. Dostupné z: doi:10.1007/s12602-011-9083-6
- [36] GARIBYAN, L a N AVASHIA. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol* [online]. 2013, **133**(3), 1-4 [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.1
- [37] The polymerase chain reaction: An overview and development of diagnostic PCR protocols at the LCDC. *Can J Infect Dis* [online]. National Laboratory of Enteric Pathogens, Bureau of Microbiology, Laboratory Centre for Disease Control, 1991, **2**(2), 89-91 [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: doi:10.1155/1991/580478
- [38] Polymerase Chain Reaction (PCR) - An Introduction. In: *Applied Biological Materials* [online]. [cit. 2023-04-17].
- [39] KADRI, Karim. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications* [online]. IntechOpen. 2019 [cit. 2023-04-17]. ISBN 978-1-78984-090-2. Dostupné z: 10.5772/intechopen.77541
- [40] Polymerase Chain Reaction (PCR) - An Introduction. In: *Abmgood* [online]. Applied Biological Materials Inc. [cit. 2023-04-17].
- [41] WONG, Marisa a Juan MEDRANO. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* [online]. 2005, **39**(1), 75-85 [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: doi:10.2144/05391RV01
- [42] TAJADINI, M, M PANJEHPOUR a SH JAVANMARD. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res* [online]. 2014, **3**(85) [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: doi:10.4103/2277-9175.127998

- [43] MACKAY ANDREAS NITSCHKE, Ian, Katherine ARDEN a Andreas NITSCHKE. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* [online]. 2002, **30**(6), 1292–1305 [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: doi:10.1093/nar/30.6.1292
- [44] MANSOOR, Sheikh, Sheikh MANSOOR, Rasy CHOH WANI a Nighat NISSA. *Agarose gel electrophoresis* [online]. [cit. 2023-04-23]. ISBN 9780443191749.
- [45] PY, Lee, J COSTUMBRADO, CY HSU a YH KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, **62**(3923) [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: doi:10.3791/3923
- [46] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. : il. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [47] HAARMAN, M. a J. KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *American Society for Microbiology* [online]. 2006, **72**(4), 2359-2365 [cit. 2022-05-14]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006
- [48] GHOTBI, M.S., SOLEIMANIAN-ZAD a M. SHEIKH-ZEINODDIN. Identification of Lactobacillus pentosus, Lactobacillus paraplantarum and Lactobacillus plantarum in Lighvan cheese with 4 month ripening period by means of recA gene sequence analysis. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2011, **10**(10), 1902-1906 [cit. 2022-05-14]. ISSN 16845315.
- [49] VILJOEN, Christopher, Chantéle BOOYSEN a Sandhya SREENISVASAN TANTUAN. The suitability of using spectrophotometry to determine the concentration and purity of DNA extracted from processed food matrices. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2022, **112** [cit. 2023-04-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2022.104689
- [MATLOCK, Brian. Assessment of Nucleic Acid Purity. In: *ThermoFisher Scientific* 5 [online]. Wilmington, USA, 2015 [cit. 2023-04-29]. Dostupné z: 0 https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-] 0215M-NucleicAcid.pdf

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRÁTEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
bp	Base pair (počet bází)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GIT	Gastrointestinální trakt
MO	Mikroorganismy
PCR	Polymerázová řetězová reakce
rRNA	Ribosomální Ribonukleová kyselina