

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ  
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**BRNO 2014**

**ROBERT KADLEC**

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav výživy zvířat a pícninářství**

---



**Ovlivnění adherence probiotik**  
Disertační práce

*Vedoucí práce:*  
prof. MVDr. Ing. Petr Doležal, CSc.

*Vypracoval:*  
MSc Robert Kadlec

---

Brno 2014

---

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Ovlivnění adherence probiotik vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne: 1.3.2014

.....  
podpis

**Poděkování:**

Zpracovaná disertační práce byla finančně podpořena z prostředků grantu MZe QI91B274 a QJ1310258. Rád bych též poděkoval prof. MVDr. Ing. Petru Doležalovi, CSc. a prof. Ing. Ladislavu Zemanovi, CSc za odbornou pomoc a trpělivost a mým spolupracovníkům, manželce Petře a mamince za velkou podporu.



## Obsah

Seznam zkratk	7
Abstrakt	8
1 Úvod	10
2 Cíle práce	12
3 Literární přehled	13
3.1 Probiotika	13
3.2 Prebiotika	20
3.2.1 Inulin	21
3.2.2 Trans-galaktooligosacharidy (TOS)	23
3.3 Biofilm	23
3.4 Adheze mikroorganismů	27
3.4.1 Fyzikální popis adheze	27
3.4.2 Biologický popis adheze	29
3.4.3 Modely pro studium bakteriální adheze k povrchu stěny tlustého střeva	31
4 Materiál a metodika	37
4.1 Flotace a její použití pro oddělení adherovaných a planktonických bakterií	37
4.2 Vliv prebiotik na adhezi probiotických bakterií	40
4.3 Vliv biofilmového fenotypu bakteriálního kmene <i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 4833 na jeho probiotické vlastnosti	43
5 Výsledky a vyhodnocení	47
5.1 Vliv prebiotik na adhezi probiotik	47
5.2 Vliv biofilmového fenotypu na probiotické vlastnosti	53
5.3 Flotace a její použití pro oddělení adherovaných a planktonických bakterií	59
6 Diskuze	66
7 Závěr	73
8 Reference	755
9 Přílohy	83



## Seznam zkratek

CbsA - kolagen vázající S-vrstva

CFU - *colony forming unit*

ECM – *extracelular matrix*

EFSA - *European Food Safety Authority*

EPS – extracelulární polymerní substance

FA – *flotation agents* – flotační činidlo

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FBP - *fibronectin binding protein*

FOS - *fructo-oligosaccharides*

GOS - galactooligosacharid

K- - planktonická forma kmene 10B *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833

K+ - biofilmová forma kmene 10B *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833

MSCRAMM - *microbial surface components recognizing matrix biomolecules*

PBS – *phosphate buffer saline*- fosfátový pufr

TK – tkáňová kultura

TOS – *transgalactooligosaccharide*

WHO - *World health organization*

# Ovlivnění adherence probiotik

## Abstrakt

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují fyziologické funkce hostitele. Ve výživě nepřežvýkavých živočichů se jedná především o symbiózu v oblasti tlustého střeva, kde mají probiotika nutriční úlohu při štěpení potravy a též zabraňují růstu a uchycení patogenů. Jeden z podstatných rysů probiotik je schopnost adheze na střevní stěnu. Tato vlastnost je důležitá nejen pro vlastní kolonizaci střevní sliznice probiotickými bakteriemi, pro jejich dlouhodobé přežívání, ale i pro obsazení volných míst na povrchu střevního epitelu, která by kolonizována patogenními mikroorganismy.

V práci byl zaměřen důraz na inovaci metodiky výzkumu adheze mikroorganismů, pomocí které by bylo možné identifikovat adherentní vlastnosti u velkého množství vzorků a posoudit vliv prebiotik a vliv kultivace ve formě biofilmu. Byla také představena nová metoda flotace pro odstranění neadherovaných mikroorganismů, která snižuje laboratorní náročnost experimentů a dále byl zhodnocen vliv prebiotik a vliv fenotypové formy biofilmu na probiotické vlastnosti se zvláštním důrazem na adhezi na epitel střevní stěny.

Bylo prokázáno, že pozitivní ovlivnění účinku probiotik lze docílit nejen vhodným výběrem kmenů, ale i způsobem kultivace a použitím vhodných prebiotik. Naopak, většina z otestovaných, komerčně dostupných prebiotik schopnost adheze snižují. Výsledky získané v této práci mají širší platnost i dopad a dají se využít všeobecně při výzkumu adherence mikroorganismů a při výzkumu biofilmů.

V textu jsou průběžně vloženy publikované i doposud nepublikované články autora vzniklé na základě této práce a představují tak základní osnovu, která je dále rozvíjí.

**Klíčová slova:** probiotika, prebiotika, biofilm, adherence

# **Influence of adhesion of probiotics**

## **Abstract**

Probiotics are live microorganisms that beneficially affect the host's physiological function. In the nutrition of monogastric animals is it mainly symbiosis in the colon, where probiotics have nutrition role in the digestion of food and also prevent the growth and attachment of pathogens. One of the essential features of probiotics is the ability of adhesion to the intestinal wall. This is not only important for the colonization and retention of probiotics in the gut, but also for reduction of pathogen colonization by competitive exclusion and displacement.

The main focus was on design of new method for description of microorganisms adhesion, which would be able to identify the adherent properties of a large number of combinations of probiotics, prebiotics and cultivation conditions.

Also new method of flotation for removing of non-adherent microorganisms was introduced, which reduces the demand of laboratory work. Using of this method the influence of prebiotics and phenotypic effect of biofilms on probiotic properties with special emphasis on the adhesion of the epithelium of the intestinal wall was evaluated.

It was shown that the enhancing of the probiotics effect can be achieved not only by appropriate selection of strains, but also by the manner of cultivation and selection of prebiotics. Conversely, most of the tested commercially available prebiotic decreases ability of adhesion. The results obtained in this work have broader impact and can be used widely in research and adherence of microorganisms in the biofilm research.

In the text are inserted published and unpublished articles of the author what presents basic outline of the work, which is further developed.

Keywords: **probiotics, prebiotics, biofilm, adherence**

## 1 Úvod

Omezení volného pohybu nebo chování, což je případ u většiny chovů hospodářských zvířat, ale i u člověka žijícího podle „hygienických standardů“, může mít za následek nedostatečnou pestrost mikrobioty, která není dostatečná pro exkluzi potencionálních patogenních mikroorganismů. Byly proto učiněny pokusy uměle ovlivnit složení a funkci střevní mikrobioty vybranými mikroorganismy, které jsou podávány živé, a které začaly být nazývány probiotiky.

Jedna z často používaných definic od Fullera z roku 1989 [1] definuje probiotika jako: „živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují zdraví hostitele pomocí ovlivnění složení střevní mikroflóry. Dnes je tato definice mírně upravena Světovou zdravotnickou organizací (WHO) na „Probiotika jsou živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány probiotické rody patří *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus*. S těmito rody se pojí dlouhodobá zkušenost při zpracování mléka, výrobě kysané zeleniny a siláže, nenáročná kultivace a nepatogenost drtivé většiny kmenů.

Probiotikum je také velmi komplexně definováno dle svých vlastností. Musí být schopno projít v dostatečném stupni životaschopnosti trávicím traktem, nesmí být pro hostitele škodlivé ať už např. nadměrnou produkcí plynů nebo schopní translokace skrze střevní stěnu a v neposlední řadě musí být schopno uchytit se v dostatečném množství na střevní stěně, aby bylo schopné proliferace.

Právě schopnost adherence patří k nejméně popsaným vlastnostem probiotik. Zčásti to je vinou běžně používaného laboratorního modelu, který neodpovídá podmínkám panujícím ve střevním prostředí. Mezi běžně používané modely patří: (i) polystyren pokrytý mucinem; (ii) tkáňové kultury izolované z nádorů tlustého střeva (hlavně Caco2 nebo HT-29) a (iii) *ex vivo* explantáty tlustého střeva. Bohužel ani jeden z těchto používaných modelů plně nenahrazuje podmínky panující v gastrointestinálním traktu. Dalším problémem je také rozdílnost vlastního provedení, které se liší v použitém médiu, koncentraci, času adherence i počtu promývacích cyklů při odstranění neadherovaných mikroorganismů.

Probiotické vlastnosti mohou být posíleny použitím tzv. prebiotik, to jest sacharidů nestravitelných pro vyšší obratlovce. Tyto sacharidy se dostávají v nezměněné formě až do tlustého střeva, kde selektivně podporují růst a aktivitu

probiotických kmenů, které je jsou schopny metabolizovat. Typickým testem vhodnosti použití prebiotik je schopnost fermentace probiotiky, odolnost vůči lidským sacharolytickým enzymům a stanovení adherence probiotik na prebiotikum. K dnešnímu dni ale nebylo v dostatečné míře zjištěno, zda a jak mohou prebiotika ovlivňovat schopnost adheze probiotik na střevní sliznici. Dalším výrazný vliv na probiotické vlastnosti má vlastní fenotyp probiotického kmene bakterií. V přírodě je přes více než 90 % všech bakterií přítomno ve formě tzv. biofilmu. Tato fenotypová forma se projevuje produkcí extracelulárních polymerních substancí (EPS), které chrání mikroorganismy před negativními vlivy prostředí. Probiotika v biofilmu jsou také velmi novou myšlenkou a možnosti jejich aplikace v této formě jsou stále velmi neprozkoumané.

Hlavním cílem této práce je zjistit, do jaké míry lze ovlivnit adhezi probiotik na sliznici střeva. Jsou zde použity dva rozdílné přístupy. Prvním z nich je použití prebiotik, tedy oligo- a polysacharidů nestravitelných pro hostitele, která mohou být metabolizována použitými probiotiky. Dalším cílem je kultivace probiotik za podmínek umožňující produkci biofilmu, tedy formy, ve které se bakterie přirozeně vyskytují ve střevech.

## 2 Cíle práce

1. Standardizovat a zjednodušit metody stanovení adheze probiotických mikroorganismů.

Klasické metody stanovení adherence probiotik jsou velmi různorodé a časově i materiálově náročné. Pro splnění hlavního cíle práce: „Zjistit ovlivnění adherence probiotik“ je nutné prověřit velký počet kombinací (probiotika + prebiotika + způsoby kultivace). S příslušným opakováním se jedná o několik set dílčích pokusů.

Pro zjednodušení metodiky bylo též navrženo použití jedнокrokové metody flotace pomocí vysokohustotních roztoků, které by měla značně urychlit celý proces tím, že eliminuje potřebu opakovaně vymývat neadherované mikroorganismy a umožní stanovit počet neadherovaných, i adherovaných mikroorganismů. Metoda bude ověřena a srovnána se standardní metodikou.

2. Zjistit zda je adheze probiotik ovlivněna přítomností prebiotik.

Prebiotika jsou velmi často využívány v preparátu společně s probiotiky jako tzv. synbiotika. Standardně u těchto látek je zkoumána pouze schopnost fermentace; vliv na další probiotické vlastnosti je však zanedbáván přičemž vliv těchto látek na adheze probiotik na střevní sliznici popř. příslušný model, nebyl doposud u těchto kombinovaných preparátů popsán.

3. Stanovení adhezivních schopností probiotik kultivovaných v biofilmové formě

Dalším významným faktorem, ovlivňující adhezi je fenotyp použitého bakteriálního kmene. V přírodě a též i ve střevech je mnohem častější růst mikroorganismů v tzv. biofilmu – slizovité struktuře tvořené EPS.

Biofilm chrání bakterie před působením fyzikálních i chemických faktorů a měl by usnadnit adherenci na střevní sliznici.



## 3 Literární přehled

### 3.1 Probiotika

Výživa hospodářských zvířat je v současné době vystavena novým výzvám spočívajících v základních změnách přístupů k nutriční prevenci infekčních onemocnění doprovázejících velkovýrobní charakter jejich odchovu. Dosavadní přístup byl charakterizovaný přidáváním aditiv vykazujících různé antimikrobiální aktivity. Současná doba však ukazuje, že tento přístup k nutriční prevenci infekčních onemocnění se již vyčerpal. Svědčí o tom potřeba stálého stupňování těchto komponent, v současné době již značně přesahující únosnou mez. Vedle těchto skutečností však existují ještě další důvody (epidemiologické, ekologické aj.), které nás nutí vzdát se jejich podáváníí. Týká se to zejména krmných antibiotik, jejichž preventivní a „růstově stimulační“ podávání bylo zastaveno, nebo dosud tolerovaného preventivního podávání oxidu zinku odstaveným selatům. Uvolněný prostor na trhu a potřeba eliminovat případné střevní infekce, jimž jsou novorozená a časně odstavená mláďata v hojné míře vystavena, vede výrobce krmiv k zavádění nových výrobků, které by měly vyřazené prostředky nahradit [2; 3]. Zcela mimořádné místo mezi uvažovanými náhradami krmných aditiv s antibakteriální aktivitou zaujímají probiotika. Nejen tím, že jsou spolu s prebiotiky schopna částečně eliminovat infekce vyvolané patogenními bakteriemi, ale především tím, že, na rozdíl od přeceňovaných „růstově stimulačních“ aktivit antibiotik, skutečně pozitivně ovlivňují využití živin ve střevě svých hostitelů a tím i nepřímo jejich vývoj a růst. Při této příležitosti je nutné připomenout, že růst potencující vlastnosti krmných antibiotik, popisované před více jak půl stoletím se již dávno vyčerpaly a již před několika desetiletími se je v opakovaných pokusech nepodařilo znovu prokázat [4].

Pro pochopení role probiotik ve fyziologii vyšších obratlovců je třeba si uvědomit si několik závažných skutečností, které při běžném pohledu často unikají. Vzhledem k tomu, že interakce mikroorganismů s hostitelem byla, s výjimkou laboratorních zvířat, nejvíce studována u člověka, následující skutečnosti týkající se jeho fyziologie považujeme za relevantní i pro ostatní monogastričné vyšší obratlovice. Význam bakteriální mikroflóry střeva vynikne, uvědomíme-li si, že z  $10^{14}$  buněk, z nichž se skládá lidský organismus, pouze 10 % tvoří somatické buňky (jen  $10^{13}$ ). Zbývajících 90 % je tvořeno bakteriálními mikroorganismy. Co se metabolické aktivity týče, úhrn bakteriálního obsahu střeva převyšuje aktivitu jater [5]. Tak veliké množství

metabolicky velmi aktivní hmoty by nemělo být přehlíženo. Zatím jen tušíme, jaké funkce tento difúzně rozprostřený „orgán“ v těle svých hostitelů vykonává.

Střevní mikroflóra je neobyčejně komplexní systém tvořený více jak tisícem bakteriálních druhů, z nichž však téměř 80 % zatím nedovedeme kultivovat. Mezi nimi existuje řada vztahů, jak synergických, tak i antagonistických. Jejich výzkum a pochopení je jedním z nejzávažnějších úkolů biomedicinských věd. Mohlo by se zdát, že závažnosti právě zmíněné problematiky je snad poněkud přeceňována. Na tuto námitku lze odpovědět dalším srovnáním, které může ozřejmit skutečnosti, které často unikají běžnému pohledu na uvedenou problematiku. Je důležité si uvědomit si plošné relace, na nichž se aktivity střevní mikroflóry uskutečňují; celková plocha střevní sliznice dospělého člověka dosahuje téměř 300 m<sup>2</sup>, zatímco plocha povrchu těla dosahuje jen asi dvou čtverečních metrů. Střevní sliznice tedy tvoří významné rozhraní mezi vnějším a vnitřním prostředím každého organismu. Pro správnou funkci dějů probíhajících na tomto rozhraní hrají zásadní roli právě mikroorganismy, které jsou zde shromážděny. Jejich druhové složení a vzájemné proporce vytvářejí prostředí pro děje na této ploše uskutečňované.

Z uvedených skutečností plyne, že použití probiotik k optimalizaci střevních funkcí je příkladem moderního přístupu k výživě hospodářských zvířat, tím, že na jedné straně chrání jejich střevo před bakteriálními infekcemi, a na druhé straně se podílejí na procesech spojených s optimálním využitím živin obsažených v krmivu.

Z názvoslovného pohledu není zcela jasné, kdo a kdy tento pojem vlastně zavedl; ačkoliv jsou uváděni různí autoři; zřejmě prvním, kdo jej použil, byl německý bakteriolog Werner Kollath (1892 – 1970), když chtěl, ve srovnání s antibiotiky, zdůraznit jejich opačné působení na funkci střevní mikroflóry. Pro definici probiotik existuje několik variant. Nejčastěji je používána definice Fullerova [1], která je definuje jako živé mikrobiální doplňky potravy, které příznivě ovlivňují mikrobiální rovnováhu trávicího traktu a působí ve prospěch hostitele. Definice světových organizací FAO/WHO zdůrazňuje zejména zdravotní aspekt probiotik tím, že je definuje jako: “Živé mikroorganismy, které podány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdraví hostitele“.

## Význam probiotik

Jak již vyplývá z výše uvedených definic, probiotika napomáhají udržovat mikrobiální rovnováhu ve střevě a významně tak přispívají ke zlepšení fyziologických funkcí střevní sliznice. Mnohem širší využití však mají probiotika v podpoře trávení, stejně jako v obraně střeva proti infekci. Starší, převážně empirické, znalosti pozitivního působení bakteriálním kvašením natráveného krmiva byly v posledních letech nahrazeny cíleným přidáváním vybraných bakteriálních druhů buď přímo do krmné dávky, nebo jako konzervanty objemné píče. Jejich použití jako doplňku krmiva vychází z pochopení fyziologické funkce střevní mikroflóry, která spolu s trávicími šťávami je další složkou procesu trávení. Digestivní účinky probiotik je třeba spatřovat zejména v následujících působeních:

- snížení pH střevního obsahu (produkce kyseliny mléčné),
- produkce proteolytických a sacharolytických enzymů, zvyšujících využitelnost živin obsažených v krmivu,
- regulace střevní motility,
- pozitivní ovlivnění skladby střevní mikroflóry.

Zatímco o digestivních účincích probiotik nebylo nikdy pochyb, jejich schopnost chránit střevo před působením patogenních mikroorganismů bývá někdy zpochybňována. V současné době však již existuje dostatek důkazů o jejich účincích nejen preventivních, ale v některých případech i léčebných. Jsou založeny především na těchto aktivitách:

- přednostní kolonizaci střevní sliznice nejen mláďat, ale i zvířat vystavených náhlým změnám krmné dávky [6] a životního prostředí. Tento druh profylaktického působení probiotických mikroorganismů je spojován s jevem nazvaným jako kompetitivní exkluze, kdy jsou na povrchu sliznice volná vazebná místa obsazována žádoucími mikroorganismy (hovoříme o tak zvané receptorové blokaci). Tímto způsobem je zabraňováno v uchycení a přemnožení patogenních (zástupci rodů *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Vibrio*), potenciálně patogenních (někteří zástupci rodů *Helicobacter*, *Clostridium*, *Candida*) či oportunně patogenních mikroorganismů (zástupci rodů *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, někteří zástupci rodu *Streptococcus* či některé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*).

- tvorba kyseliny mléčné, která snižováním acidity střevního obsahu, nevytváří vhodné prostředí pro přemnožení některých patogenních mikroorganismů. Toho dosahují několika způsoby, z nichž nejvýznamnější jsou konkurenční užití stejného substrátu, snížení pH produkovanou kyselinou mléčnou a snížení koncentrace O<sub>2</sub> za současného zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub>.
- produkce látek vykazujících antibakteriální aktivity inhibující množení některých bakteriálních druhů [7]. Nejvýznamnější z nich jsou bakteriociny, mezi které řadíme například koliciny, bulgaricin, acidolin, laktocidin, acidophilin či reuterin.[8]

Výše popsané účinky probiotik (kompetitivní exkluze a úprava prostředí v zažívacím traktu) dosahují u některých mikroorganismů takové míry, že lze hovořit o přímém antagonismu vůči některým patogenům či oportunním patogenům (například proti salmonelám, vibriím, či enteropatogenním, enterotoxigenním a enteroinvazivním *E. coli*). Zatímco, role střevní mikroflóry ve vývoji novorozenců mláďat je známa již delší dobu, její neobyčejný význam v modulaci lokální slizniční imunity byl doceněn relativně nedávno.[9; 10; 11] Výzkum interakce mezi slizniční mikroflórou a jejím imunitním systémem je teprve na samém počátku. Aktivace tohoto systému bakteriemi střevní mikroflóry má nesmírný význam zejména v postpartálním období, kdy nastává důležitá etapa zrání imunitního systému sliznic. Toto období proto rozhoduje o jeho budoucí schopnosti zdolávat infekce pomocí specifických i nespecifických faktorů imunity [12]. V poslední době je rovněž věnována značná pozornost studiu protizánětlivých účinků některých probiotik (například *L. casei*, popřípadě *S. boulardii*). Jejich léčebné a preventivní účinky byly prokázány nejen u lidí při idiopatických střevních zánětech snížením produkce prozánětlivých cytokinů, ale i ve veterinární medicíně, zejména jako prevence nekrotické enteritidy drůbeže [13; 14]. Kromě toho je ještě nutné zmínit, že některé nutričně významné látky (zejména biologicky aktivní peptidy vznikající štěpením bílkovin mléka), mohou vzniknout jen za přispění metabolické aktivity určitých probiotických bakterií. Tyto látky svými účinky na oběhový či imunitní systém dalece přesahují význam ostatních nutričních faktorů. Nemalý význam má i schopnost některých bakterií střevní mikroflóry produkovat vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, pyridoxin, cyanokobalamin, niacin, kyselinu listovou a pantotenovou), vitamin K či mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které pak slouží jako substrát pro buňky tlustého střeva (kolonocyty), ovlivňují prokrvení střevní sliznice a motilitu střeva [15].

## **Oblasti vhodné pro podávání probiotik domácím zvířatům**

V oblasti výživy hospodářských zvířat a ve veterinární medicíně, probiotika se mohou uplatnit zejména ve dvou oblastech: v podpoře růstu v důsledku zlepšeného využití krmiva a v prevenci infekčních i neinfekčních poruch zažívání. Jejich preventivní účinky se projeví zejména ve stavech stresu (jako je například manipulace se zvířaty či jejich přeprava, náhlá změna v krmné dávce, prudké změny teploty, stísněné podmínky, zhoršená zoohygiena atp.) při střevních poruchách různé etiologie. Při nich, vedle již popsaného protiinfekčního působení se rovněž uplatňují i jejich protizánětlivé účinky. Zvláštní oblastí použití probiotik je jejich preventivní podávání novorozeným mláďatům. Tímto způsobem ošetřená mláďata snáze odolávají průjmovým onemocněním, často doprovázejícím první dny jejich života. V tomto směru byla nejlepší data získána u selat preventivně suplementovaných probiotiky od narození až po odstav [16; 17]. Výsledky jejich terapeutického podávání mláďatům hospodářských zvířat neprokázaly významný efekt.

## **Probiotické mikroorganismy užívané ve výživě hospodářských zvířat**

### Bakterie mléčného kvašení.

laktobacily: *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*

bifidobakterie: *B. bifidum*

enterokoky: *E. faecium*, *E. durans*

streptokoky: *S. lactis*, *S. thermophilus*, *S. diacetylactus*

### Ostatní probiotické mikroorganismy:

bacily: *B. subtilis*, *B. toyoi*

kvasinky: *Sacharomyces cerevisiae*, *Torulopsis* spp.

plísňe: *Aspergillus oryzae*

## **Úskalí spojená s použitím probiotik ve výživě hospodářských zvířat**

Příčiny selhávání očekávaného účinku probiotik jsou různé. Mezi nejčastější důvody patří:

- přeceňování schopností probiotik odolat v konkurenčním soupeření vysokému množství patogenních mikroorganismů,

- opomíjení zásadní skutečnosti, že skutečnými původci střevních infekcí nemusí být jen bakterie, ale též viry, [16] případně jiné mikroorganismy, které kompetitivně nesoupeří s probiotiky, ani o matrix, ani o povrchové receptory, nýbrž invadují přímo do enterocytů,
- nevhodná kombinace probiotických kmenů podávaných současně, které s ohledem na přirozený antagonismus některých z nich, může rušit jejich pozitivní efekty vykazované pokud jsou-li aplikovány samostatně,
- volba probiotika nevykazujícího dostatečnou míru příznivých vlastností.

## **Vlastnosti dobrých probiotik**

Aby mikroorganismus vykazující probiotické účinky mohl zaznamenat příznivý efekt v prostředí střeva hostitelského organismu, musí nejprve odolat nepříznivému prostředí žaludku a dále baktericidním účinkům žluči v duodenu [4]. Míra rezistence žaludečním a žlučovým kyselinám jsou tedy důležité vlastnosti vhodného probiotika. V ochraně střeva mohou hrát významnou roli pouze ty bakteriální kmeny, které jsou schopny ve větším rozsahu adherovat na povrch střevní sliznici a tímto způsobem její kolonizovat. Účinek probiotických bakterií, které toho nejsou schopny, je pouze přechodný, a proto jen velmi omezený. Mimo schopnosti adherovat na povrch enterocytů, vhodný probiotický kmen by rovněž měl mít krátký generační čas, a navíc by měl produkovat látky, které by inhibovaly růst konkurenční mikroflóry; samozřejmě by měly být schopny přežít a množit se v prostředí zažívacího traktu. Studium vzájemných vztahů střevní mikroflóry, a to jak synergických, tak i antagonistických, je předmětem intenzivního výzkumu [18]. V souvislosti se studiem interakcí mikrobiálních druhů a jejich společenstev na pevných površích byla odhalena existence nesmírně zajímavého jevu, později nazvaného biofilmem. Práce věnované tomuto problému ukázaly, že některé bakteriální druhy mají tendenci se samoorganizovat a vytvářet vzájemně se podporující společenstva, jejichž nezbytnou podmínkou je již zmíněná adheze na příslušné povrchy. V rámci takto vzniklého společenství se vytvářejí nejen metabolické a nutriční synergie, ale i komplikovaná komunikace prostřednictvím secernovaných látek. Vše co již bylo o biofilmech konstatováno obecně, platí i o specializovaných biofilmech vznikajících na povrchu střevní sliznice. Dosavadní, jen velmi dílčí poznatky o struktuře a funkci biofilmu dovolují pochopit smysl dříve uvedených skutečností, týkajících se požadavků na vhodný probiotický kmen.

Výše uvedené skutečnosti dokládají, že nedávný zákaz podávání antibiotik, případně jiných antibakteriálních aditiv, k prevenci nebo jako „růstových stimulátorů“, může být plně kompenzován použitím probiotik [4]. Jejich použití kromě toho však přináší další pozitivní efekty spojené s fyziologií trávení a vyšším využitím krmiva. Vzhledem k tomu, že pozornost zaměřená na fyziologickou a obrannou roli střevní mikroflóry a její modulaci prostřednictvím cíleného podávání probiotik nemá zatím dlouhé trvání, lze očekávat, že intenzivní výzkum v této oblasti teprve v budoucnu přinese řadu nových, zásadních poznatků.

### 3.2 Prebiotika

Prospěšné vlastnosti probiotik mohou být posíleny použitím tzv. prebiotik. Jedná se polysacharidy, které jsou přijímány současně s probiotiky, ale nejsou štěpitelné trávicími enzymy hostitelem. Beze změny tedy projdou trávicím systémem až do tlustého střeva, kde mohou sloužit jako selektivní zdroj živin pro probiotické kmeny bakterií, které jsou schopny je metabolizovat. Původní definice z roku 1995 od Gibsona a Roberfroida [18] popisuje prebiotika jako: „nestravitelné potravní ingredience, které příznivě ovlivňují hostitele prostřednictvím selektivní stimulace růstu a/nebo aktivity určitých bakterií v tlustém střevě.“ Tato definice byla později v roce 2004 upravena na: „prebiotika jsou selektivně fermentované ingredience, které umožňují specifické změny ve složení a/nebo aktivitě střevní mikroflóry, což má příznivý vliv na hostitelovo prospívání a zdravotní stav.“

V roce 2007 Marcel Roberfroid [19] formuloval tři kritéria, která musí splňovat prebiotické substance: (i) rezistence vůči žaludečním kyselinám; (ii) fermentovatelnost střevními bakteriemi; (iii) selektivní stimulace růstu a/nebo aktivity střevních bakterií, které mají příznivý vliv na hostitelův zdravotní stav. Tyto vlastnosti mají pouze některé nestravitelné oligosacharidy různého původu.

Rezistence vůči žaludečním kyselinám nezbytně neznamená absolutní nestravitelnost hostitelem, ale mělo by být zajištěno, že do tlustého střeva se prebiotikum dostane v dostatečném množství. Fermentace střevními bakterie je možno prokázat velmi jednoduchým testem, avšak schopnost selektivní stimulace růstu probiotik je nejhůře prokazatelnou vlastností prebiotik. Pouhé pozorování fermentace čistými kulturami nebo nárůst jednoho druhu ve směsi omezeného počtu druhů *in vitro* nemůže být považován za bezpečně prokázaný důkaz selektivní stimulace. Pro něj je nutno uskutečnit testy *in vivo* s anaerobním vzorkováním trusu a následnou kvantitativní analýzou celého bakteriomu a jeho změn. Molekulární metody mohou tuto analýzu velmi zjednodušit a zpřesnit.

Prvním zdrojem prebiotik se kterým přichází člověk do styku je mateřské mléko, které obsahuje velké množství nestravitelných oligosacharidů (až 15 g v jednom litru mléka). Tyto oligosacharidy mají velmi složitou strukturu (dodnes jich bylo popsáno 130) a jejich umělá příprava je v současné době nemožná. Funkce těchto prebiotik na lidské tělo je velmi rozmanitá. Kromě vlastní prebiotické funkce kde selektivně podporují rozvoj bifidobacterií ve střevě kojenců mají pozitivní vliv na rozvoj nervové



soustavy, vstřebávání vápníku a negativně působí na adherence patogenních bakterií na střevní stěnu.

Nicméně prakticky používané prebiotické kmeny jsou mnohem jednodušší a patří k nim fruktooligosacharidy (FOS) nebo galaktooligosacharidy (GOS). FOS bývají často připravovány částečným enzymatickým štěpením inulinu. Naproti tomu je GOS připraven z laktózy pomocí glykosylační aktivity  $\beta$ -galaktosidázy. Při přípravě GOS velmi záleží také na původu použitého enzymu [20]. Nejlepší výsledky byly pozorovány s použitím  $\beta$ -galaktosidázy bakterie *Bifidobacterium bifidum*.

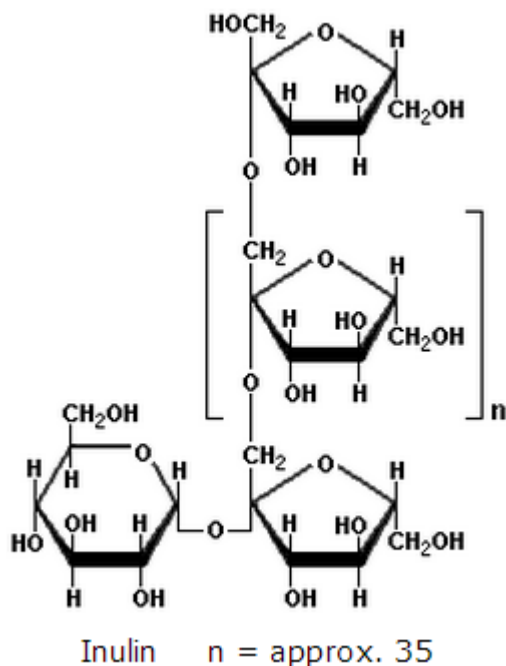
Kromě oligosacharidů mohou mít prebiotické účinky také polysacharidy jako je například rezistentní škrob nebo bílkoviny a peptidy, např. laktoferin. Nicméně ani u jedné z obou zmíněných látek nebyly prokázány ještě všechny vlastnosti prebiotik [19].

Kombinace prebiotik a probiotik je označována jako synbiotika. Od tohoto produktu se očekává synergistický účinek obou zmíněných složek.

### 3.2.1 Inulin

#### Chemická struktura inulinu

Z chemického hlediska je lineární řetězec inulinu možno popsat jako  $\alpha$ -D-glykopyranosyl- $[\beta$ -D-fruktofuranosyl] $_{n-1}$ - $\beta$ -D-fruktofuranoside ( $G_{py}F_n$ ) nebo  $\beta$ -D-fruktopyransyl- $[\beta$ -D-fruktofuranosid] ( $F_{py}F_n$ ) [19]. Vazba mezi fruktosylem a glukózou je vždy  $\beta$  ( $2 \leftrightarrow 1$ ) stejně jako u sacharózy. Naproti tomu jsou vazby u fruktosyl-fruktózy  $\beta$  ( $1 \leftrightarrow 2$ ). Polymerizace inulinu je velmi variabilní, např. inulin čekanky obecné je směs oligosacharidů a polymerizace se pohybuje od 2 do přibližně 60 jednotek s průměrem okolo 12 jednotek. Pro přípravu prebiotika je inulin parciálně hydrolyzován endoinulázou (EC 3.2.1.7) a vzniká oligofruktóza, která je tvořena směsí obou  $G_{py}F_n$  a  $F_{py}F_n$  jejich polymerační číslo se pohybuje od 2 do 7. Oligofruktóza může být připravena také pomocí enzymatické syntézy, transfruktosylace, pomocí houbového enzymu  $\beta$ -fruktosidázy (EC 3.2.1.7) z plísně *Aspergillus niger*. Produkt se liší délkou řetězce s polymeračním číslem od 2 do 4 a všechny oligomery jsou typu  $G_{py}F_n$ .



**Obrázek č. 1:** Jedna z možných struktur inulinu.

Pomocí specifických separačních technik je možné izolovat také dlouhé řetězce inulinu označované jako inulin HP (polymerační číslo mezi 10 do 60). Směs těchto dlouhých řetězců s oligofruktózou je označovaná jako Oligofruktose Synergy. Všechny výše zmíněné produkty se mezi výrobci mohou lišit stupněm polymerace a mohou proto mít i odlišné vlastnosti [21]. Inulinem jsou obecně označovány všechny výše zmíněné produkty. Při srovnávání produktů lišících se stupněm polymerace, název inulin označuje produkty s delším řetězcem, zatímco oligofruktóza označuje hydrolyzační produktu štěpení inulinu i syntetické produkty, i když mají lehce rozdílný polymerační stupeň (4 a 3,6). Synonymum pro pojem oligofruktóza je fruktooligosacharid, který také označuje směs oligomerů inulinu s polymeračním stupněm nižším než 10.

### Prebiotické vlastnosti inulinu

Ohledně stravitelnosti je inulin velmi intenzivně prostudovanou sloučeninou širokou paletou *in vitro* i *in vivo* testů [22]. Inulin je absolutně nestravitelný oligosacharid, který je z hlediska nutričního značení, klasifikován jako rozpustná vláknina.

*In vitro* testy prováděné na čistých kulturách nebo na vzorcích lidské stolice ukazují na schopnost fermentace inulinu střevními bakteriemi [23]. Tyto poznatky jsou

potvrzeny i *in vivo* zvířecích modelech, kde se jasně projevil bifidogenní efekt fruktanů inulinového typu [24; 25; 26]. Souhrnné důkazy *in vitro* i *in vivo* testů jasně prokazují prebiotické vlastnosti fruktanů inulinového typu.

### 3.2.2 Trans-galaktooligosacharidy (TOS)

#### Chemická struktura TOS

TOS je směs oligosacharidů vzniklá enzymatickou transglykosylací laktózy [27]. Výsledný produkt je velmi závislý na typu použitého enzymu a použitých reakčních podmínkách. Všeobecně se jedná o oligosacharidy s třemi až pěti jednotkami a vazbami typu  $\beta$  (1→6),  $\beta$  (1→3) a  $\beta$  (1→4).

#### Probiotické vlastnosti TOS

TOS nesplňují stoprocentně kritéria nestravitelnosti, ale existuje předpoklad, že významné množství TOS se dostává do střeva nerozštěpena. I když je TOS velmi dobře fermentované všemi otestovanými bifidobakteriemi, laktobacily i enterokoky nebyl zatím předložen důkaz o jejich selektivní stimulaci růstu probiotik [28].

Nicméně velké množství *in vivo* testů uskutečněných na gnotobiotických myších [28] i na dospělých [29; 30] a dětských dobrovolnících [31; 32], dokázalo signifikantní vzestup bifidobakterií a laktobacilů. Velké množství klinických testů a jejich pozitivních výsledky proto umožňují zařadit TOS mezi prebiotika.

## 3.3 Biofilm

### Biofilm a jeho struktura

Jedna z nejstarších definic od Costerton *et al.* [33] popisuje biofilm jako: „strukturalizovanou komunitu bakteriálních buněk v ochranném polymerním matrixu produkovaném vlastními buňkami, které jsou adherované na inertním nebo živém povrchu.“ Hlavními složkami biofilmu je tedy: mikrob, povrch a EPS. U planktonických biofilmů může být povrch tvořen buňkami samotných bakterií nebo může jít třeba o rozhraní kapalina - vzduch.

Biofilm je tedy strukturované společenství mikroorganismů, uložené v EPS [33]. Tato matrice funguje jako ochranný obal, který umožňuje přežívání bakterií v biofilmu i za nepříznivých podmínek. Byla pozorována také zvýšená odolnost vůči antibiotikům, chemickým desinfekčním prostředkům a dalším fyzikálním vlivům jakými jsou

například vysychání nebo UV záření [34]. Biofilmy jsou přisedlé k inertním nebo i živým povrchům ponořeným ve vodném prostředí nebo alespoň s dostatečným přísunem vlhkosti. Tvoří rozmanité makroskopické útvary, které jsou charakterizovány genetickou diverzitou a schopností komunikace mezi jejími členy. V důsledku blízkosti jednotlivých buněk je umožněna intenzivní interakce jednotlivých členů biofilmu a formování synergistických mikrokonsorcií [35]. Mimoto, EPS matrix funguje jako určitá forma extracelulárního trávicího systému. V přirozeném prostředí jsou biofilmy mnohohoduhové, což vyžaduje určitou míru symbiózy a komunikace. Biofilmy představují vyšší a složitější způsob života mikrobů a jsou analogií tkání vyšších organismů a mohou proto být považovány jako jednu z možných vývojových forem mnohobuněčných organismů.

Nejen bakterie, ale téměř každý druh mikroorganismů jako jsou archea, protozoa nebo řasy, mají schopnost adheze a tvorby biofilmu. Biofilmy jsou všudypřítomné; je možné je nalézt na poušti i na ledovcích. Biofilmy osidlují půdu; lze je objevit i na tak kuriózních místech jako je palivové systémy letadel nebo horké, podmořské prameny. Bakterie jsou schopny uvolňovat se z již zformovaných biofilmů a opět kolonizovat další povrchy.

### **Složky EPS**

Nejčastější složkou biofilmu jsou exopolysacharidy [36]. Právě exopolysacharidy jsou odpovědné za vlastní slizovitý vzhled; hrají hlavní roli v obraně před nepříznivými fyzikálními vlivy okolí. Většina exopolysacharidů jsou dlouhé lineární nebo větvené molekuly s velikostí pohybující se od  $0,5 \cdot 10^6$  do  $2 \cdot 10^6$  daltonů. Bylo také pozorováno, že některé polysacharidy EPS matrix slouží pro přichycení k substrátu a jsou součástí kotvící sítě držící biofilm pevně adherovaný k jeho povrchu. Z chemického hlediska jsou některé exopolysacharidy homogenní [37], ale většina je složena se směsí různých cukerných jednotek [38]. Rozdílná struktura znamená i odlišnou elektrostatickou charakteristiku jednotlivých polysacharidů, která je dále ovlivněna přítomností různorodých anorganických a organických substituentů. Až teprve sloučeniny jakými jsou např. močové kyseliny, alginát nebo glukonová kyselina dávají exopolysacharidů polyaniontovou charakteristiku. Příkladem polykationtu je intracelulární adhezín chemicky:  $\beta$ -1,6 N-acetylglukosamin, která podmiňuje některé patogenní vlastnosti kmenů *S. aureus* a *S. epidermidis* [39].

Další výraznou složkou jsou extracelulární proteiny [40] a to zejména trávicí enzymy spojené s degradací biopolymerů. Jak již bylo zmíněno výše, vysoká koncentrace enzymu v matrix vytváří extracelulární trávicí systém, který zajišťuje rozklad biopolymerů na jednotlivé snadno metabolizovatelné podjednotky [35]. Během maturace biofilmu a postupného uvolňování jednotlivých oblastí biofilmu mohou být exprimovány i enzymy štěpící jednotlivé složky vlastní matrix.

Neméně důležitou složku EPS matrix tvoří i extracelulární DNA, které u některých druhů (např. *Staphylococcus aureus*) tvoří velmi výraznou složku biofilmu a překvapivě slouží jako lešení pro další stavební jednotky EPS matrix [36], a rovněž hraje výraznou roli v horizontálním přenosu genů mezi jednotlivými členy biofilmové kolonie [41].

Vztah biofilmu k zevnímu vodnímu prostředí je optimalizován vzájemnou interakcí surfaktantů a lipidů. Lipidy, běžně se vyskytující v biofilmové matrix, jsou jednou z aktivních složek přispívajících k adhezi na hydrofobní povrchy. Naopak surfaktanty v biofilmu slouží k usnadnění látkové výměny pomocí snížení povrchového napětí rozhraní vody a vzduchu [42].

### **Biofilm a zdraví**

Velká část fyziologických i patogenních bakterií v lidském nebo zvířecím těle se vyskytuje ve formě biofilmu. Patogenní mikroorganismy ve formě biofilmu hrají významnou roli v řetězci infekčního procesu, zvláště u chronických onemocnění [34]. Odhaduje se, že až 80 % všech infekcí je spojeno s patogeny tvořící biofilm.

Pokud pomineme pokus Antona van Leeuwenhoeka, který vlastnoručně vyrobeným mikroskopem pozoroval v roce 1676 bakterie v biofilmu seškrábnutý ze zubů, biofilm byl v medicíně hlavně spojován s kolonizací implantátů. Biofilm se může vytvořit na povrchu téměř jakéhokoliv umělého povrchu implantovaného do těla anebo přicházejícího do styku s tělem. Příkladem může být povrch močových i intravenózních katetrů, umělých chlopní, implantátů nebo kontaktních čoček. Přítomnost biofilmu způsobuje zubní kaz, umožňuje vznik chronických močových infekcí, katetrových sepsí, endokarditid, rejekcí implantátů atd. Vlivem biofilmů se prodlužuje čas k hojení ran a velmi často dochází k perzistujícím infekcím.

U zvířat se biofilmy podílejí například na chronické pneumonii prasat, nebo skotu, způsobují i aspergilózu drůbeže. Dalším onemocněním, v němž biofilm hraje nezanedbatelnou roli, jsou infekční záněty mléčné žlázy skotu – mastitidy, které jsou

jedním z největších problémů moderních chovů skotu. Zvláště opakující se infekce a rezistence infekcí na antibiotika způsobují nemalé ztráty chovatelům. Ekonomické ztráty v důsledku mastitid skotu je jen v USA odhadována na 1,8 miliardy dolarů. To je zhruba 10 % celkové hodnoty prodaného mléka a zhruba dvě třetiny této ztráty připadá na sníženou produkci mléka u subklinicky infikovaných krav. Biofilmy se též významně podílejí na chorobách kulturních plodin. Ve zpracovatelském a potravinářském průmyslu biofilmy hrají důležitou roli např. v kontaminaci masa, mléčných produktů, vajec a technologického zařízení. Patogeny, jako jsou *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Salmonella* apod. též mohou tvořit biofilm, který je odolný vůči obvyklým metodám mytí a sanitace. Biofilmy mohou zvyšovat korozi potrubí, měnit hydrodynamické vlastnosti toku a dokonce mohou způsobit i úplné mechanické ucpání. Vzhledem k minimální náročnosti biofilmů na živiny a jejich zvýšené odolnosti vůči běžným dezinfekčním prostředkům mohou být biofilmy neustálou hrozbou kontaminace a infekce. Biofilm se tvoří na tepelných výměnících v mlékárnách, kde bakterie mohou adherovat přímo na povrch výměníku [43]. Díky stálému přísunu živin a velké odolnosti na čisticí proces se biofilm v těchto systémech pomnoží a mohou infikovat další součásti systému.

### **Fyziologický biofilm**

Mikroorganismy, se podstatnou měrou podílejí na trávení přijaté potravy v trávicím traktu většiny živočichů. V batoru přežvýkavců vytvářejí mikroorganismy populaci tvořící biofilm asociovanou s pevnými částicemi potravy, populaci asociovanou s gastrointestinální tekutinou anebo populaci adherovanou na povrch sliznic. Adheze těchto bakterií probíhá formou velmi specifické asociace. Dle všeobecného principu mikrobiální ekologie se každý organismus snaží umístit do nejpříznivějšího prostředí z hlediska výživy a okolních podmínek a rozmnožovat se uvnitř fyziologicky integrované komunity. Pozorování růstu bakterií asociovaných s částicemi potravy ukazuje, že každý druh adheruje k vlastnímu nerozpustnému substrátu, např. celulóza, protein, škrob a produkuje enzymy, které jsou schopny degradovat nerozpustný substrát na rozpustné nutriety. Protože většina trávicích procesů zahrnuje koordinaci fyziologicky souvisejících aktivit, často vidíme rozvoj strukturovaného společenství, kde metabolické produkty primárně trávicích organismů se stávají substrátem dalších členů vrstevnatého biofilmu [44].

Všeobecně, přítomnost dobře adoptovaných mikrobiálních biofilmů na povrchu tkání je benefitem v tom, že tyto buňky vedle fyziologické spolupráce zamezují adhezi patogenních bakterií, případně některých virů.

Jak bylo uvedeno, schopnost tvořit biofilm u mikroorganismů představuje jeden z důležitých faktorů patogenity. V případě symbiotních bakterií může tedy být schopnost tvořit biofilm benefitem, na druhé straně u patogenních mikroorganismů může zvyšovat riziko virulence. Je na dalším zkoumání, aby tyto interakce byly lépe popsány.

### **3.4 Adheze mikroorganismů**

Základním krokem pro úspěšnou kolonizaci povrchů bakteriemi a případnou tvorbu biofilmu je schopnost adherence planktonických bakterií na povrch substrátu. Po adherenci je nutné, aby se mikrob dokázal udržet dostatečně dlouhou dobu, po které začne produkovat biologickou složky nutné pro dlouhodobé udržení. Adherence je rozdělena na tzv. primární a sekundární. Primární adherence je z větší části podmíněna fyzikálními vlastnostmi bakterie a je vratná – bakterie se může vrátit do planktonického stavu [45]. Sekundární adherence je již biologický proces, v adheze se stává nevratnou [46].

#### **3.4.1 Fyzikální popis adheze**

K primární adhezi dochází poté, co se bakterie dostává do kritické vzdálenosti od substrátu, to je typicky méně než 1  $\mu\text{m}$  [47]. Do této vzdálenosti se bakterie dostává buď náhodně, jako například proudem kapaliny nebo cíleně vlastním pohybem. Po dosažení kritické vzdálenosti je výsledek primární adheze založen na součtu fyzikálních sil působících mezi bakterií a substrátem. Mezi tyto síly patří hydrofobní interakce, elektrostatické interakce, sterické síly, van der Waalsovy síly a hydrodynamické síly. Právě hydrofobní síly a elektrostatické interakce mají největší vliv na výsledek primární adheze [48]. Přičemž elektrostatické interakce vedou spíše k odpuzování, protože naprostá většina bakterií i povrchů je záporně nabitá.

#### **DVLO teorie**

Pro popis adheze bakterie může být využit již známý model chování koloidních částic v roztoku tzv. DVLO teorie (podle tvůrců: Derjaguin, Landau, Verwey,

Overbeek) [49]. Pomocí klasické DVLO teorie je možné vypočítat sumu Lifshitz-van der Waalových a Coulombických elektrostatických interakcí. Lifshitz-van der Waalovi síly působí mezi makroskopickými objekty (bakteriemi) na velmi malé vzdálenosti a jsou vždy přitažlivé. Zatímco Coulombické interakce mohou působit i na větší vzdálenosti ať již pozitivně nebo negativně.

Tato základní teorie byla rozšířena zahrnutím interakcí kyselin a bází a zahrnutím výpočtu přesunu elektronu [50]. Tato rozšířená teorie lépe odpovídá fyziologickému prostředí, protože zahrnuje vzájemnou interakci nábojů bakterie a substrátu. Výpočet adheze mikrobů tady může vypadat následovně:

$$G_{\text{celková}} = G_{\text{LW}} + G_{\text{EL}} + G_{\text{AB}} \quad (1)$$

kde:

$G_{\text{celková}}$  = celková energie adheze

$G_{\text{LW}}$  = van der Waalova energie

$G_{\text{ES}}$  = energie elektrostatických interakcí

$G_{\text{AB}}$  = acidobazická interakce

Výpočet je závislý na geometrickém tvaru interagující částice (bakterie bývá zjednodušena na kouli) a molekulární vlastnosti adherující částice vyjádřené Hamakarovou konstantou. Tuto konstantu je možné pro živé bakterie pouze odhadnout pomocí mikroskopického nebo makroskopického přístupu. První přístup – mikroskopický zanedbává velikost bakterií a počítá s nimi na podobném principu jako by se choval pár atomů. Druhý makroskopický přístup počítá s částicemi i substrátem jako s rozdílnými kontinuálními fázemi [50; 51]. Tyto dva přístupy umožňují vypočítat míru adherence mezi zkoumaným mikroblem a substrátem.

### Termodynamický přístup

Daleko přesnější výpočet energie adheze je možný pomocí tzv. termodynamického přístupu. Tento systém je založen na výpočtu volné energie bakterie a substrátu – pokud je výsledná energie negativní, je energetický stav bakterie-substrát výhodnější a dochází k adhezi.

$$\Delta G_{\text{adh}} = \gamma_{\text{bs}} - \gamma_{\text{bl}} - \gamma_{\text{sl}} \quad (2)$$

kde  $G_{\text{adh}}$  je změna Gibbsovy volné energie při adhezi částice a  $\gamma$  představuje mezifázovou volnou energii mezi bakterií-substrátem ( $\gamma_{\text{bs}}$ ), bakterií- kapalinou ( $\gamma_{\text{bl}}$ ) a substrátem- kapalinou ( $\gamma_{\text{sl}}$ ).



Výpočet volné energie může být proveden z měřeného kontaktního úhlu kapky destilované vody na substrátu a na substrátu s vrstvou zkoumaných bakterií [52]. Pomocí takto změřených mezifázových energií lze podle rovnice (2) vypočítat uvolněnou energii během bakteriální adheze. Nevýhodou této teorie je ale absolutní zanedbání elektrostatických interakcí mezi bakteriemi a substrátem nebo mezi bakteriemi navzájem [53].

### **Hydrofobicita mikroorganismů**

Hydrofobicita bakterie a substrátu velmi výrazně ovlivňuje výsledný efekt adherence. Proto byla vyvinuta celá paleta metod zkoumajících tento jev, příkladem jsou test bakteriální adheze na uhlovodíky, hydrofobní chromatografie, test agregace se siřičitanem amonným a test rozpustnosti v organických rozpouštědlech. Bohužel, naprostá většina těchto metod je nepřesná a velice špatně reprodukovatelná. Mohou proto sloužit pouze k hrubému odlišení hydrofobních a hydrofilních bakteriálních kmenů [54].

### **Faktory ovlivňující adhezi**

Jak již bylo řečeno výše, jednou z nejsilnějších sil působících při adhezi jsou elektrostatické interakce. Proto všechny jevy ovlivňující náboj povrchů, nebo bakteriálních částic, působí velmi výrazně na výslednou adhezi. Patří mezi ně zejména změna pH, koncentrace nabitých iontů vzorku a pod.

#### **3.4.2 Biologický popis adheze**

Po primární adherenci začínají bakterie exprimovat povrchové molekuly nazývané jako adheziny [46], které jsou důležitou částí procesu adheze. Většinou se jedná o proteiny a glykosylované proteiny. Jejich přítomnost je hlavní podmínkou nezvratné adheze bakterie na substrát. Jedním z příkladů adhezinů je například i protein vázající fibronectin [55].

Fibronectiny jsou jednou z hlavních složek struktur zaplňujících mezibuněčné prostory vícebuněčných organismů a povrch buněk. – označovaných jako extracelulární matrix (ECM). ECM je tvořena směsí vláknitých proteinů a proteoglykanů, jejichž hlavním úkolem je udržovat integritu tkání [56]. Velké množství složek ECM je cílem pro vazebnou interakci s bakteriálními adheziny. Pro tuto skupinu adhezinů se vžilo označení – MSCRAMM (*microbial surface components recognizing matrix*

*biomolecules*). Výskyt MSCRAMM adhezinů je také jedním z ukazatelů virulence daného bakteriálního kmene [57].

### **Fibronectin vázající adheziny**

Pokud daný bakteriální kmen nese adhezin: vázající fibronectin – fibronectin binding protein (FBP), je to známka schopnosti daného organismu kolonizovat sliznice vyšších organismů, případně vyvolat infekci. Zdá se, že kromě adherence mají FBP ještě i funkci signální, ale výzkum v této oblasti ještě není dostatečný [58]. FBP jsou produkovány velkým množstvím bakteriálních zástupců, mezi něž patří např. *S. aureus*, ústní streptokoky a několik dalších rodů [46; 59].

FBP se naváže pouze na fibronectin, ale byla pozorována celá řada nescifických interakcí mezi FBP a jinými typy povrchů např. vazba na buňky endotelu, epitelu, fibroblastů nebo osteoblastů [60; 61]. Dále může sloužit k intracelulární invazi do buněk endotelu, epitelu, keratinocytů a osteoblastů [62; 63]. Invaze probíhá pomocí interakce FBP s buněčným integrinem  $\alpha_5\beta_1$  [64].

### **Adheziny vázající kolagen, laminin a elastin**

Mezi další složky ECM kromě fibronectinu patří kolagen, zpevňující materiál stěvních stěn, laminin a elastin tvořící základní složku vaziva stěvních stěn. Bakterie, vytvářejí adheziny vázající se k těmto složkám ECM, což je molekulární podstatou kolonizace sliznic trávicího traktu.

Mezi kolagen vázající proteiny patří například Cna – adheziny kmene *S. aureus* [65]. Analogy tohoto adhezinů byly nalezeny i u jiných bakteriálních kmenů například *Lactobacillus* spp. produkuje kolagen vázající S-vrstvu (CbsA) [66].

Laminin je síťující činidlo a na rozdíl od výše zmíněných složek ECM není registrována žádná doména vázající pouze laminin [67]. I přesto je známo několik laminin adhezinů, například již výše zmíněný CbsA *Lactobacillus* spp. je schopen také velmi efektivně vázat laminin [68]. Dalším příkladem může být jeden z transportérových proteinů *E. coli* – EhaB [69].

Adheziny schopné vázat elastin jsou velmi málo prozkoumané. Je znám pouze jeden membránový protein *S. aureus* schopný vázat elastin [70], kromě toho je ještě

také pozorovaná zkřížená schopnost vázat elastin u výše zmíněného FBP od *S. aureus* [71].

### **Glykosylované proteiny**

Pojem glykosylovaných proteinů zahrnuje rodinu nespecifických adhezínů, které jsou schopny se vázat na velmi rozsáhle rozmezí povrchů. [72]. Tyto proteiny obsahují velká množství opakování serinů ve své struktuře [73] a jsou typické např. pro gram-pozitivní streptokoky spojené se zubním kazem [72]. Glykosylované proteiny jsou jednou z nejrozšířenějších formou biopolymerních molekul.

### **3.4.3 Modely pro studium bakteriální adheze k povrchu stěny tlustého střeva**

Mukózní povrch je přirozenou bariérou gastrointestinálního traktu, která jej chrání před patogenními mikroorganismy. Je komplexním organickým systémem tvořeným střevním epitelem, buňkami imunitního systému a rezidentní mikroflórou [74]. Střevní epitel je tvořen vrstvou epiteliálních buněk – enterocytů. Mezi nimi se vyskytují pohárkové buňky, které secernují vysokomolekulární glykoproteiny nazývané mucin, který má silný negativní povrchový náboj a velkou hydratační kapacitu a tvoří hlavní strukturální složku hlenové vrstvy. Mucin se nachází na povrchu epiteliálních buněk obráceném do střevního lumina. Vrstva mucinu slouží nejen jako sterická bariéra bránící patogenním bakteriím v pronikání k povrchu střevního epitelu, ale je nejdůležitější složkou v nespecifické ochraně proti infekci. Kromě toho má i řadu dalších funkcí, jako je lubrikace lumenu střeva usnadňující pasáž tráveniny, zachovávání hydratační vrstvy epitelu a tvoří propustnou gelovou vrstvu pro výměnu plynů a živin s intestinálním epitelem [75]. Jeho podstatnou součástí tvoří mukoprotein mucin. Jeho obrovské molekuly jsou tvořeny proteinovou páteří, z níž vybíhají postranní sacharidové řetězce zakončené většinou skupinami cukrů podobných cukerným skupinám nacházejícím se na povrchu slizničních buněk. Na tyto cukerné řetězce adherují patogenní bakterie a tímto způsobem mohou na povrchu sliznice vytvářet kolonie, které jsou podmínkou jejich patogenního působení. Je-li sliznice pokryta hlenem obsahujícím mucin, bakterie se zachycují na jeho postranní řetězce a jsou s ním odplavovány z těla ven. Podobného principu využívá v poslední době se rozšiřující přidávání mannanů do krmiv mláďat ohrožených bakteriálními průjmy. Oligosacharidy s obsahem mannanů blokují vzájemnou interakci mezi povrchy

slizničních buněk a bakteriemi, jimž tak brání v adhezi, která je podmínkou jejich patogenního působení.

Ochranná funkce mucinů vychází z jejich vláknité struktury. Jádro mucinového vlákna je tvořeno proteinovým řetězcem, na nějž jsou navázány krátké řetězce oligosacharidů. Svým tvarem připomíná štětka na vymývání lahví. Podstatné je, že zastoupení oligosacharidů na povrchu mucinů odpovídá jejich zastoupení v glykokalix buněčných povrchů a je geneticky podmíněno v souvislosti s genetikou krevních skupin [76]. Tímto způsobem v prostředí střevního obsahu vytvářejí obrovský nadbytek snadno dostupných vazebných cílů, na něž se případné patogenní bakterie navazují přednostně, neboť právě vzájemná vazba bakteriálních a buněčných cukerných složek je nejčastější interakcí v procesu bakteriální adheze ve střevě [77].

Doposud bylo identifikováno na 20 různých typů mucinů. V gastrointestinálním traktu, především pak v tlustém střevě, převládá mucin označený MUC2 [78]. V nedávných studiích bylo zjištěno, že hlenová vrstva střeva je tvořena dvěma vrstvami. Vnitřní přilnavou vrstvu je možné odstranit pouze jemným seškrábnutím, zatímco vnější, volně přiléhající vrstva se dá snadno odstranit šetrným odsátím [79]. Ačkoli obě vrstvy jsou tvořeny převážně MUC2 mucinem, mají rozdílné vlastnosti a funkce. Vnitřní vrstva přiléhá k epitelu a je bez bakterií, protože má ve své struktuře malé póry, které brání jejich přímému kontaktu s epiteliálními buňkami. Vnější vrstva je pravděpodobně vytvářena z vrstvy vnitřní (mají stejné složení), má menší hustotu a obsahuje vysoký počet bakterií, pro které představuje ideální prostředí – je pro ně nejen důležitým zdrojem energie, ale rovněž umožňuje vazbu bakterií na četná vazebná místa [80].

Rezidentní mikroflóra, která trvale sídlí v gastrointestinálním traktu je tvořena především bifidobakteriemi, laktobacily, enterokoky a propionibakteriemi, které se podílejí na udržování rovnováhy mikrobiálního prostředí, na omezování kolonizace a invaze patogenů, na zachování epiteliální integrity a na podpoře imunitních funkcí [81]. Pro zachování a podporu výše uvedených vlastností rezidentní mikroflóry se ve výživě člověka využívají probiotika. Od probiotických kmenů se očekává, že budou mít především schopnost kolonizovat, alespoň dočasně, mukózní povrch tlustého střeva a chránit sliznici proti patogenním mikroorganismům jako např. patogenní kmeny *Escherichia coli* [82], patogenní Salmonelly, *Helicobacter pylori* [83], případně další alimentární infekční agens [84] Kromě toho se od nich očekává, že budou stimulovat střevní imunitní systém [85; 86]. Základním a nezbytným předpokladem pro to, aby se

výše uvedené vlastnosti probiotických bakterií mohly uplatnit, je jejich schopnost adherovat k intestinálnímu mukóznímu gelu nebo k epiteliálním buňkám [87]. Bakteriální adheze ke střevnímu epitelu se uskutečňuje pomocí specifických vazeb mezi proteiny bakteriálního povrchu (lektiny) a komplementárními oligosacharidy na povrchu tkání [88; 89]. Z toho vyplývá, že schopnost probiotických bakterií adherovat k pevným povrchům by měla být považována za jedno ze základních selekčních kritérií pro jejich výběr k dalšímu použití.

Stanovit stupeň adheze mikroorganismů metodami *in vivo* je obtížné, proto byly vyvinuty modely pro její studium *in vitro*, tak aby mohly být prováděny na různých površích simulujících prostředí střeva. Nejčastěji jsou používány humánní epiteliální buněčné linie např. HT-29 a Caco-2 [90], které jsou obecně považovány za modely diferencované střevní sliznice, protože vykazují funkční vlastnosti dospělých enterocytů [91]. Jinou linií používanou ke studiu adheze bakterií ke střevní sliznici je stabilní buněčná linie HT29-MTX. Jedná se o homogenní populaci humánních pohárkových buněk secernujících mucin [92], a umožňující tak studovat vliv mucinové vrstvy na interakci bakterií s povrchem střeva [90]. V pokusech *in vitro* se také využívá imobilizovaný střevní hlen [93], ve fermentorech napodobující lumen střeva i mucinové agarové hadice, nebo celé fermentační systémy s mucinovými nosiči. Při sledování adhezivních schopností probiotických kmenů v pokusech *in vitro* jsou ke zjišťování počtu adherovaných bakteriálních buněk využívány bakterie značené radioaktivními izotopy nebo fluorescenčními barvivy.

## **In vitro modely pro studium adherence**

### **Adherence bakterií k mucinu**

Jedná se o nejjednodušší model vyhodnocení adheze je založen na imobilizaci mucinu na povrchu mikrotitračních destiček [94]. Množství adherovaných bakterií je stanovováno obvyklým způsobem např. barvením nebo počítáním CFU po odloučení bakterií od povrchu. Výsledky adheze však vykazují větší variabilitu, než jaká je pozorována při použití buněčných kultur [95]. Pro vyhodnocení adheze je možné také využít humánního mucinu získaného ze vzorků výkalů. Při porovnání komerčního a fekálního mucinu pro zjišťování adheze probiotických bakterií *L. rhamnosus* GG a *B. lactis* Bb12 nebyly zjištěny průkazné rozdíly v naměřených hodnotách [96]. Pro stanovení rozdílů v adhezi bakterií k mukózní vrstvě vytvořené v různých částech střeva se jako model používá intestinální mucin odebraný z různých částí střeva prasat [97].

### **Adherence bakterií k buněčným kulturám**

Pro tento typ studií *in vitro* jsou využívány buněčné kultury humánních intestinálních epitelálních buněčných linií především Caco-2 buněk a HT29-MTX buněk, které lépe simulují přirozené prostředí střeva. Caco-2 buňky vytvářejí homogenní a polarizovanou jednoduchou vrstvu, která se svým charakterem blíží epitelu tenkého střeva [91]. Předchozí studie [98] prokázaly, že fluorescenční značení bakterií ve spojení s jednovrstvou kulturou Caco-2 buněk je vhodný model pro studie adherence a může být využíván jako alternativa k radioaktivně značeným bakteriím. Nicméně, kultury Caco-2 buněk nevytvářejí dostatečnou vrstvu mucinu. Hodnoty zjištěné adherence některých bakteriálních kmenů (např. *L. rhamnosus* GG, *B. lactis* Bb12 nebo *B. animalis* IATA-A2) k Caco-2 buňkám jsou výrazně nižší než k samotnému mucinu. Naopak adherence některých kmenů patogenních bakterií *E. coli* ke Caco-2 buňkám je vyšší než k samotnému mucinu [95]. Z tohoto důvodu je někdy dávána přednost buněčné linii HT 29-MTX vzniklé z HT 29 buněk adaptovaných na methotrexát (MTX) [92], které se diferencují na pohárkové buňky secernující mucin [99]. Při použití samotných buněk HT 29-MTX, jsou, ve srovnání s hodnotami získanými u Caco-2 buněk, pozorovány výrazně nižší hodnoty adherence u všech testovaných probiotických kmenů [95].

V intestinálním epitelu představují enterocyty a pohárkové buňky dva základní typy buněk. Pro zpřesnění *in vitro* studií bakteriální adherence byly proto vyvinuty

modely využívající ko-kultury obou typů buněk. Caco-2 buňky reprezentující enterocyty a HT29-MTX zastupují pohárkové buňky secernující mucin [100] v poměru 90:10, který nejvíce odpovídá přirozeným podmínkám v střevě.

Od Caco-2 buněčné linie byly odvozeny buněčné linie C2BBe (linie označené 1 a 2), které vytvářejí jednoduchou polarizovanou vrstvu buněk s apikální kartáčovou vrstvou srovnatelnou s buňkami v humánním intestinu [101]. Ačkoli tyto buněčné linie byly používány jako *in vitro* model pro studiu průniku bakterie *Salmonella typhi* přes intestinální epitel [102], linie C2BBe představuje potenciální alternativní model pro studium vztahů mezi probiotickými bakteriemi a střevními epiteliálními buňkami, jak již bylo ověřeno např. ve studii [103].

V poslední době jsou používány jako relevantní *in vitro* systémy pro studium intestinálních mezibuněčných interakcí prasečí intestinální epiteliální buněčné linie IPEC-J2 [104], které se mohou diferencovat do kultur vykazujících vlastnosti enterocytů.

### **Vyjádření adheze**

Adherence probiotických bakterií je nejčastěji vyjadřována jako procento adherovaných bakterií z celkového počtu bakterií přidaných do zvoleného systému (např. k Caco-2 buňkám). V případě použití radioaktivně značených bakterií je adherence vyjádřena jako procento radioaktivity naměřené po adherenci a následném promytí ve srovnání s radioaktivitou mikrobiální suspenze přidané k zvolenému médiu. Podobně i v případě využití fluorescenčního značení bakterií. Pro kvalitativní vyhodnocení adherence jsou využívány elektronové či fluorescenční mikroskopy.

Rozdíly v adhezi bakterií k mucinu, kulturám HT 29-MTX a Caco-2:HT 29-MTX (90:10) mohou být způsobeny rozdílným typem mucinu v uvedených modelech. V mnoha studiích bylo prokázáno, že adheze u různých metod *in vitro* se liší dokonce i u stejného kmene, což naznačuje, že bakteriální struktury zahrnuté do procesu vazby na epiteliální buňky a mucinovou vrstvu mohou být rozdílné. Kromě toho bylo prokázáno, že adheze může být ovlivněna takovými faktory, jako je použité medium, teplota, zachování tepelné stability po celou dobu experimentu a pH [105]. Rovněž bivalentní ionty, jako třeba  $\text{Ca}^{2+}$  mohou ovlivnit bakteriální adhezi [106]. Ačkoli použití buněčných kultur místo extrahovaného mucinu lépe odpovídá situaci v živém organismu, je nutné rovněž vzít v úvahu typ buněk i strukturu buněčných kultur, protože to určuje povahu adhezních míst v systému. Proto využitím různých *in vitro* metod pro

studium adherence získáme komplexnější informace o rozdílech v adherentní schopnosti jednotlivých bakteriálních kmenů a můžeme tak odlišit jednotlivé typy interakcí a molekul, které zprostředkují interakce mezi hostitelem a mikroorganismem.

Z výše uvedeného vyplývá, že hlavním záměrem předkládané práce bylo zjistit jakým způsobem je ovlivňováno působení probiotik současným podáváním prebiotik. Obecně se soudí, že jejich společné podávání je prospěšné. Podíváme-li se však blíže na mechanismus jejich působení, nemůžeme se vyhnout jisté pochybnosti, zda tomu tak vskutku je. Skutečnost, že některá probiotika jsou schopna chránit střevní epitel před kolonizací některými bakteriálními druhy je znám zejména u patogenních mikroorganismů [120]. Na něm je ostatně založen jeden z příznivých účinků krmných oligosacharidů. Vzhledem k tomu, že, kromě výše uvedených případů, vzájemná interakce probiotik a prebiotik nebyla soustavně studována, dali jsme si za cíl prostudovat ji podrobněji ve větším rozsahu. Pro tuto studii jsme si zvolili model adheze probiotický bakteriálních kmenů kultivovaných v přítomnosti prebiotik na tři typy substrátů: polystyren, polystyren pokrytý mucinem a tkáňové kultury modelující epitel tlustého střeva. Současně jsme se věnovali i optimalizaci metod pro stanovení stupně bakteriální adheze a tvorby biofilmů.



## **4 Materiál a metodika**

Ačkoliv hlavním cílem práce bylo studium vzájemné interakce probiotický kmenů bakterií s prebiotiky s ohledem na jejich schopnost adherovat na povrch střevního epitelu, a posléze na něm vytvářet biofilm, v úvodu vlastní studie jsme byli nuceni vyřešit i některé metodické otázky. Hlavní úskalí, s nimiž se výzkumníci studující bakteriální adhezi a tvorbu biofilmu, je, jak již ostatně bylo v úvodní části práce zmíněno, nízká reprodukovatelnost způsobená malou standardností vyplachování jamek kultivačních mikroplošen. Na tuto skutečnost upozorňuje většina prací, která se tomuto tématu věnují [113].

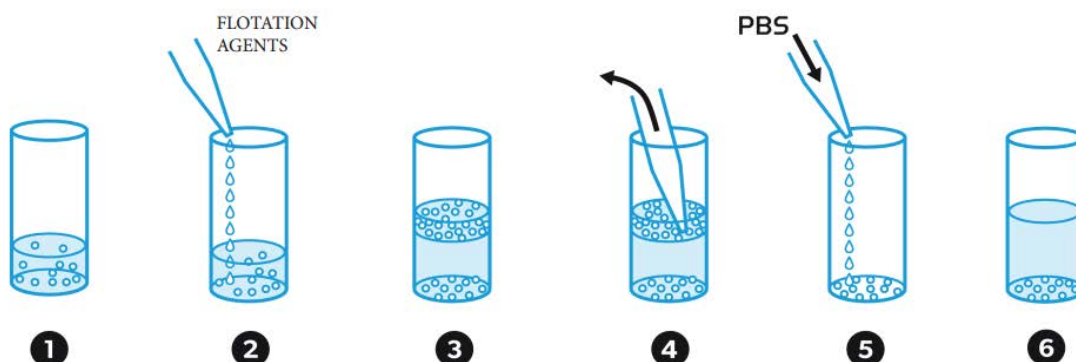
### **4.1 Flotace a její použití pro oddělení adherovaných a planktonických bakterií**

Během optimalizačních testů při testech adherence byla pozorována velká variabilita při použití klasického promývání. Proto byla vyzkoušena také metoda flotace jako využití pro vzájemné oddělení planktonických a adherentních bakterií. Tato metoda je založena na využití vysokohustotních roztoků (s hustotou větší než je hustota bakterie), které nadnášejí planktonické a slabě adherované bakterie k povrchu ze kterého mohou být jednoduše odsány. Výhodou této metody je jednoduchost jejího použití a přesně definovaná síla, která působí na adherentní bakterie. Bylo ale nutné ověřit možnou toxicitu použitého flotačního činidla a ověřit vlastní funkčnost použité metody. Pro ověření efektu flotace byly zvoleny tři metody: fluorescenční detekce pomocí readeru (metoda je téměř stejná s metodou využitou při měření změn adherence probiotik), kultivace adherovaných bakterií a přímé počítání nabarvených adherentních bakterií na fluorescenčním konfokálním mikroskopu.

#### **Fluorescenční stanovení poměru adherujících a planktonických bakterií**

Fluorescenčně značený bakteriální kmen (postup barvení viz níže) o objemu 150  $\mu$ l byl inkubován 60 minut v 96 jamkové polystyrenové mikrotitrační destičce (Nunc, Německo). Následně byly jamky až sedmkrát promyty PBS, nebo flotovány některým z flotačních činidel. Flotace probíhala přidáním 100  $\mu$ l FA do jamky ke vzorku bakterií. Následně byl vršek odsán a vrchní i spodní část byla vyhodnocena měřením fluorescence fluorescenčním readerem Synergy (viz. Obr 1). Pokus byl opakován s

detekcí vzorku viabilních bakterií pomocí kultivační plotnové metody. Pokus byl měřen ve třech opakováních ve třech nezávislých experimentech.



**Obrázek č. 1:** Ilustrace flotace. 1 – roztok volných a adherovaných bakterií; 2 – přidání flotačního činidla; 3 – oddělení planktonických a adherovaných bakterií; 4- vrchní vrstva je odsáta a změřena její fluorescence; 5 – přidání PBS; 6 – změření fluorescence adherovaných bakterií.

### Stanovení poměru adherovaných/planktonických bakterií plotnovou metodou

Metoda detekce pomocí fluorescence byla dále potvrzena pomocí plotnové metody, která slouží jako určitý standard. Výsledky mezi fluorescenční a plotnovou detekcí by se neměly lišit. Postup, až do kroku vyhodnocení, byl stejný jako v případě fluorescenční detekce, s tím rozdílem, že nebyly použité fluorescenčně značené bakterie. Vrchní vrstva byla v sériovém ředění rozetřena na M-H agar a spodní adherovaná vrstva bakterií byla uvolněna působením ultrazvuku (Ecoson, 2 x 180 W, 8 min). Pokusy probíhaly ve třech opakováních vždy se třemi vzorky.

### Vyhodnocení efektu flotace pomocí laserového skenovacího mikroskopu

Jako další způsob vyhodnocení účinnosti flotace byla zvolena metoda přímého počítání fluorescenčně značených bakterií pomocí laserového skenovacího mikroskopu. V poslední sérii pokusů byl efekt flotace vyhodnocen pomocí LSCM (Leica TCS SP5-X). Fluorescenčně označená suspenze bakterií připravená stejně jako v předchozím pokusu byla kultivována v 8-jamkových destičkách se skleněným dnem *u-slide* 8x250  $\mu$ l (Ibidi, Německo) po dobu 24 hodin při 37 °C. Po kultivaci byla směs barvena dle standardního protokolu.

Obarvené kmeny byly pozorované pod LSCM, kde byla stejná oblast jamky až desetkrát promyta nebo flotována. Měření probíhalo se všemi flotačními činidly. Změna

fluorescence byla vyhodnocena jako změna počtu pixelů po promytí/flotaci oproti původnímu stavu. U experimentů, kde byl sledován nárůst biofilmu, byl použit elektronový skenovací mikroskop Tescan – VEGA (ČR), pro dokumentaci přítomnosti nebo absence biofilmu.

**Testovaná flotační činidla (FA):** sacharóza, polyethylen glykol 20 000, dusičnan sodný, siřičitan hořečnatý, dextran z *Leuconostos* spp. (Sigma), chlorid cesnatý (Sigma), diatrizoát sodný (Sigma), PERCOLL (Sigma) a etylenglykol (Penta). Všechny výše uvedené chemikálie byly použity jako flotační činidla v rozpuštěné formě v PBS. Výjimku tvoří PERCOLL, který byl použit tak jak byl dodán od výrobce. Příslušná ředění jsou uvedeny níže.

**Bakteriální kmeny:** v experimentu byly použity typové kmeny *Staphylococcus epidermidis*, které byly dříve charakterizované jako biofilm pozitivní CCM 4418<sup>T</sup> a biofilm negativní CCM 7221<sup>T</sup> pomocí přítomností *ica* lokusu a barvení krystalovou violetí v mikrotitrační destičce [113]. Před každým experimentem byly oba kmeny kultivovány v tryptosójovém bujónu (TSB) (Sigma) při 37 °C za aerobních podmínek. Pro vlastní experiment byly oba kmeny převedeny do čerstvého TSB nebo PBS a absorbance jejich suspenzí byly upraveny na  $A_{600} = 0,5$ .

**Testování toxicity flotačních činidel:** toxicita použitých FA byla měřena na kmeni *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418<sup>T</sup> za následujících podmínek. Hustota bakteriální suspenze byla upravena na  $A_{600} = 0,5$  a 500  $\mu$ l. FA o největší koncentraci bylo přidáno ke 100  $\mu$ l bakteriální suspenze. Směs byla inkubována za třepání po dobu 15 a 30 minut při teplotě 37 °C. Počet přeživších bakterií byl stanoven plotnovou metodou.

**Ovlivnění intenzity fluorescence samotným působením FA:** obarvená bakteriální suspenze (postup barvení uveden níže) byla inkubována s flotačním činidlem o nejvyšší koncentraci, která ještě nepůsobila toxicky v poměru 1:1 po dobu 30 minut. Následně byla výsledná fluorescence porovnána se vzorkem inkubovaným v PBS. Pokud došlo k více, než 30 % snížení fluorescence bylo dané flotační činidlo označeno jako inhibitor fluorescence a nebylo použito v dalších experimentech. Měření bylo prováděno v 5 opakováních ve 3 nezávislých experimentech.

## 4.2 Vliv prebiotik na adhezi probiotických bakterií

Během optimalizačních pokusů byla zvolena metoda detekce adherence pomocí fluorescenčně zbarvených bakterií. Tato metoda se od ostatních způsobů detekce (jako je například kultivace nebo mikroskopické počítání) vyznačuje velmi dobrou opakovatelností a relativně jednoduchým provedením, kdy lze za pomoci fluorescenčního readeru provést současně 96 měření v jedné mikrotitrační destičce.

Klasicky jsou pro testy adherence využity tkáňová linie Caco2 [98]. Nicméně, Pontier aj. [100] představili možnost využití směsné kultury Ht-29 a caco-2 v poměru 1:9. Tato směsná kultura lépe napodobuje vlastnosti epitelu a je může být ještě dále vylepšena využitím diferencových buněk HT-29 MXT, které konstantně produkují na svém povrchu mucin.

### **Použitá prebiotika:**

Orafti GR, fy Beneo (Němkecko) - čekankový inulin s polymeračním stupněm 2 až 60 (průměrný polymerizační stupeň (DP) > 10)

Chemické složení: inulin (> 90 % v 1 kg suš.), volná glukosa + fruktóza: (<= 4 % / v 1 kg suš.) volná sacharóza: (<= 8 % v 1 kg suš.), sušina: 97 ± 1,5 %

Orafti P95, fy Beneo (Německo), převážně oligofruktosa vzniklá jako produkt parciální enzymové hydrolyzy čekankového inulinu. Polymerační stupeň se pohybuje v rozmezí 2 až 8.

Chemické složení: oligofruktosa (>=93% v 1 kg suš.), volná glukosa + fruktóza + sacharóza (<= 6,8% v 1 kg suš.), celková sušina 97 ± 1,5 %.

Orafti Synergy1, fy Beneo (Německo), je kombinací inulinu se selektivní délkou řetězců a specifické frakce oligofruktosy. Polymerační stupeň není uveden.

Chemické složení: inulin + oligofruktosa: (90-94 % v 1 kg suš.), volná glukosa + fruktóza + sacharóza: (6-10 % v 1 kg suš.), sušina: 97 ± 1,5 %

Vivinal GOS, fy FrieslandFoods DOMO (Nizozemí)

Chemické složení: galaktooligosacharidy: (min. 57 % v suš.), laktóza: (max. 23 % v 1 kg suš.), glukosa: max. (22 % v 1 kg suš.), galaktóza: min. (0,8 % v 1 kg suš.), sušina: 74 - 76 %

### **Testované probiotické kmeny:**

Pro testaci byly vybrány typové probiotické kmeny bakterií mléčného kvašení ze sbírky Laktoflora: *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 598<sup>T</sup>, CCDM 598<sup>T</sup>, *Lactobacillus acidophilus* CCDM 79<sup>T</sup>, *Lactococcus lactis* subs. *lactis* CCDM 617<sup>T</sup>, *Enterococcus durans* CCDM 500<sup>T</sup> a *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* 374<sup>T</sup>. Kromě typových kmenů byly také použity další netypové kmeny, které jsou ale standardně používané v mlékárenském průmyslu: smetanová kultura CCDM 17, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731, *Enterococcus durans* CCDM 922A, *Enterococcus faecium* CDM 945, *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* CCDM 94, *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 150, *Lactobacillus acidophilus* CCDM 151 a *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289. *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. a smetanová kultura CCDM 17 byly kultivovány v M17 bujónu (Sigma). *Lactobacillus* spp. byly kultivovány v MRS bujónu (Roche). *Bifidobacterium* spp. byl kultivován v MRS s 0,5% L-cysteinu (Roche). Použité kmeny byly získány ze sbírky čistých mlékařských kultur Laktoflora (Milcom a.s. Tábor).

Všechny kmeny byly před experimentem kultivovány 20 hodin při teplotě 37 °C. Po kultivaci byly promyty a resuspendovány v PBS pufru pH 7,4. Koncentrace bakterií byla upravena na absorbanci  $A_{600} = 0,5$

### **Fluorescenční barvení probiotických bakterií:**

Všechny probiotické kmeny byly před experimentem označeny fluorescenčním barvivem. Optimální barvivo bylo vybráno na základě série pokusů se soupravami: SYTO red fluorescent kit a SYTO green fluorescent kit (Life Science, Německo), kde byla sledována kvalita značení bakterií a stálost barvení v čase. Pro další experiment bylo vybráno barvivo SYTO 24, které se váže nespecificky na DNA a RNA. Roztok bakterií v PBS byl barven 5  $\mu\text{M}$  roztokem SYTO 24 po dobu 30 minut při 37 °C. Excitační maximum SYTA 24 po navázání na DNA je 490 nm a emisní maximum je 515 nm.

### **Vlastní provedení testů adherence:**

Pro vlastní experiment byly použity tři typy povrchů, na kterých byla zkoumána schopnost adherence probiotik za přítomnosti prebiotik: (i) černé polystyrenové 96-jamkové destičky bez jakékoliv modifikace povrchu (Nunc, USA); (ii) mucinem pokryté černé mikrotitrační destičky potažené 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> mucinu typu II (Sigma, Německo), (vazba 4 hod. při 4 °C); (iii) směsná tkáňová kultura HT-29 a Caco-2 v průhledných 96-jamkových destičkách s modifikovaným povrchem jamek pro kultivaci TK (Nunc, USA). U všech těchto variant byl postup následující: přidání 100 µl fluorescenčně značených bakterií do mikrotitrační destičky, kultivace 60 m. při teplotě 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, jemné promytí jamek pomocí temperovaného PBS přidání 100 µl PBS a měření na fluorescenčním readeru Synergy s nastavenou intenzitou detekce na 100 a  $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$   $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$ . Každý pokud byl zpracován ve 4 variantách ve třech nezávislých opakováních.

Pro *in vitro* simulaci střevního epitelu byla připravena směsná kultura dvou buněčných linií HT-29 (ATCC HTB-38, 137 až 147 pasáž) a Caco-2 (ATCC HTB-39 pasáž 20 až 30) v poměru 1:9. HT-29 byly kultivovány v *Dulbecco's Modified Eagle Medium* s 15% fetálního bovinního séra (Lonza, Německo) a 1% směsi Penicillin/Streptomycin (Lonza) a 1% Na-pyruvátém (Lonza). Před experimentem byly HT-29 buňky diferencovány na buňky produkující mucin podle metody prezentovanou Lesuffleurem *et al.* [92]. Caco-2 buňky byly kultivovány v *Eagle's minimálním médiu* s 20% fetálního bovinního séra, 1% penicillinu a streptomycinu a 1% L-glutaminem (Lonza). Startovací koncentrace směsné kultury byla 1,10<sup>6</sup> buněk/cm<sup>2</sup> a kultura byla kultivována na dně jamky, dokud nebylo dosaženo konfluence (typicky během 14 dní).

### **Statistické vyhodnocení výsledků:**

Data byla zpracována pomocí programů Statistica 10 (StatSoft, CZ), Excel (Microsoft, US) a MatlabR2013a (MathWorks, US). Všechna měření jednoho experimentu byla standardizována a převedena na % fluorescence pomocí následující rovnice:

$$x (\%) = \frac{(x_{RFU} - NC)}{\overline{PC}}$$

kde  $x (\%)$  = převedené *relative fluorescence unit* (RFU) na % fluorescence

$x_{RFU}$  = fluorescence jednotlivé jamky změřená v RFU jednotkách

NC = negativní kontrola, tj. nespecifická fluorescence jamky s fosfátovým pufrém

PC = pozitivní kontrola, tj. fluorescence obarveného vzorku bakterií bez promývání

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami prebiotik a sacharidů byly vyhodnoceny pomocí *One-Way* ANOVA. Nulová hypotéza zde byla: adherence s prebiotiky/sacharidy je stejná jako adherence kmene bez přítomnosti těchto aditiv. Skupiny prebiotik a sacharidů odlišující se od vzorku bez aditiv byly testovány Tukey-Kramerovou metodou.

Všechny výsledky byly vyhodnoceny na přítomnost interakce mezi jednotlivými faktory pomocí *Three-Way* ANOVA. Zvolené faktory byly: (i) prebiotika; (ii) probiotika; (iii) typ povrchu.

#### **4.3 Vliv biofilmového fenotypu bakteriálního kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 na jeho probiotické vlastnosti.**

Zvýšení účinků probiotik lze očekávat od kmenů, jejichž fenotyp vykazuje schopnosti tvořit biofilmy. Biofilmové formy vykazují vyšší odolnost vůči chemickým i fyzikálním vlivům a déle perzistují ve střevním obsahu. Biofilm tvořící probiotika mohou proto zvýšit účinnost vlastních probiotických vlastností. Mezi sledované probiotické vlastnosti patří: přežívání v solích žlučových kyselin, přežívání v nízkém pH a adherence na polystyren a na tkáňovou kulturu HT-29. Toto předpokládané zlepšení probiotických vlastností jsme se pokusili prokázat následující sérií pokusů.

Pro pokusy porovnávající probiotické vlastnosti biofilm tvořící a planktonické formy téhož bakteriálního druhu byl použit bakteriální kmen *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 (dále označen jako kmen 10B) v planktonické formě (K-) a ve formě biofilmu (K+) kultivované na anorganickém křemičitém substrátu ProbiFix K (Pharmaceutical Biotechnology, Česká republika).

### **Stanovení počtu živých bakterií (CFU):**

Počet živých bakterií ve všech vzorcích byl stanoven modifikovanou metodou Miles-Misra [107; 108]. Vzorek je sériově (1:9) rozředěn ve PBS (pH 7,4) a rozkapán na agar dle de Man, Rogosa a Sharpe (MRS) v objemu 10  $\mu$ l. Po inkubaci je spočítáno množství kolonií v jedné kapce a přepočítáno na celkové množství CFU v 1 ml:

$$CFU.ml^{-1} = \frac{(CFU / \text{objem kapky})}{zředění}$$

kde:

CFU – počet kolonií v kapce

zředění – řád zředění ve tvaru  $10^{-x}$

### **Vliv biofilmu na přežívání kmene 10B v roztoku solí o nízkém pH**

Byl připraven roztok solí simulující prostředí žaludku o složení: NaCl (2,05 g.l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,60 g.l<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0,11 g.l<sup>-1</sup>) a KCl (0,37 g.l<sup>-1</sup>) [109]. V roztoku bylo upraveno pH pomocí 1 M HCl na pH 1, 2 a 3. V těchto připravených roztocích byly oba dva vzorky inkubovány 2 hodiny na třepačce při teplotě 37 °C. V časech 0,5, 1 a 2 hodiny byly odebrány vzorky; pH vzorků bylo upravováno pomocí 1 M NaHCO<sub>3</sub> na hodnotu pH = 7,4. Počet CFU ve vzorku byl určen pomocí modifikované plotnové metod Miles-Misra. Každý pokus byl proveden ve třech opakováních.

### **Vliv biofilmu na přežívání kmene 10B v roztoku žluči**

Vzorek K+ a K- byl inkubován v 0,3% roztoku prasečí žluči (Sigma, Německo) po dobu 4 hodin při teplotě 37<sup>0</sup>C [110]. Každou hodinu byl odebrán vzorek. CFU bylo stanoveno pomocí modifikované plotnové metody Miles-Misra. Každý pokus byl proveden ve třech opakováních.

### **Vliv biofilmu na schopnost adheze kmene 10B na polystyren a na tkáňovou kulturu HT29**



Kromě klasických probiotických vlastností byla také sledována změna schopnosti adherence biofilm pozitivního a biofilm negativního kmene. Vzorky K+ a K- byly inkubovány v mikrotitračních destičkách buď na (narostlé, nebo na suspenzi, jak staré) tkáňové kultuře nebo přímo na jejich polystyrenových stěnách po dobu 0, 1, 2, a 3 hodin. Následně byl roztok nad povrchem odsát a jamky byly třikrát promyty PBS(pH 7,4) [111]. Ke tkáňové kultuře bylo následně přidáno 0,12 % prasečího trypsinu (SAFC Biosciences) a po uvolnění buněk od substrátu byl přidán PBS a pro uvolnění bakterií od buněk TK byl použit ultrazvuk (ultrazvukový generátor o výkonu 2x180 W nastavený na 60 % výkonu s módem SWEEP). U polystyrenové mikrotitrační destičky byla destička s adherovanými bakteriemi a PBS pro oddělení adherovaných bakterií přímo ultrazvukována. Počet živých bakterií jako CFU byl stanoven modifikovanou plotnovou metodou podle Miles-Misra. Každý pokus byl připraven ve třech opakováních.

### **Inhibice růstu vybraných patogenních kmenů pomocí metody inhibice růstu**

Další zkoumanou vlastností biofilmových a nebiofilmových kmenů byla jejich schopnost inhibovat růst patogenních bakterií. U některých probiotik jsou prokázány přímé inhibice patogenních druhů pomocí produkce různých antimikrobiálních látek. Tato produkce je ale také ovlivněna fenotypem a může dojít k změně jejich expresního profilu při kultivaci v biofilmu.

Kultury K+ a K- byly lyzovány pomocí vysokoúčinného ultrazvukového homogenizátoru (SONOPULS HD 3400 – 400W amplituda 80% + pulzace 4 sekundy). Lyzované vzorky byly následně přefiltrovány přes bakteriální filtr 0,45 µm, 10 ul tohoto lyzátu bylo nakápnuto na agarovou plotnu na jejímž povrch byla rovnoměrně rozetřena kultura vybraných patogenních mikroorganismů: *Listeria monocytogenes* HUB-3, *Clostridium sordelli* CCM 4611, *Escherichia coli* CCM 3988, *Shigella flexneri* HUB-9, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960, *Salmonella* ser. enteritidis HUB-22, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Proteus vulgaris* CCM 1749 a *Candida albicans* CCM 8269. Stejným způsobem bylo na misku nakápnuto také 10 µl živých bakterií původních kultur (K+ a K-) [112]. Po inkubaci 24 hodin při 37<sup>0</sup>C (*Clostridium sordelli*-anaerobně) byly odečteny případně vzniklé inhibiční zóny. Test byl opakován dvakrát; uveden je průměr těchto výsledků vyjádřený jako rezistence, senzitivita či neurčitelnost.

### **Statistické vyhodnocení bylo provedeno T-testem**

Na vyhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový nepárový T-test. Tento test dokáže určit, zda dva nezávislé výběry mající normální rozdělení hodnot, mají stejné střední hodnoty. Shodnost rozptylů byla ověřena F-testem. Pokud výsledná hodnota je  $P < 0,05$ , jsou rozptyly obou dat stejné a může být použit T-test. Nulová hypotéza byla, že použití prebiotik/cukrů nemá žádný vliv na adherenci a výsledná adherence se neodlišuje od kontroly.

T-test je následně vypočítán podle vzorce:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1X_2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

kde:

$$S_{X_1X_2} = \sqrt{\frac{1}{2}(S_{X_1}^2 + S_{X_2}^2)}$$

$s_{x1}$  – směrodatná odchylka souboru 1

$s_{x2}$  – směrodatná odchylka souboru 2

$\bar{X}_1$  – průměr souboru 1

$\bar{X}_2$  – průměr souboru 2

$n_1$  – počet hodnot v souboru 1

$n_2$  – počet hodnot v souboru 2

Vypočítána hodnota byla srovnána jako s tabelovanými hodnotami pro hladinu významnosti 0,05 a převedena na P. Pokud  $P < 0,05$ , jsou soubory skupin při 95% pravděpodobnosti odlišné

## 5 Výsledky a vyhodnocení

Všechny čtyři pokusy jsou dále vyhodnoceny zvlášť a následuje tedy přehled pro (i) vliv prebiotik na adhezi probiotik; (ii) vliv biofilmového fenotypu na probiotické vlastnosti; (iii) možnost využití flotace jako způsobu oddělení adherentních a planktonických bakterií a (iv) stanovení adheze bakterií na sliznici tlustého střeva. Význam výsledků a jejich propojení je dále uvedeno v diskuzi.

### 5.1 Vliv prebiotik na adhezi probiotik

Z výsledků uvedených v Tabulkách 1 až 3 vyplývá, že ve většině případů došlo ke statisticky významnému poklesu adheze probiotických kmenů v přítomnosti prebiotik. Je zde také graficky znázorněna statisticky výrazná odchylka od skupiny bez prebiotik, která byla určena pomocí *one-way* ANOVA s  $P = 0,05$ . Statisticky významné rozdíly jsou v tabulce vyznačeny barevně. Červeně označené skupiny vyznačují pokles statisticky významný pokles adheze, zatím co zelené skupiny její vzestup.

Statistické zhodnocení výsledků pomocí *three-way* ANOVA nepotvrdilo žádnou jednoznačně převládající tendenci, která by charakterizovala vliv prebiotika na adhezivní schopnosti probiotik. Není tedy možné všeobecně konstatovat, že by nějaké prebiotikum nebo sacharid ovlivňovaly adhezenci jednoho typu probiotika ke všem testovaným substrátům stejným způsobem. Pozorovaná interakce probiotik a prebiotik je velmi odlišná i v rámci jednotlivých kmenů téhož bakteriálního druhu. Pokud bychom přece jen chtěli vyjádřit obecně převládající tendenci vyjadřující vliv testovaných prebiotik na schopnost probiotik adherovat k pevným povrchům, lze říci, že prebiotika tuto schopnost spíše tlumí. Útlum adheze je patrný u všech typů zkoumaných povrchů.

I když hlavní trend poklesu schopnosti adherence bylo po přidání prebiotik/sacharidů, u některých párů byl naopak pozorován i její zvýšení. Z tohoto pohledu, srovnání poměru poklesu/vzestupu adheze je nejvíce účinné prebiotikum P95, Vivinal a Synergy, které mohou zvyšovat adherentní schopnosti některých probiotických kmenů. Je však, ale nutné si konstatovat, že tento vzestup je specifický jak pro použitý kmen, tak i pro sledovaný substrát. Za pozornost stojí Prebiotikum GR, neboť snižovalo adhezi všech sledovaných probiotických kmenů na všech typech substrátů.

**Tabulka 1:** Výsledky adherence na polystyren. V tabulce jsou uvedeny hodnoty vyjádřeny v % adherovaných bakterií. Pomocí barev jsou odlišeny statisticky významné změny oproti blanku (skupina bez prebiotik/sacharidů) na hladině významnosti  $P = 0,05$ . Červeně je znázorněn pokles adheze a zeleně její vzestup.

Polystyrene	GR	Syn.	P95	Vivinal	Lactose	Gluc.	Galac.	Blank
smetanová startovací kultura CCDM 17	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,4	4,6 ± 0,5	3,8 ± 0,4	4,1 ± 0,4	8,4 ± 0,4	4,8 ± 0,2	3,7 ± 0,8
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 731	16,2 ± 0,7	2,8 ± 1,2	17,5 ± 1,2	31,9 ± 2,8	26,9 ± 3,5	7,5 ± 0,9	7,7 ± 0,7	17,5 ± 2,0
<i>E. durans</i> CCDM 922A	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	7,0 ± 1,0	8,3 ± 1,3	1,5 ± 0,5	23,3 ± 2,5	18,6 ± 1,1	32,2 ± 7,2
<i>E. faecium</i> CCDM 945	2,3 ± 0,6	3,4 ± 1,2	7,9 ± 1,2	11,0 ± 0,8	9,2 ± 0,9	20,9 ± 1,7	5,5 ± 0,8	5,3 ± 0,8
<i>B. lactis</i> CCDM 94	0,4 ± 0,2	3,1 ± 0,2	4,4 ± 0,4	7,9 ± 0,7	4,5 ± 0,7	28,1 ± 4,7	25,2 ± 5,1	41,9 ± 4,6
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 150	1,9 ± 0,4	2,8 ± 0,4	1,5 ± 0,3	3,0 ± 0,5	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,5	9,2 ± 0,6	24,6 ± 6,7
<i>L. acidophilus</i> CCDM 151	2,6 ± 0,8	2,0 ± 0,3	13,8 ± 1,4	3,5 ± 0,5	5,7 ± 1,0	5,6 ± 0,9	5,7 ± 0,9	24,7 ± 5,9
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 289	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,6	8,8 ± 1,3	13,3 ± 1,8	9,4 ± 0,8	4,4 ± 0,8	6,9 ± 1,2	14,3 ± 1,8
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 598 <sup>T</sup>	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,4	8,4 ± 0,7	10,2 ± 1,0	6,8 ± 1,9
<i>L. acidophilus</i> CCDM 79 <sup>T</sup>	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	7,3 ± 1,0	5,0 ± 0,7	5,7 ± 0,5	22,4 ± 1,0	17,9 ± 2,5	7,6 ± 1,1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 617 <sup>T</sup>	2,8 ± 0,7	3,8 ± 0,7	2,3 ± 0,6	6,4 ± 1,3	3,5 ± 0,7	4,6 ± 0,5	6,3 ± 0,9	8,1 ± 0,4
<i>E. durans</i> CCDM 500 <sup>T</sup>	3,6 ± 0,6	2,5 ± 0,3	5,8 ± 1,5	3,4 ± 0,7	2,9 ± 1,1	11,1 ± 1,9	16,9 ± 2,4	8,2 ± 1,5
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 74 <sup>T</sup>	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	2,0 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,3	5,5 ± 0,5

Při sledování vlivu prebiotik na adhezi probiotik na polystyren je zřejmý její všeobecný negativní efekt. U většiny probiotik došlo k významnému poklesu adheze. Výjimku tvoří pouze některé kombinace bakterií a jednoduchých cukrů. Z hlediska stanovení probiotických vlastností není tento výsledek až tak překvapivý, protože hlavní silou při adhezi na polystyren tvoří nepolární síly mezi povrchem substrátu a povrchem bakteriální buňky. Pokles adheze tedy může být vysvětlen interakcí bakterií a nabitého prebiotika.

**Tabulka 2:** Výsledky adheze na polystyren pokrytý mucinem. V tabulce jsou uvedeny hodnoty vyjádřeny v % adherovaných bakterií. Pomocí barev jsou odlišeny statisticky významné změny oproti blanku (skupina bez prebiotik/sacharidů) na hladině významnosti  $p = 0,05$ . Červeně je znázorněn pokles adheze a zeleně její vzestup.

Mucin	GR	Syn.	P95	Vivinal	Lactose	Gluc.	Galac.	Blank
smetanová startovací kultura CCDM 17	4,0 ± 0,5	12,6 ± 2,3	6,2 ± 1,7	5,0 ± 1,7	3,4 ± 0,9	10,3 ± 1,1	11,2 ± 1,3	26,4 ± 6,6

<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 731	4,2 ± 0,8	11,6 ± 3,1	6,4 ± 1,9	6,4 ± 1,6	7,1 ± 1,6	10,9 ± 1,8	11,5 ± 1,2	6,7 ± 1,8
<i>E. durans</i> CCDM 922A	4,3 ± 1,0	14,6 ± 2,1	2,0 ± 0,6	1,9 ± 0,5	1,6 ± 0,5	2,0 ± 1,0	2,0 ± 0,5	3,9 ± 1,1
<i>E. faecium</i> CCDM 945	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,9 ± 0,5
<i>B. lactis</i> CCDM 94	5,0 ± 1,5	8,0 ± 2,2	3,6 ± 0,6	5,9 ± 1,3	10,7 ± 2,7	3,7 ± 0,7	2,5 ± 0,6	10,2 ± 1,4
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 150	6,2 ± 2,2	8,8 ± 1,1	28,1 ± 5,4	2,2 ± 0,5	2,7 ± 0,9	3,0 ± 0,7	3,2 ± 0,6	4,4 ± 0,6
<i>L. acidophilus</i> CCDM 151	1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,2	3,1 ± 0,8	3,9 ± 0,8	3,4 ± 0,5	6,8 ± 0,8	7,9 ± 0,7	15,4 ± 0,9
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 289	2,0 ± 0,3	2,7 ± 0,6	3,4 ± 0,5	7,5 ± 0,8	3,9 ± 0,8	3,5 ± 0,7	3,7 ± 0,7	8,3 ± 1,1
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 598 <sup>T</sup>	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,2 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,9 ± 0,6	4,0 ± 1,3	5,5 ± 0,5
<i>L. acidophilus</i> CCDM 79 <sup>T</sup>	1,9 ± 0,4	1,4 ± 0,2	3,0 ± 0,9	4,0 ± 0,8	3,5 ± 0,5	5,6 ± 0,5	4,7 ± 0,4	5,7 ± 0,4
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 617 <sup>T</sup>	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	10,4 ± 1,3	15,3 ± 2,4	2,0 ± 0,7
<i>E. durans</i> CCDM 500 <sup>T</sup>	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,3
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 74 <sup>T</sup>	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	7,4 ± 1,2	3,5 ± 0,4	4,2 ± 0,8	3,6 ± 0,7	3,1 ± 0,6	5,6 ± 1,1

Při použití modelu obsahující mucin se již více přibližujeme reálnému prostředí ve střevech. Adheze probíhá rozdílným mechanismem a většina bakteriálních kmenů dobře adherujících na polystyren špatně adheruje na mucin a naopak. Při použití prebiotik/sacharidů zde ale vidíme také převažující negativní efekt a pokles adheze.

**Tabulka 3:** Výsledky adheze na tkáňové kultury. V tabulce jsou uvedeny hodnoty vyjádřeny v % adherovaných bakterií. Pomocí barev jsou odlišeny statisticky významné změny oproti blanku (skupina bez prebiotik/sacharidů) na hladině významnosti  $p = 0,05$ . Červeně je znázorněn pokles adheze a zeleně její vzestup.

Tkáňové kultury	GR	Syn.	P95	Vivinal	Lactose	Gluc.	Galac.	Blank
smetanová startovací kultura CCDM 17	2,9 ± 0,4	5,4 ± 0,8	2,8 ± 1,2	7,9 ± 0,9	6,2 ± 1,3	13,8 ± 0,8	10,9 ± 1,1	20,4 ± 1,4
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 731	11,5 ± 1,6	14,0 ± 1,5	32,8 ± 1,6	2,6 ± 1,2	2,4 ± 0,4	9,9 ± 0,6	11,1 ± 0,8	14,1 ± 1,4
<i>E. durans</i> CCDM 922A	3,5 ± 0,7	4,4 ± 1,9	6,2 ± 1,3	6,1 ± 1,8	7,3 ± 1,4	15,1 ± 1,4	14,7 ± 1,1	9,6 ± 1,2
<i>E. faecium</i> CCDM 945	26,0 ± 3,2	35,5 ± 4,6	35,6 ± 3,9	31,7 ± 3,7	29,6 ± 2,6	54,8 ± 4,2	80,3 ± 9,5	50,8 ± 3,6
<i>B. lactis</i> CCDM 94	1,0 ± 1,0	0,4 ± 0,3	1,0 ± 0,5	2,8 ± 0,8	1,2 ± 0,5	35,5 ± 2,4	41,1 ± 4,4	6,9 ± 0,5
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 150	13,0 ± 0,4	13,6 ± 0,6	39,2 ± 1,3	15,1 ± 1,4	13,0 ± 1,0	8,2 ± 0,6	10,3 ± 1,0	15,3 ± 1,6
<i>L. acidophilus</i> CCDM 151	2,2 ± 0,4	3,9 ± 0,5	3,9 ± 0,7	3,6 ± 0,7	3,8 ± 0,5	8,0 ± 0,7	17,0 ± 1,9	11,8 ± 1,5
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 289	1,0 ± 0,6	0,6 ± 0,1	1,5 ± 0,7	12,5 ± 2,2	4,3 ± 1,8	3,8 ± 0,5	5,6 ± 0,5	7,2 ± 2,7
<i>L. rhamnosus</i> CCDM 598 <sup>T</sup>	2,8 ± 0,5	1,2 ± 1,0	9,0 ± 0,8	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	3,4 ± 0,6	4,1 ± 1,0	11,6 ± 0,3
<i>L. acidophilus</i> CCDM 79 <sup>T</sup>	2,4 ± 0,6	2,1 ± 0,9	8,6 ± 2,6	8,6 ± 2,3	4,1 ± 1,3	8,9 ± 0,4	9,2 ± 0,5	8,2 ± 1,2
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 617 <sup>T</sup>	1,9 ± 0,7	1,2 ± 0,7	2,2 ± 0,7	1,1 ± 0,7	2,2 ± 0,3	12,7 ± 1,4	17,8 ± 1,3	2,5 ± 0,9
<i>E. durans</i> CCDM 500 <sup>T</sup>	0,7 ± 0,5	0,7 ± 0,6	5,3 ± 1,2	5,5 ± 0,9	4,0 ± 0,8	1,1 ± 0,5	1,8 ± 0,3	2,4 ± 0,6
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 74 <sup>T</sup>	0,4 ± 0,4	2,5 ± 0,6	9,2 ± 1,4	9,2 ± 0,8	5,5 ± 1,3	3,7 ± 0,6	3,0 ± 0,8	7,9 ± 0,8

Adheze na tkáňové kultury je nejvíce reálný model střevního prostředí. Použití buňky simulují epitel tlustého střeva a HT-29 MXT také konstantně produkuje mucin, který jej pokrývá. Vlastní adheze na TK je velmi různorodá, ale efekt prebiotik je zde také převážně negativní.

**Tabulka č. 4:** Poměr statisticky významného vzestupu/poklesu adherence probiotických kmenů při použití jednotlivých prebiotik z celkového množství 12 zkoumaných kmenů.

Prebiotikum	Polystyren	Mucin	Tkáňové kultury
<b>GR</b>	0/12	0/10	0/11
<b>Synergy</b>	0/12	3/9	0/11
<b>P95</b>	0/8	1/7	4/7
<b>Vivinal</b>	2/7	0/6	4/7

Z uvedeného je zřejmé, že pokud se soustředíme pouze na adhezi, má většina prebiotik výrazný inhibiční účinek. Tento trend byl pozorován také u jednoduchých

sacharidů v této souvislosti se nabízí konstatování, že z hlediska adheze, většina prebiotik negativně ovlivňuje interakci probiotik s povrchy epiteliálních buněk.

Jednou z příčin může být obsazení receptorů na povrchu buňky prebiotiky nebo změna nábojového rozložení na povrchu bakterie. Na rozdíl od prebiotik, ale jednotlivé sacharidy zvyšovali adhezi u více probiotických kmenů. Toto lze vysvětlit polymerním charakterem prebiotik, které blokují více receptorových míst. Dalším možným efektem je energetická náročnost samotného metabolismu prebiotik. Buňka nemůže uvolnit energii pouze glykolýze, ale nýbrž je nucena produkovat další sacharolytické enzymy. To může vést ke snížené produkci adhezínů a celkový posun energetické bilance směrem k produkci důležitých metabolických enzymů.

Jak již bylo uvedeno, použitá prebiotika tvořily GOS, inulin a oligofruktózy. GOS byly označeny jako „směs produktů enzymatické úpravy laktózy, které obsahují 2 až 8 sacharidových jednotek, z čehož jedna je terminální glukóza a zbývající galaktóza a disacharidy složené ze dvou jednotek galaktózy [114]. GOS je produkováno enzymatickou reakcí s  $\beta$ -glukosidázami a hydrolázami. Výsledné spektrum produktů se velmi liší v závislosti od použitých enzymů a reakčních podmínek. Výsledný produkt obsahuje směs různě dlouhých polymerů s vazbami  $\beta$  1 $\rightarrow$ 6,  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3 nebo  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4. Z toho důvodu je i fermentace střevní mikroflórou velmi různorodá a hraje v něm svoji roli extracelulárně produkováno směs enzymů. Právě nutnost sekrece těchto enzymů může být jedním ze znaků snížené adherence. Energetická potřeba je přednostně přesunuta na produkci těchto enzymů a tím může dojít ke snížení tvorby adhezínů.

Jako zástupce GOS zde byl v pokusech použit pouze Vivinal GOS, který je vyráběn s využitím enzymů *Bacillus circulans*, který transglykosyluje laktózu hlavně na  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 produkty [115]. Tento produkt obsahuje největší množství polymerů složených ze tří a ze dvou sacharidových jednotek (cca. 40 % suché hmoty). Větší polymerní řetězce se vyskytují přibližně ve 20 % případů. Bohužel tento produkt obsahuje také vysoké množství zbytkových mono a disacharidů (cca 40 %). Z toho důvodu bylo nutné provést také experiment na zbytkových jednoduchých sacharidech, konkrétně glukóze, galaktóze a sacharóze, v koncentracích běžně se vyskytujících v mléčných produktech. Při srovnání výsledků testu Vivinalu a laktózy a jejich vlivu na adherenci, je možné si všimnout velmi podobných změn adheze. Prakticky až na tři kmeny *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 289, *Bifidobacterium lactis* CCDM 94 a *Lactococcus lactis* subsp.

*lactis* CCDM 617<sup>T</sup> byl dopad na adherenci Vivinalu i laktózy téměř stejný. Při vyřazení těchto tří kmenů byla také nalezena korelace pomocí ANOVA testu. Je zjevné, že právě laktóza – měla po přidání Vivinalu velký vliv na výslednou adherenci probiotik. Další dva sacharidy – glukóza a galaktóza, které se také vyskytují v roztoku Vivinalu o poměrně vysoké koncentraci se odlišují již u vícero kmenů a jsou mnohem podobnější mezi sebou, než při srovnání s Vivinalem. Mezi nimi nebyla pozorována korelace ani při vynechání výše zmíněných kmenů.

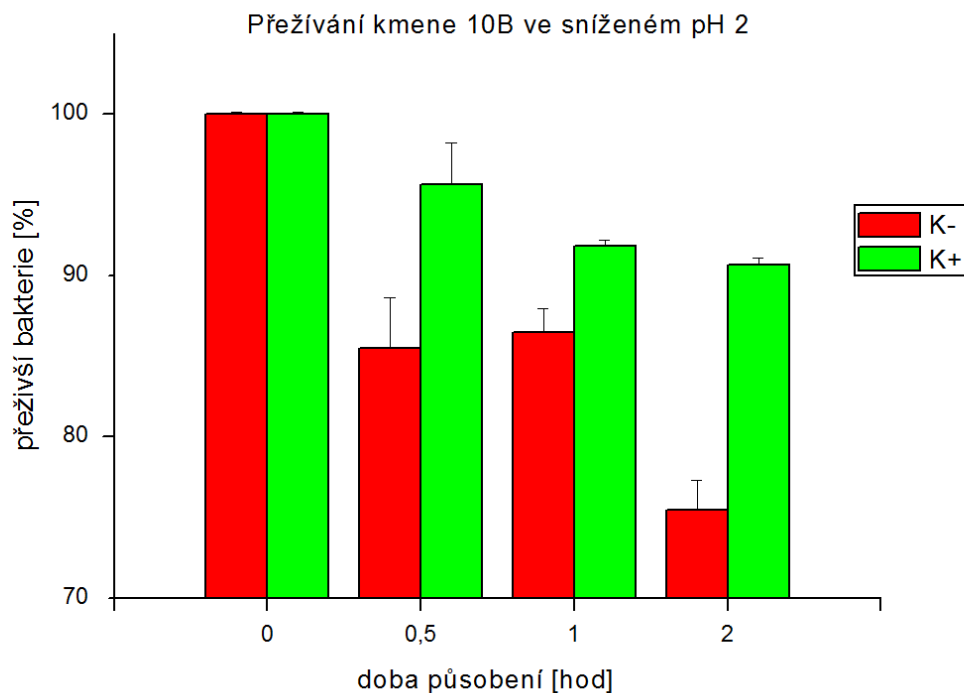
Zbývá použitá prebiotika byla tzv. inulinového typu, která se mohou dělit na inulin, oligofruktózu a FOS. FOS nebyly v tomto experimentu použity. Jako zástupce vivinalu bylo použito Orafti GR. Oligofruktózový typ prebiotika představuje Orafti P 95. Poslední použité prebiotikum Orafti Synergy je směs inulinu a oligofruktózy. Orafti GR je velmi mírně zpracovaný inulin izolovaný z čekanky a obsahuje velmi dlouhé řetězce s polymeračním stupněm až 60. Orafti P 95 je již částečně enzymaticky hydrolyzovaný inulin a maximální polymerační stupeň je okolo 20.

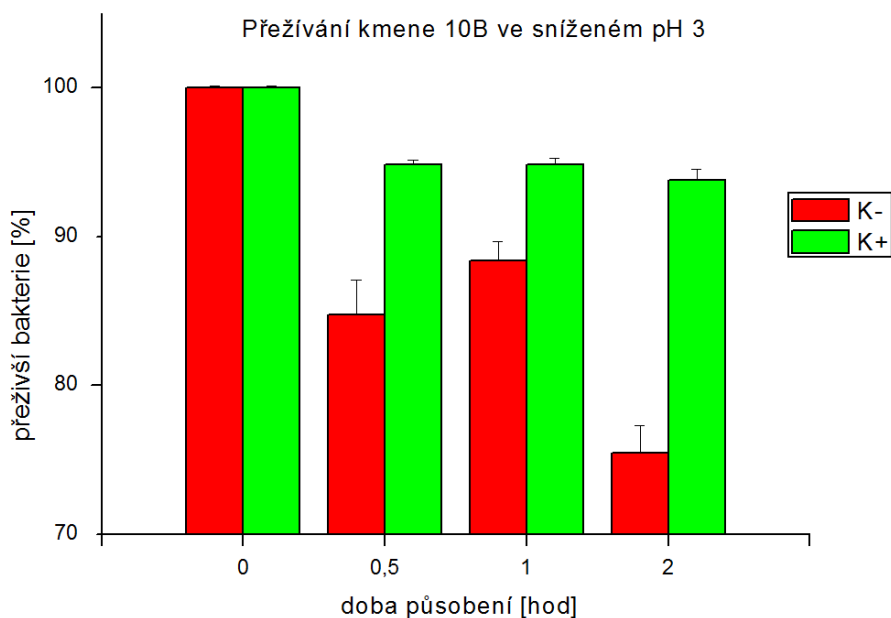
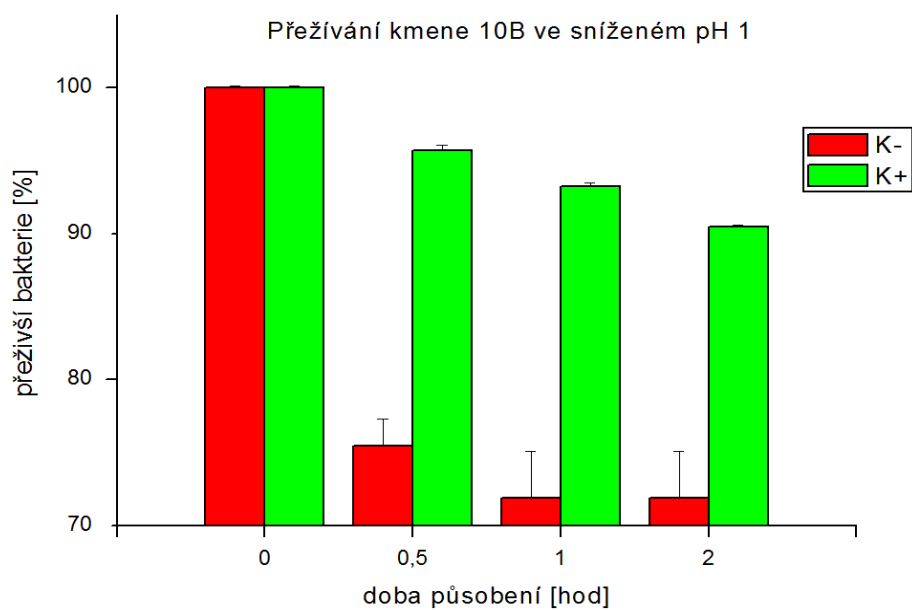
Vliv těchto tří prebiotik na adhezi je také převážně negativní. Schopnost adherence na polystyren byla snížena téměř u všech kmenů. Adherence na mucin byla posílena pouze u kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 nebo *Enterococcus durans* CCDM 922A v kombinaci s Synergy a *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 150 se Synergy nebo P 95. Schopnost adherence na tkáňové kultury byla posílena pouze u čtyř kmenů v kombinaci s P 95. Je tedy možné, že pro *in vivo* použití je vhodnější již určitým způsobem zpracovaný inulin. Prebiotikum Orafti GR má totiž vůbec nejhorší vliv na adhezi ze všech sledovaných prebiotik i sacharidů. To podporuje teorii o nutnosti buňky přeměrovat energii do metabolických procesů a totiž oslabení adheze v důsledky snížení proteosyntézy adhezinů.



## 5.2 Vliv biofilmového fenotypu na probiotické vlastnosti

Vliv biofilmu na přežívání kmene 10 B roztoku solí o nízkém pH. Při sledování vlivu fenotypového biofilmu na schopnost přežívání daného kmene v prostředí o nízkém pH byl zjištěn výrazný nárůst procenta přeživších bakterií. I po dvou hodinách inkubace v pH = 1 byla u biofilm pozitivního kmene pozorována stále více než 90 % viabilita, zatímco u biofilm negativního kmene již po této době viabilita klesala na 70 % (graf č.: 2 až 4 a tabulka č. 4). Tento rozdíl by potvrzen dvou výběrovým t-testem na hladině významnosti  $p = 0,05$ .

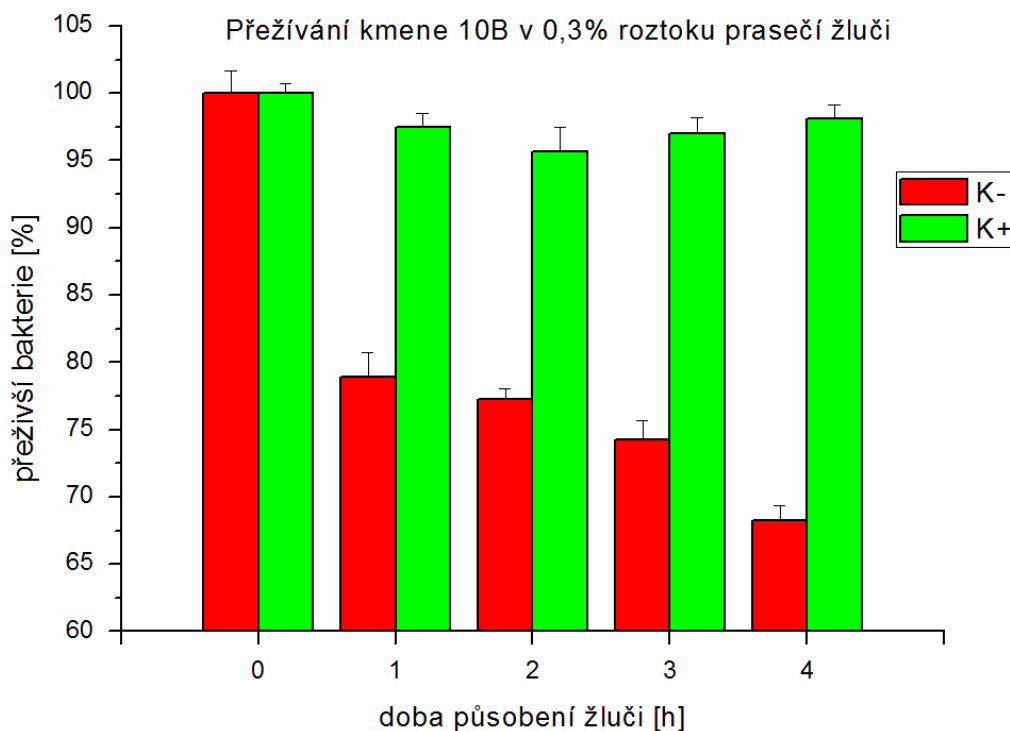




**Graf č. 2, 3 a 4:** Vliv sníženého pH na procento přeživších bakterií planktonických (K-) a biofilmových (K+) bakterií kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 (10B). Na ose y je procento viabilních bakterií po kultivaci ve sníženém pH a na ose x je uvedena doba kultivace.

### Vliv biofilmu na přežívání kmene 10B v roztoku žluči

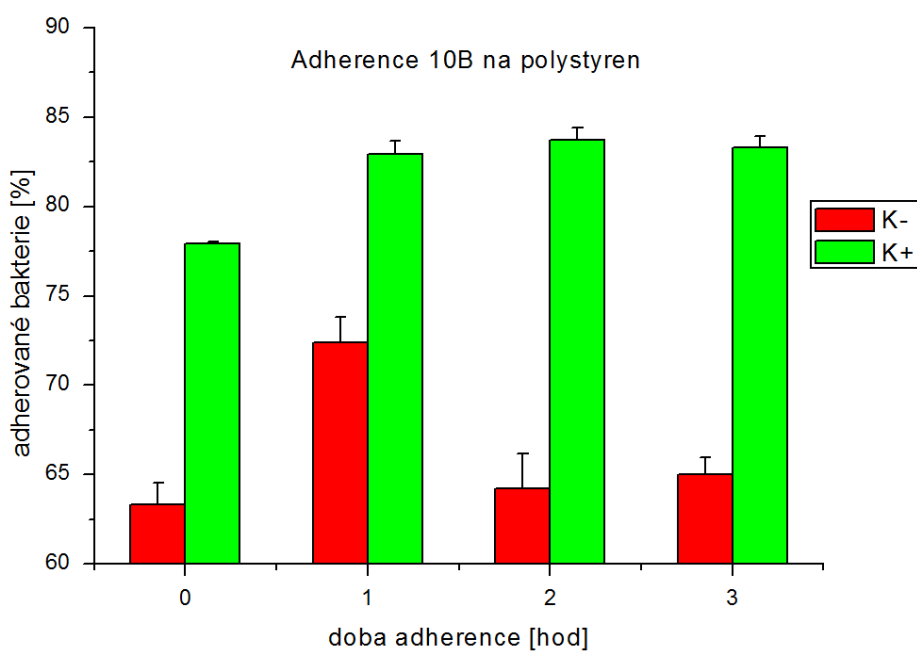
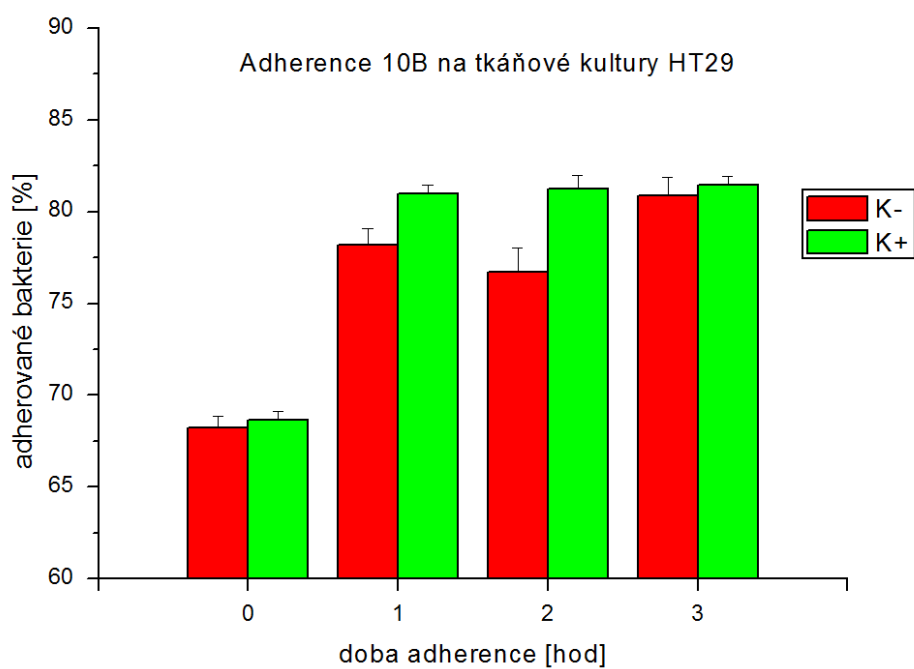
U kultivace v 0,3 % roztoku prasečí žluči byla pozorována také zvýšená odolnost biofilm pozitivního kmene i během 4-hodinové inkubace (Graf č. 5). Vyšší odolnost biofilmového kmene je znatelné a statisticky významné na hladině  $P = 0,05$



**Graf č. 5:** Procento přeživších bakterií kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 (10B). Na ose y je procento viabilních bakterií po kultivaci ve 0,3% prasečí žluči a na ose x je uvedena doba kultivace. (K+ probiotikum na biofilmu; K- planktonická forma)

### Vliv biofilmu na schopnost adherence kmene 10B na polystyren a na tkáňovou kulturu HT-29

Během testů adherence na polystyren a na tkáňovou kulturu HT-29 byl pozorován nárůst adherence pouze na polystyrenový substrát. Adherence na buněčnou kulturu HT-29 byla shodná s adherencí biofilm negativního kmene (viz. Graf č. 6 a 7)).



**Graf č. 6 a 7:** Procento adherovaných b bakterií kmene *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 (10B). Na ose y je procento adherovaných bakterií a na ose x je uvedena doba adherence na HT-29 a na polystyren – srovnání při použití biofilmu.

### Inhibice růstu vybraných patogenních kmenů

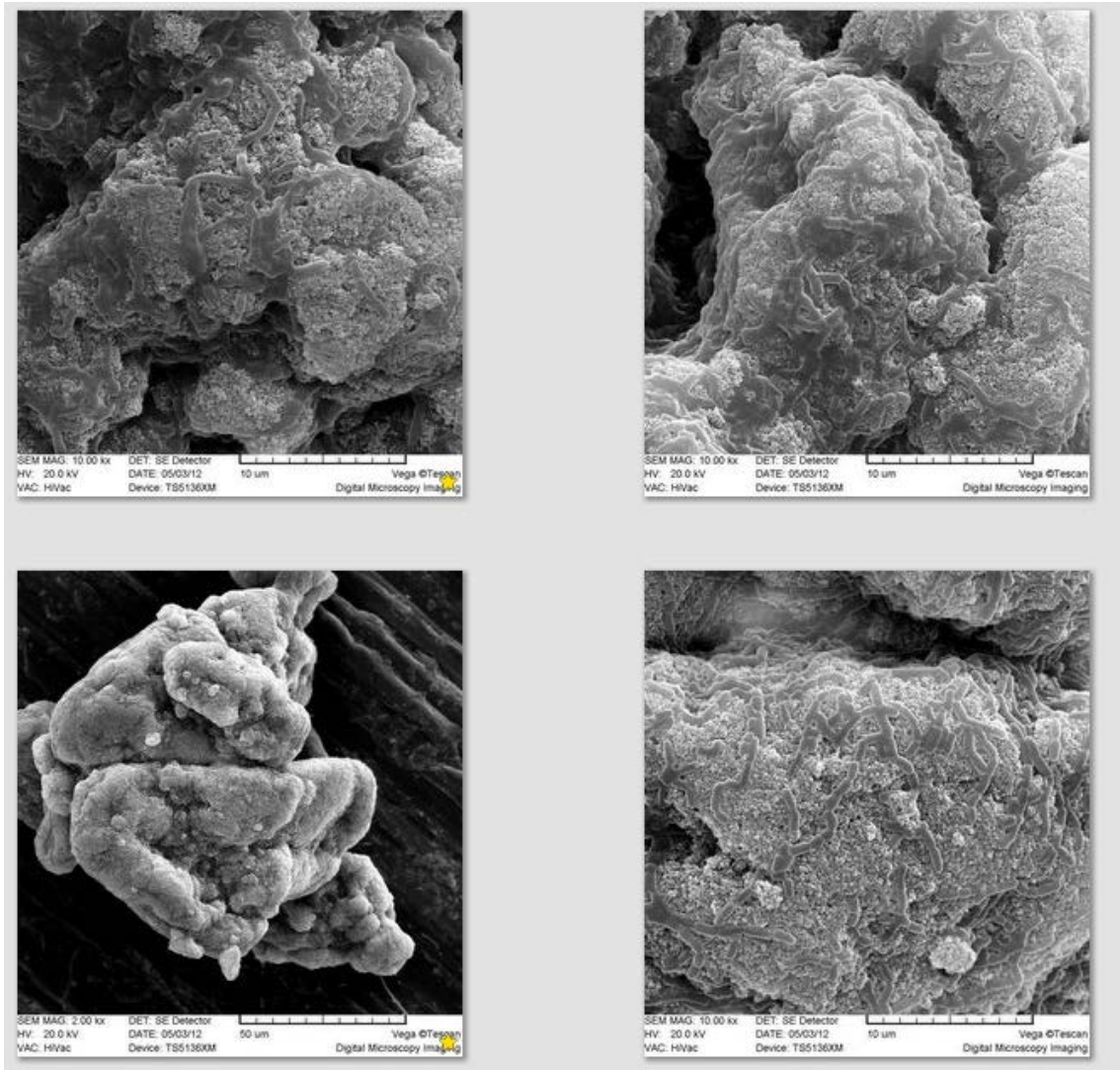
Při sledování inhibice růstu vybraných patogenů a oportunních patogenů byla pozorována zvýšená inhibice růstu *Escherichia coli* CCM 3988 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953 viabilními biofilm pozitivní buňkami kmene 10B.

**Tabulka č. 10:** Výsledky měření inhibice patogenních kmenů (S – senzitivita, R – rezistence, I – neurčitelnost). Je uvedena pozorovaná senzitivita nebo rezistence na agaru pokrytém patogenním kmenem s jamkami obsahující živé buňky nebo inaktivovaný lyzát.

Kmen	S/R/I			
	Živé buňky		Lyzát	
	bez biofilmu	s biofilmem	bez biofilmu	s biofilmem
<i>Listeria monocytogenes</i> HUB-3	S	I	R	R
<i>Clostridium sordelli</i> CCM 4611	S	S	R	R
<i>Escherichia coli</i> CCM 3988	I	S	I	I
<i>Shigella flexneri</i> HUB-9	R	R	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1960	R	R	R	R
<i>Salmonella</i> ser. enteritidis HUB-22	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	R	S	R	R
<i>Proteus vulgaris</i> CCM 1749	R	R	R	R
<i>Candida albicans</i> CCM 8269	R	R	R	R

## Nárůst biofilmu na částicích

Pro kontrolu kvality nárůstu biofilmu byla provedena elektronová mikroskopie, která prokázala nárůst vrstvy bakterií na použitých částicích.



**Obrázek č. 6:** Nárůst biofilmu na anorganických křemičitých částicích (technika SEM, zvětšení 10kx)

### 5.3 Flotace a její použití pro oddělení adherovaných a planktonických bakterií

#### Toxicita připravených FA na použité bakteriální kmeny

Výsledky testu toxicity připravených FA na přežívání kmene *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 i CCM 7221 jsou uvedeny v tabulce č. 12.

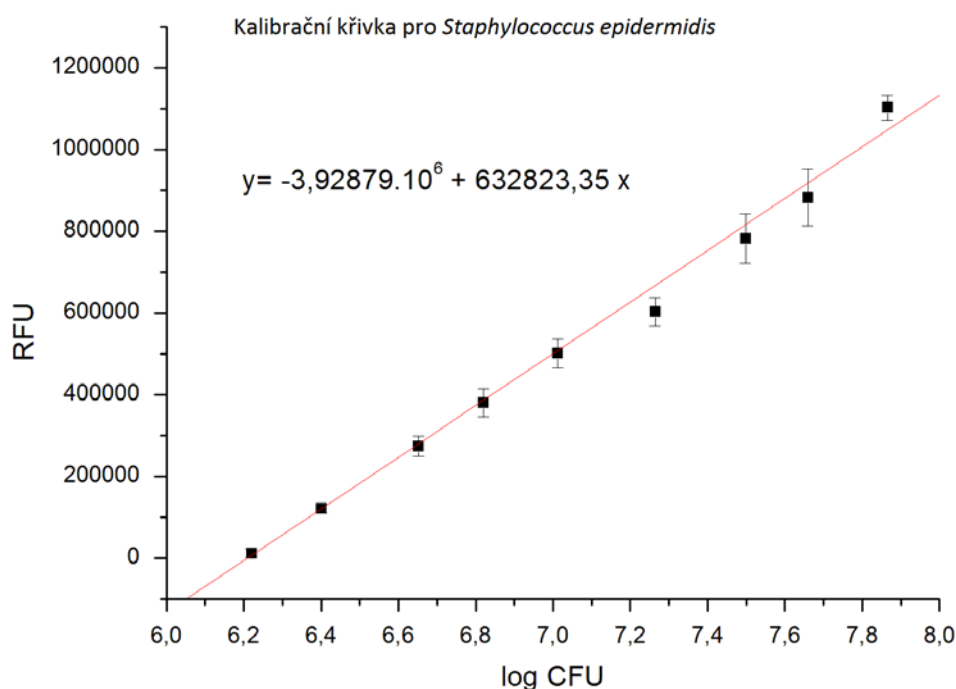
**Tabulka č. 12:** Toxicita využívaných FA na bakteriální kmen *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a CCM 7221 po 30 minutách expozice. Označení počtu živých bakterií: +++> 95%; ++>70%; - < 10 %

Flotační činidlo	koncentrace (g/L PBS)	hustota (g.ml <sup>-1</sup> )	CFU
Sacharóza	2000	1,23	+++
MgSO <sub>4</sub>	730	1,22	+++
CsCl	1000	1,57	+++
Polyethylenglycol	440	1,05	+++
PERCOLL	-	1,13	+++
Diatrizoát sodný	500	1,21	+++
Dextran	270	1,08	++
NaNO <sub>3</sub>	740	1,33	++
Ethylenglycol	-	1,14	-

Jak je z této tabulky patrné pouze ethylenglykol má pozorovatelný toxický vliv. Další použité FA jsou netoxická. Pouze Dextran a NaNO<sub>3</sub> způsobili pokles životaschopných bakterií na 70 %.

## Kalibrace fluorescence a fluorescenční detekce bakteriální adherence

Naměřená kalibrační křivka závislosti fluorescence na počtu CFU v jamce je znázorněna na grafu číslo 8. Lineární závislost byla pozorována od přibližně log 6 do log 8 CFU.



**Graf č. 8:** Kalibrační křivka závislosti fluorescence na počtu CFU obarveného kmene *Staphylococcus epidermidis*. Na ose y je uvedena relativní fluorescenční jednotka (RFU), která odpovídala přítomnému množství obarvených bakterií v jamce (osa x).

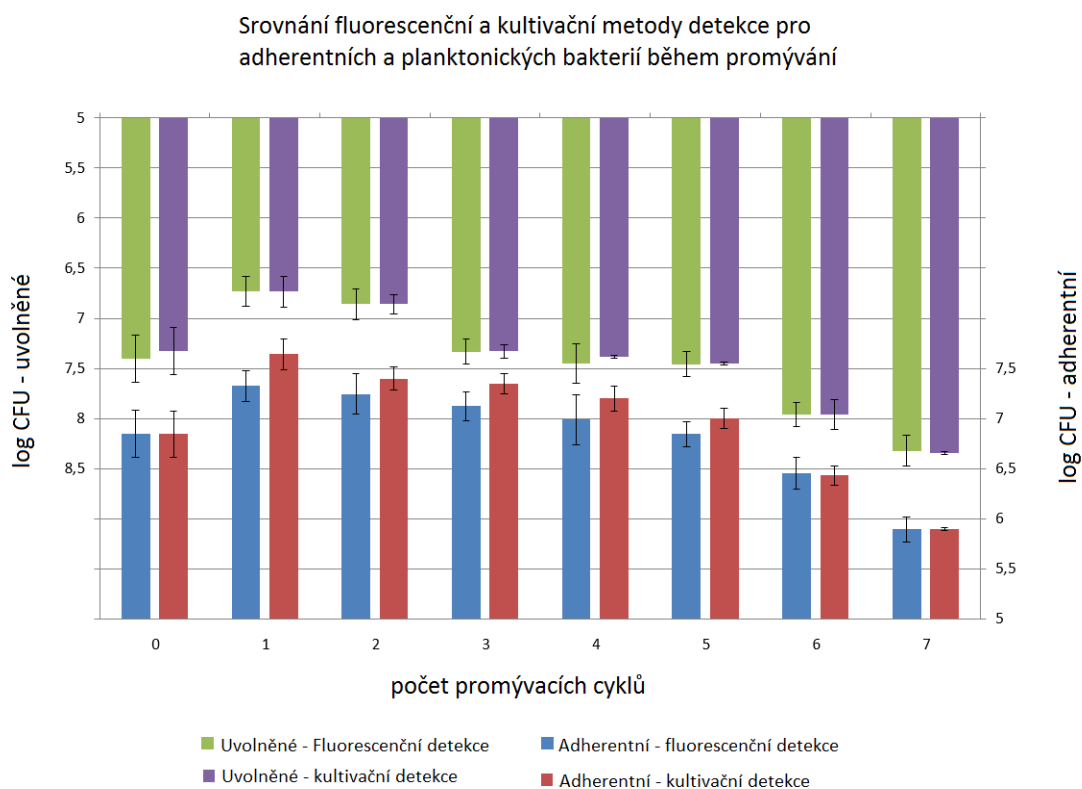
Flotační činidla CsCl, Sacharóza a PEG ovlivňovaly fluorescence vzorku v čase a nebyly proto vhodné pro využití v metodě adherence na mikrotitrační destičce, kde se fluorescence snímala Synergy 2 readerem. CsCl bylo ale použito v pokusu s laserovým skenovacím mikroskopem, kde byla fluorescence měřena bezprostředně po přidání vzorku a ovlivnění fluorescence tedy bylo minimální. Kromě CsCl žádné jiné flotační činidlo neumožnilo připravit takové široké rozmezí hustot.

## Detekce pomocí kultivace a pomocí fluorescence

Výsledky kultivace adherentních bakterií a z fluorescenční detekce pomocí fluorescenčního readeru jsou uvedeny v grafu č. 9. Rozdíl mezi fluorescenční detekcí a



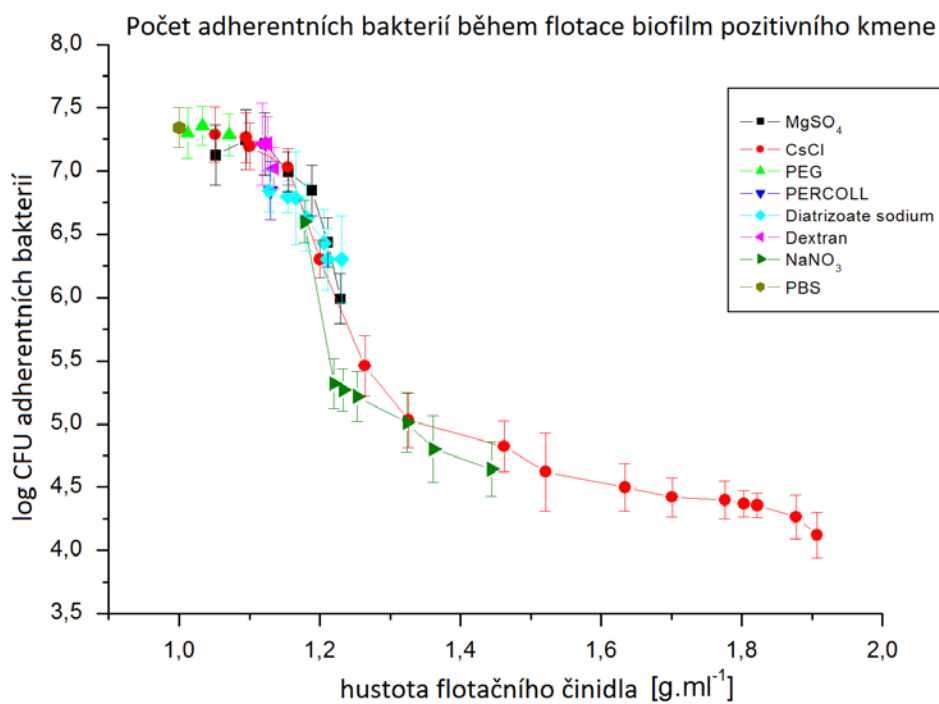
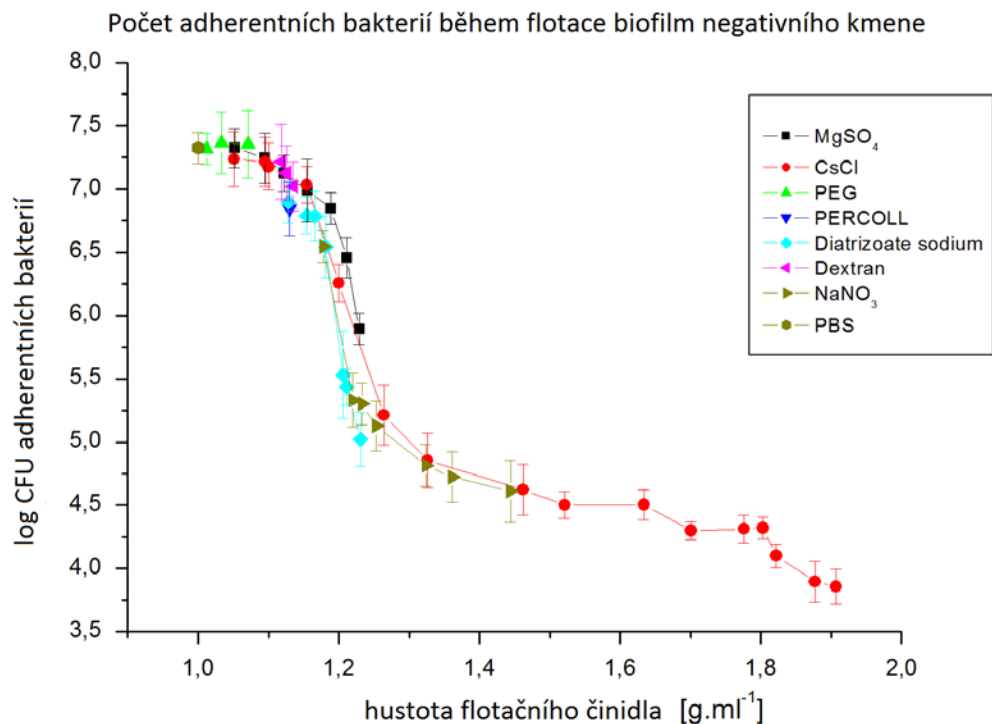
detekci kultivační metodou byl vyhodnocen pomocí, stanovení Studentova t-testu jako nevýznamný na hladině  $P=0,05$ . Směrodatná odchylka ve všech měřených fluorescenčních i kultivačních byla nižší než 10 % log CFU a také podíl adherentních a uvolněných bakterií vycházel v obou metodách velmi podobně. Bylo tedy potvrzeno, že metody kultivace i fluorescenční detekce jsou dostatečně přesné a opakovatelná pro další provedení experimentu.



**Graf č. 9:** Podíl adherentních a uvolněných bakterií kmene *Staphylococcus epidermidis*. Srovnání fluorescenční metody detekce a kultivace. V grafu jsou uvedeny log CFU naměřených adherentních bakterií (dole) a bakterií uvolněných (nahore) po určitém počtu promývacích cyklů. Během promývání se počet uvolnění stále zvyšuje, jsou tedy odmývány i adherentní a slabě adherentní bakterie.

### Srovnání různých flotačních činidel

Srovnání různých flotačních činidel bylo provedeno pomocí kombinace metod fluorescenční detekce a kultivace. V grafu číslo 10 jsou graficky znázorněny výsledky obou metod, kdy pro CFU větší než log 6 jsou použita fluorescenční data a pro CFU menší než 6 data z kultivační metody. Výjimku tvoří FA CsCl, sacharóza a PEG – tyto tři FA byla kvůli inhibici fluorescence vyhodnocena pouze kultivační metodou (viz graf 10 a 11).



**Graf č. 10 a 11:** Srovnání flotace biofilm pozitivních a biofilm negativních kmenů *Staphylococcus epidermidis*. V grafu jsou uvedeny naměřené počty log CFU adherentních bakterií v závislosti na hustotě použitého flotačního činidla. Různá flotační činidla jsou uvedena různou barvou.

Z grafického vyhodnocení je zřejmé, že dosažené výsledky se značně liší od výsledků promývání. Při zvyšování měrné hustoty použitých flotačních činidel nad 1,2 g.l<sup>-1</sup> docházelo k rapidnímu uvolňování adherentních bakterií do koncentrace přibližně 1,3g.l<sup>-1</sup>. Většina FA mají pouze omezenou rozpustnost a pouze CsCl mohlo být připraveno v celém rozmezí měrných hustot. Další flotační činidla jsou zde znázorněna v takovém rozmezí, jak to dovolila maximální možná rozpustnost daného FA.

### Srovnání FA a promývání

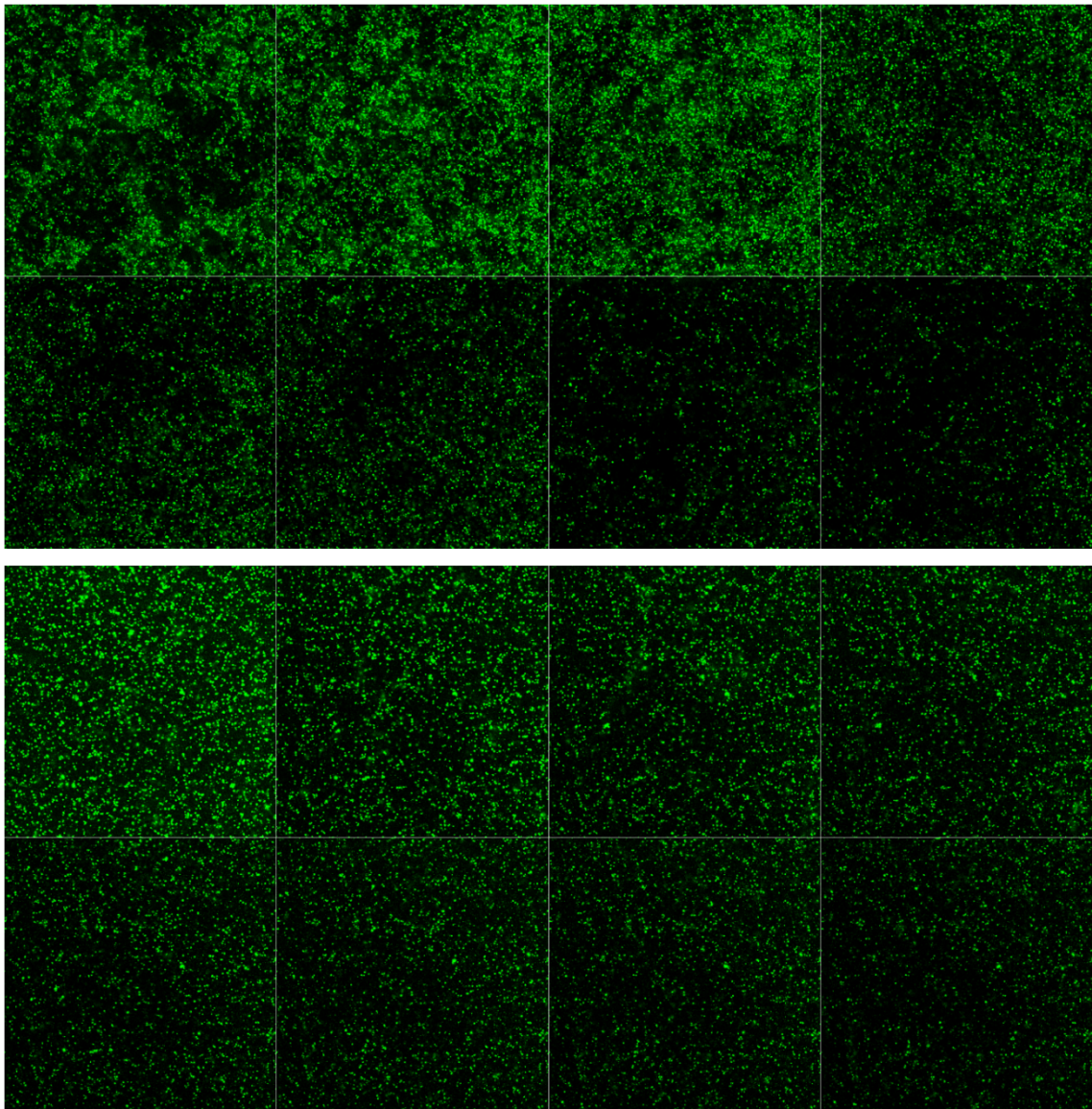
V tabulce č 13 jsou uvedeny srovnání log CFU při trojím promývání a flotaci pomocí FA s minimální hustotou 1,130 g.ml<sup>-1</sup>.

**Tabulka č 13:** Srovnání flotace a promývání. \* v tabulce jsou uvedeny hodnoty pro kmen *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418.

Flotační činidlo	minimální měrná hustota s pozorovaným flotačním účinkem [g.ml <sup>-1</sup> ]	Koncentrace FA [w/v]	Změna log CFU adherentních bakterií oproti trojímu promývání PBS*
Sacharóza	1,16	25%	+0,65
MgSO <sub>4</sub>	1,16-1,19	28 – 34 %	+0,90
CsCl	< 1,52	< 45 %	-1,57
Polyethylenglycol	nepozorovatelné	maximální použitá 33 %	+2,01
PERCOLL	1,13	-	+0,46
Diatrizoát sodný	1,13-1,18	18 – 25 %	+0,65
Dextran	1,14	23 %	+0,90
NaNO <sub>3</sub>	<1,18	< 9 %	-0,10

### Srovnání flotace a promývání pomocí LSCM

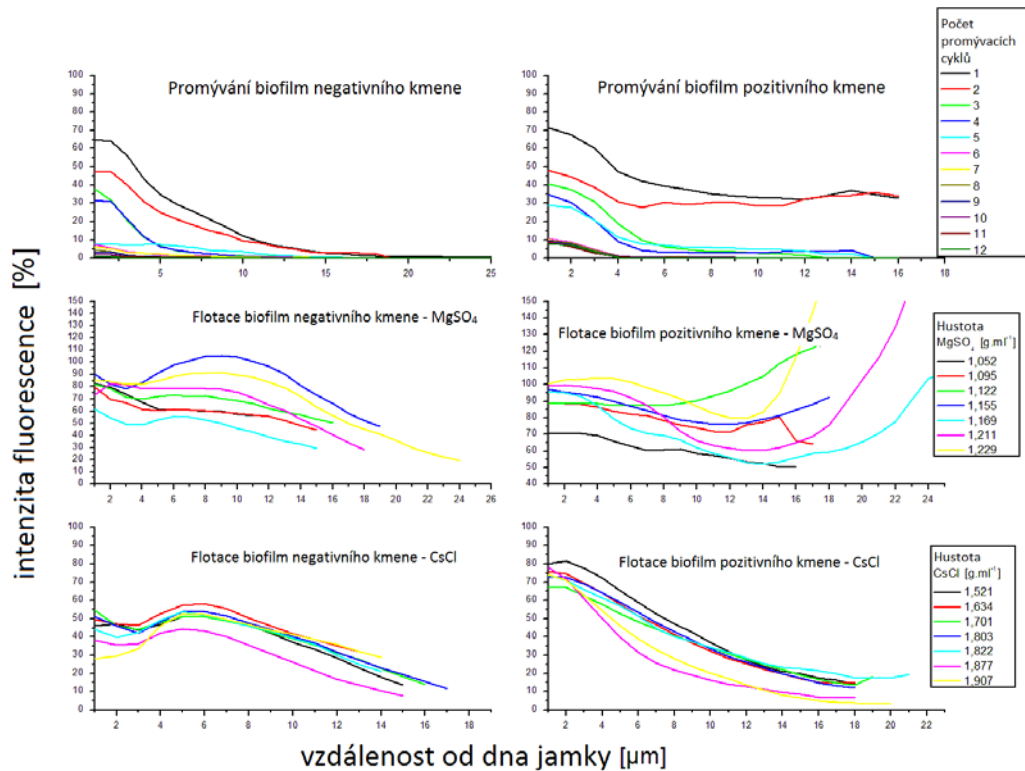
Během promývání byla pozorována signifikantní změna morfologie adherentních biofilm pozitivních i negativních kmenů.



**Obrázky č. 1 a 2:** Změna morfologie biofilm pozitivní (první dva řádky) a biofilm negativního kmene *Staphylococcus epidermidis* (spodní dva řádky). Je zde znázorněna série promývání 1 až 8 (zleva doprava a shora dolů).

Pomocí výpočtu fluorescenčních pixelů v obraze bylo zjištěno, že promývání i flotace biofilm pozitivních i biofilm negativních kmenů je velmi odlišná (viz. Grafy 12 až 17). Během promývání u biofilm pozitivního kmene dochází uvolnění masivních shluků biofilmu v horních strukturách a dochází ke kontinuálnímu uvolňování po dalších šest cyklů promývání. Následně je počet odtržených bakterií při každém dalším cyklu již přibližně vyrovnaný. U biofilm negativního kmene dochází ke kontinuálnímu

uvolňování po dobu prvních čtyř cyklů. Následuje skok v koncentraci bakterií na dně jamky a v dalších cyklech je zde přítomno již stálé množství bakterií.



**Grafy č. 12 až 17:** Změna fluorescence během promývání nebo flotace v různých vzdálenostech od dne jamky měřeno pomocí LSCM. Na ose y je intenzita fluorescence vyjádřena jako % barevných pixelů a na ose x je uvedena vzdálenost ode dna jamky. V horních dvou grafech je uveden výsledek po určitém počtu promývacích cyklů. Prostřední dva grafy ukazují výslednou fluorescenci po flotaci FA MgSO<sub>4</sub> o různých hustotách a spodní dva grafy znázorňují výsledek po flotaci CsCl o různých hustotách.

U flotace při použití flotačního činidla do hustoty 1,15 g.ml<sup>-1</sup> je hustota biofilmu přibližně stejná. Použitím roztoku o vyšší měrné hustotě než 1,30 g.ml<sup>-1</sup> způsobuje velmi výrazné odtrhávání buněk adherovaných na dně jamky.

## 6 Diskuze

### 6.1. Ovlivnění adhezivních vlastností probiotik přítomností některých prebiotik

Vztah mezi probiotiky a prebiotiky byl již definován v úvodním literárním přehledu. Jak vyplývá z obou definic a kritérií jejich funkce, prebiotika by měla zvyšovat funkční účinnost probiotik, případně dalších komponent střevní mikroflóry. Pokud se týče účinků na adhezi probiotik ke střevní sliznici, žádná z výše uvedených definic je neuvádí. Tato skutečnost však neznamená, že by jejich synergie i v tomto směru nebyla žádoucí. Pokud by některé s prebiotik podporovalo adhezi některého z probiotik ke střevnímu epitelu, tato interakce by významnou měrou přispívala k naplňování účinků očekávaných, od daného probiotika. Na druhé straně, pokud by některá prebiotika adhezi vybraných probiotických kmenů snižovala, mohla by rovněž snižovat jejich výsledné probiotické vlastnosti. Proto také jedním z cílů předkládané práce je zjištění do jaké míry běžně používaná prebiotika mohou ovlivňovat adhezivní vlastnosti nejčastějších probiotik.

Podle toho co bylo v literárním přehledu řečeno o charakteru interakce probiotických bakterií se strukturami na povrchu epiteliálních buněk, jedná se o vzájemnou vazbu hydrofobního typu mezi cukernými složkami obou povrchů [118]. Z tohoto hlediska přítomnost další cukerné složky (prebiotika) v místě interakce probiotické bakterie a střevního epitelu, by mohla mít rušivý interferující účinek.

V tomto ohledu prezentované výsledky oprávněnost výše uvedené obavy potvrdily. Ve většině vzájemných kombinací probiotika s některým z testovaných probiotik jejich vzájemná interakce vedla k útlumu adheze. Pokud hlouběji studujeme dosažené výsledky, můžeme pozorovat jisté, byť nevýrazné zákonitosti. Předně je to skutečnost, že prebiotikum Oraafti GRv jehož složení výrazně převažuje inulin, v žádné z kombinací adhezi nepodporovalo, ale přibližně ve čtvrtině případů ji naopak tlumilo, a to bez ohledu na povrch, na němž k interakci docházelo. Jen o málo lepší výsledek byl zaznamenán v případě prebiotika Oraafti Synergy 1, v jehož složení rovněž převládá inulin. V případě tohoto prebiotika byl synergický vztah obou reagujících složek zaznamenán pouze tehdy, uskutečnil-li se na povrch mucinového substrátu. Nicméně, i na něm byla adheze potencována jen ve třech kombinacích. Další prebiotika v nichž inulin nebyl přítomen, vykazovala poněkud příznivější výsledky. Oligofruktozové prebiotikum Oraafti P95 podpořilo adhezi některého z testovaných probiotických bakterií

celkem v pěti případech, přičemž se tak dělo nejčastěji na povrchu tkáňové kultury. Pro testovaná probiotika se jako nejvhodnější jevila interakce s převážně galaktooligosacharidovým prebiotikem Vivinal GOS, které podpořilo jejich adhezi nejčastěji a to zejména na povrch buněk tkáňové kultury. Za povšimnutí stojí předně skutečnost, že se tak ani jednou nestalo na povrchu pokrytém mucinem. Druhou skutečností, která stojí za povšimnutí je fakt, že obě neinulinová prebiotika vykazovala výrazně nižší výskyt případů v nichž jejich interakce s daným probiotikem vedla k potlačení adheze na některý z testovaných povrchů.

Vysvětlení popsaných výsledků je nutno zřejmě hledat v charakteru interakce mezi cukernými strukturami na povrchy bakterií a oligosacharidy glykoproteinů (glykocalix) nacházejících se na povrchu epiteliálních buněk. Přítomnost velkého množství dosud nenatravených oligosacharidů prebiotik ve střevním obsahu vytváří nadbytek „falešných cílů“ s nimiž mohou probiotické bakterie interagovat, aniž by pronikly k vlastnímu povrchu střevního epitelu. Tímto fyziologickým mechanismem chrání oligosacharidy mateřského mléka novorozence před infekcí některými patogenními mikroorganismy [119]. Tímto směrem je rovněž zaměřena většina prací, které se vzájemné interakce střevních bakterií a prebiotik týkají. Jsou většinou záměny právě na inhibici adheze patogenních bakterií na povrch střevního epitelu vytvořením nadbytku cukerných složek ve střevním obsahu [120; 121]. Pokud se týče opačného případu, kdy jsou hledány synergické efekty prebiotik a probiotických bakterií na jejich adhezi k povrchu střevních buněk, nejsou nám známy žádné podobné studie. Vzhledem k tomu, že jsou prebiotika zcela běžně přidávána k probiotickým kulturám bez ohledu na jejich možné interference, jsou podobné studie velmi žádoucí.

Vedle právě popsaného efektu, na inhibici adheze v přítomnosti nadbytku sacharidů, může se uplatnit i opačný typ oligosacharidové interakce, a to ten, že cukry prebiotika obsadí většinu receptorových míst na povrchu epiteliálních buněk a tak je blokují pro vazbu s bakteriemi. V každém případě předkládaná práce otevírá novou oblast výzkumu probiotik. Z výše uvedených výsledků rovněž vyplývá, že pro společné podávání probiotik a prebiotik neexistuje žádné univerzální pravidlo. Každou jejich kombinaci je nutno vyzkoušet na námi navržených modelech. Výslednou kombinaci je nutno ještě ověřit v podmínkách *in vivo* na zvířecím modelu.

Z testovaných kombinací prebiotik/probiotik byly pozorovány některé dvojice, u nichž došlo ke zvýšení adherence. V některých případech byl dokonce nárůst několikanásobný. Těmito dvojice je kombinace probiotik *Lactobacillus rhamonosus* CCDM 150, *Enterococcus durans* CCDM 500<sup>T</sup> a *Bifidobacterium animalis* CCDM 74<sup>T</sup> s prebiotiky P95 a Vivinalu. Tento vzrůst se nezdá být způsoben přítomností zbytkových sacharidů v obou preparátech, protože při použití těchto jednotlivých sacharidů byla adherence nezměněna nebo snížena. Tyto kmeny tyto tvoří vhodné kandidáty na synbiotické preparáty.

Shrnuto, je možné, že výsledné ovlivnění adheze je odpovědné několik efektů: (i) ovlivnění povrchu bakterie (změna náboje; blokace receptorů); (ii) nutnost produkce přídatných enzymů pro syntézu polymerů a zvýšená energetická zátěž bakterie; (iii) rozdílný osmotický tlak v roztoku o stejné koncentraci prebiotik a sacharidů. Kombinace těchto tří jevů má pravděpodobně největší účinek na pozorovanou změnu adherence. Dalším efektem by mohla být změna pH intenzivnější metabolickou aktivitou u jednoduchých sacharidů. Tento efekt byl ale inhibován použitím PBS.

## **6.2. Vliv biofilmového fenotypu vybraného bakteriálního kmene na jeho některé probiotické vlastnosti**

Dalším pokusem bylo zlepšení celkových probiotických vlastností pomocí použití biofilmového fenotypu zkoumaného probiotika *Lactobacillus acidophilus* CCDM 151 narostlého na Biofix K substrátu od Pharmaceutical biotechnologies, Česká republika. I když jsou již biofilmy velmi dlouho studovanou strukturou a bylo vydáno nespočet studií věnováno této problematice, jsou biofilmy skupiny probiotik stále přehlíženy. Z hlediska biofilmu jsou u probiotik studovány produkované látky, které brání formování biofilmu patogenů a potenciálních patogenů. Biofilmový fenotyp byl více odolný vůči působení nízkého pH i vůči solím žlučových kyselin. Přirozená odolnost biofilmu vůči rapidnějším podmínkám je již prokázána a výsledek tohoto experimentu jej pouze potvrzuje. Bakterie ve vnitřních vrstvách biofilmu jsou lépe chráněny před působením bakteriocidních podmínek. Hlavním mechanismem ochrany je tvorba EPS – extracelulárních polymerních substancí, které tvoří kolem bakterie ochranou „sít“. Hlavní složkou těchto substancí jsou extracelulární polysacharidy, které tvoří hlavní nosnou strukturu biofilmu. Další



produkované polymery strukturu zpevňují a dávají biofilmu výslednou „slizovitou“ charakteristiku.

Výsledek adherence na tkáňovou kulturu HT-29 již ale tímto fenotypem nebyl ovlivněn a biofilmová i planktonická forma adherovala naprosto stejně. Zvýšená adherence se u biofilmové formy projevila pouze na polystyrenu. To je pravděpodobně následkem zvýšené produkce adhezínů a dalších složek extracelulárního biofilmového matrix, které jsou známé svými schopnosti velmi intenzivně adherovat na polystyren. Z hlediska adheze je tedy možné konstatovat, že biofilmová forma probiotika neovlivňuje výrazně adhzi zkoumaného probiotika *Lactobacillus acidophilus* CCDM 151.

Další doplňkové testy biofilmového probiotika ukázali nezměněnou rezistenci na antibiotika a zvýšenou schopnost inhibice růstu potenciálních patogenů *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Escherichia coli* CCM 3988. Nezměněná rezistence biofilmového fenotypu k antibiotikům se sice odlišuje od pozorované zvýšené rezistence k biofilmům, ale je nutné mít na paměti schéma experimentu. Rezistence byla určena klasicky pomocí měření inhibičních zón na agarové plotně. Je tedy jisté, že k tvorbě biofilmu nedošlo a byla měřena rezistence obnovené planktonické formy biofilmového kmene, které byla stejná jako rezistence původního planktonického kmene.

Schopnost inhibice kmenů *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Escherichia coli* CCM 3988 byla prokázána pouze u živých buněk a je tedy výsledkem rozdílné kultivace biofilmové i fenotypové formy. Lyzát obou forem žádnou inhibici nevykazoval. Nejedná se tedy pravděpodobně o kontinuální produkci bakteriocinů daným kmenem.

Biofilmová kmene *Lactobacillus acidophilus* CCDM 151 tedy vykazovala zvýšenou schopnost adherence na polystyren a nezměněnou schopnost adherence na mucin a použitou tkáňovou kulturu HT-29. I když biofilmová forma probiotika vykazovala pouze zvýšenou schopnost inhibice dvou potenciálních kmenů, je vhodné doporučit biofilmovou formu pro další užívání i když nijak výrazně neovlivňuje vlastní schopnost adherence na polystyren. Kromě totiž již zkoumaných a zmíněných vlastností biofilmová forma ve vhodném preparátu (zde například použitý Biofix) slouží jako vhodný zásobník, který může kontinuálně uvolňovat volné planktonické formy bakterií do prostředí, do kterého byla biofilmová forma umístěna. Probiotický preparát v biofilmové formě je také možno připravit v mnohonásobně vyšší koncentraci než planktonické volné bakterie.

### 6.3. Metody pro průkaz adheze v polystyrenových mikroplotnách

Klasické metody sledování adheze u nových potenciálně probiotických kmenů jsou prováděny v mikrotitrační destičce potažené mucinem. Tento model je velmi jednoduchý a jeho využití dostatečně odpovídá střevnímu prostředí, kde se velmi často bakterie střevního prostředí dostávají pouze do kontaktu s mucinem. Další velmi často využívaná metoda je kultivace tkáňových kultur v mikrotitrační destičce, kde jsou velmi často využívány kultury caco-2 a HT-29, které jsou izolovány z karcinomu tlustého střeva [105]. Tento model není tak vhodný pro simulaci střevního prostředí, kvůli snížené dostupnosti povrchu epitelu ve střevním prostředí, kde je naprostá většina střevního epitelu pokryta mucinem. Model tkáňových kultur byl vylepšen použitím diferencovaných HT-29 MXT, které jsou schopny produkovat mucin [99]. Směsná kultura Caco-2 a HT-29 MXT potom v jamce fyziologicky dostatečně přesně simuluje povrch střevního epitelu.

Při využití všech výše zmíněných modelů, ale existuje velká nevýhoda během kvantifikace počtu adherovaných bakterií. Po uplynutí doby adherence je nutné oddělit adherované a planktonické bakterie, které je klasicky prováděno promýváním. Způsob promytí není přesně definován, je velmi nespecifický a výsledek velmi záleží na pozici špičky, síle proudu kapaliny a na celkové manuální zručnosti experimentátora. Dále má na výsledek vliv počet promývacích cyklů, protože s každým promytím je uvolněna část bakterií ze dna jamky a dochází také k uvolňování buněk tkáňové kultury [105].

Byla vyzkoušena tedy metoda flotace jako náhrada promývání. Flotace je metoda založená na oddělení materiálů v závislosti na jejich hustotě pomocí vhodného flotačního roztoku. Tato metoda je velmi využívána v metalurgii. V biologii byla doposud využita pro izolaci DNA, virů nebo částí buněk [116; 117]. Ale doposud nebyla flotace využita pro izolaci celých buněk. Hlavně protože přesný popis hustota mnoha bakteriálních kmenů není dostatečný a metody detekce hustoty vyžadují využití velmi nákladné a precizní instrumentace. Princip flotace spočívá ve využití hydrostatického tlaku flotačního činidla. Ten může být prezentován jednoduchou rovnicí

$$F_h = V_{\text{bac}} \cdot \rho_{\text{fr}} \cdot g \quad (1)$$

kde  $V_{\text{bac}}$  = objem bakterie,  $\rho_{\text{fr}}$  = je měrná hustota použitého flotačního roztoku a  $g$  je gravitační zrychlení. Tato hydrostatická síla ( $F_h$ ) nadnáší bakterie a zvyšuje se s

hustotou flotačního činidla. Opačným směrem působí gravitační síla a suma adherentních sil, které by se zjednodušeně dali vyjádřit jako:

$$F_g = V_{\text{bac}} \cdot \rho_{\text{bac}} \cdot g + A \quad (2)$$

kde  $\rho_{\text{bac}}$  = hustota bakterie a  $A$  = suma adherentních sil. Pokud tedy bakterie po použití flotačního činidla flotuje k hladině dají se tyto dvě rovnice vyjádřit jako:

$$F_h > F_g \quad (3)$$

$$V_{\text{bac}} \cdot \rho_{\text{fr}} \cdot g > V_{\text{bac}} \cdot \rho_{\text{bac}} \cdot g + A \quad (4)$$

$$\rho_{\text{fr}} / \rho_{\text{bac}} > A \quad (5)$$

Pokud hustotu bakterie známe nebo ji dokážeme odhadnout z flotace planktonické formy je možné využít tuto jednoduchou rovnici pro určení celkové sumy adherentních sil působících na bakterii.

Aby tento pokus byl realizovatelný, bylo nutné najít flotační činidlo, které musí splňovat několik kritérií: (i) vysoká molekulární hmotnost, která je nutná ro co nejmenší působení osmotického tlaku; (ii) nízká viskozita roztoku, která velmi výrazně ovlivňuje čas nutný pro separaci adherentních a planktonických forem bakterií; (iii) dostatečná rozpustnost pro možnost přípravy vysoce koncentrovaných roztoků, (iv) nízká toxicita a v neposlední řadě (v) dobrá dostupnost. Podle zvoleného postupu je možné vznést další požadavky: například neovlivnění fluorescence etc.

Bylo otestováno tedy 9 různých chemikálií pro detekci vhodného flotačního činidla. První série testů proběhla kombinací fluorescenční detekce readerem Synergy 2 a kultivační metodou (byla pozorována korelace těchto dvou metod). Z té bylo zjištěno, že flotace působí rozdílně než promývání. Zatímco promývání prakticky kontinuálně vymývá i adherované bakterie tak flotace vykazuje sinusoidní křivku závislosti hustoty na počtu adherovaných bakterií. Při použití nižší koncentrace je nedochází k odstranění adherovaných bakterií a až při měrných hustotách 1,2 až 1,4 g.ml<sup>-1</sup> dochází k prudkému poklesu adherovaných bakterií. Při vyšších hustotách je koncentrace adherovaných bakterií zase stálá a již se nemění. Podobné výsledky byly získány i při pozorování efektu flotace pomocí LSCM. Flotace, dle zvolené hustoty, odtrhává určitou část adherentních bakterií, ale na zbylé působí protektivně a chrání je před dalším stresem. Také nebylo pozorováno kontinuální uvolňování z povrchu. Další velkou výhodou je jednokrokovost uvedeného postupu.

Z použitých FA se jako nejvhodnější se zdá použití  $\text{MgSO}_4$ , dextransu nebo PERCOLLu. Pokud není nutná fluorescenční detekce, nebo pokud je detekce provedena bezprostředně po přidání FA je možné využít i CsCl, které má velkou výhodou možnost přípravy širokého gradientu hustot. I když je efekt a finální účinek rozdílný od použití promývání jsou tyto výsledky opakovatelné a dávají i určitou představu o fyzikální síle adherovaných bakterií.

Nevýhodou použití flotace je přítomnost flotačního činidla ve vzorku po oddělení planktonických bakterií. Odstranění FA se vzorku je téměř nemožné, protože by muselo být použito promývání, které zase nespecificky naruší vrstvu adherovaných bakterií.

## 7 Závěr

Bylo zjištěno, že adherence probiotik je výrazně ovlivněna přítomností prebiotik, a že tato změna není způsobena pouze přítomností zbytkových sacharidů v preparátech. Ve většině případů převládá účinek inhibiční. Pouze kombinace probiotik (*Lactobacillus rhamnosus* CCDM 150, *Enterococcus durans* CCDM 500<sup>T</sup> a *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* CCDM 74<sup>T</sup>) se dvěma prebiotiky (P95 nebo Vivinal) vykazují zvýšenou schopnost adheze. Tyto kombinace jsou proto potenciálními kandidáty pro využití jako synbiotika.

Biofilmový fenotyp zkoumaného kmene *Lactobacillus acidophilus* CCDM 151 prokázal zlepšení některých probiotických vlastností jako je přežívání v nízkém pH, solích žlučových kyselin a inhibice růstu *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Escherichia coli* CCM 3988. Zvýšení adheze bylo pozorováno pouze na polystyrenový substrát a nikoliv na tkáňové kultury.

Probiotikum narostlé na biofilmu je odolnější ( $\alpha=0,05$ ) než probiotikum planktonické při působení roztoku solí o sníženém pH 1 a vůči 0,3% roztoku prasečí žluči. Při působení roztoku o pH 2 je probiotikum na biofilmu odolnější při době působení delší než je 0,5 hodiny. U roztoku o pH 3 zajišťuje biofilm ochranu před působením v časech 0,5 a 2 hodiny. Při působení 1 hodinu vykazuje i planktonická forma kmene 10B určitou formu adaptace.

Během pokusů byla pozorována velká variabilita v metodikách promývání a byla provedena optimalizace experimentů, která eliminovala chyby při odstraňování neadherovaných bakterií (pozice špičky, síla proudu kapaliny, odsávání). Proto byla navrhnutá metoda flotace, které využívá vysokohustotní roztoky flotačních činidel pro oddělení planktonických a adherentních bakterií. Z devíti vyzkoušených flotačních činidel se nejlépe osvědčila  $MgSO_4$ , PERCOLL, diatrizoát sodný a i přes inhibici fluorescence – CsCl, Metoda flotace je velmi účinná a pomocí hustoty použitého FA lze velmi citlivě oddělit adherentní bakterie od planktonických. Tato metoda by mohla najít uplatnění i v jiných oborech, kde je nutné oddělit neadherované bakterie.

Za hlavní přínos předkládané práce považuji skutečnost, že, dříve předpokládaná synergie mezi prebiotiky a probiotiky není nejen samozřejmá, ale spíše vzácná. Vzniká proto potřeba případnou synergii hledat a testovat. Metodická část této práce nabízí jednoduchý postup, jak v širokém široké spektru vzájemných kombinací, ji relativně snadno a levně nalézat. Na základě této práce byly publikovány čtyři texty, dva z toho v impaktovaném zahraničním časopisu.

## 8 Reference

V práci jsou vloženy plné, publikované i doposud nepublikované texty autora, které byly vytvořeny a následně publikovány na základě této disertační práce. Níže je uveden seznam, kde je použita citace, a odkazy na originální článek v příloze.

Použité/vzniklé texty:

- Krejčí M., Kadlec R., Krejčí J. Význam probiotik ve výživě a v prevenci střevních onemocnění zvířat. *Veterinářství* 2013;63:11-14.

Citováno v kapitole 1 - Úvod, - probiotika; Originál v příloze 1

- Kadlec R., Microbial biofilm and its impact on animal health, nutrition and breeding; Conference proceedings, konference - Vliv výrobních faktorů a welfare na zdraví a plodnost dojnic a kvalitu a bezpečnost mléka jako potravinové; 2006, Rapotín, Czech Republic, p. 42

Citováno v kapitole 1 - Úvod, - biofilm; Originál v příloze 2

- Kadlec R., Křížová L., Halová D., In Vitro modely adherence probiotik, *Mlékařské listy* č. 124, 2011

Citováno v kapitole 1 - Úvod, - adherence; Originál v příloze 3

- Kadlec R., Jakubec M., Ryšávková P., Vliv kultivace kmene *Lactobacillus acidophilus* ve formě biofilmu na probiotické vlastnosti (v přípravě)

Citováno v kapitole 4 a 5; Originál v příloze 4

- Kadlec R., Jakubec M., Jaglič Z., A novel flotation technique for the separation of nonadherent micro-organisms from a substrate. *Letters in Applied Microbiology*. 2014, vol. 58, issue 6, s. 604-609

Citováno v kapitole 4 a 5; Originál v příloze 5

- Kadlec R., Jakubec M., The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science*. 2014, vol. 97, issue 4, s. 1983-1990

Citováno v kapitole 4 a 5; Originál v příloze 6

- [1] R. Fuller, PROBIOTICS IN MAN AND ANIMALS. *Journal of Applied Bacteriology* 66 (1989) 365-378.
- [2] H. Vondrušková, Z. Zralý, M. Trčková, R. Slámová, T. Baňoch, and M. Svoboda, Neantibiotické stimulatory růstu 2. část. *Veterinářství* 60 (2010) 411-415.
- [3] M. Svoboda, Z. Zralý, M. Trčková, R. Slámová, T. Baňoch, and H. Vondrušková, Neantibiotické stimulatory růstu. *Veterinářství* 60 (2010) 166-170.
- [4] S.M. Fox, PROBIOTICS - INTESTINAL INOCULANTS FOR PRODUCTION ANIMALS. *Veterinary Medicine* 83 (1988) 806-&.
- [5] H. Tlaskalova-Hogenova, R. Stepankova, T. Hudcovic, L. Tuckova, B. Cukrowska, R. Lodinova-Zadnikova, H. Kozakova, P. Rossmann, J. Bartova, D. Sokol, D.P. Funda, D. Borovska, Z. Rehakova, J. Sinkora, J. Hofman, P. Drastich, and A. Kokesova, Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters* 93 (2004) 97-108.
- [6] G.C. Mead, Prospects for 'competitive exclusion' treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *Veterinary Journal* 159 (2000) 111-123.
- [7] D.C. Savage, Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientists. *Curr Issues Intest Microbiol* 2 (2001) 1-15.
- [8] R. Nemcova, Kriteria pro výběr laktobacilů pro probiotické účely. *Vet Med* 42 (1997) 19-27.
- [9] B. Dugas, A. Mercenier, I. Lenoir-Wijnkoop, C. Arnaud, N. Dugas, and E. Postaire, Immunity and probiotics. *Immunology Today* 20 (1999) 387-390.
- [10] E. Isolauri, Probiotics in human disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (2001) 1142S-1146S.
- [11] M. Drakes, T. Blanchard, and S. Czinn, Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infection and Immunity* 72 (2004) 3299-3309.
- [12] S. Parvez, K.A. Malik, S.A. Kang, and H.Y. Kim, Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100 (2006) 1171-1185.
- [13] M.S. Geier, L.L. Mikkelsen, V.A. Torok, G.E. Allison, C.G. Olnood, M. Boulianne, R.J. Hughes, and M. Choct, Comparison of alternatives to in-feed antimicrobials for the prevention of clinical necrotic enteritis. *Journal of Applied Microbiology* 109 (2010) 1329-1338.
- [14] R.M. La Ragione, A. Narbad, M.J. Gasson, and M.J. Woodward, In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Letters in Applied Microbiology* 38 (2004) 197-205.
- [15] Y. Ohashi, and K. Ushida, Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal* 80 (2009) 361-371.
- [16] J.P. Lallès, P. Bosi, H. Smidt, and C.R. Stokes, Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc Nutr Soc* 66 (2007) 260-8.
- [17] A. Zeyner, and E. Boldt, Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90 (2006) 25-31.
- [18] G.R. Gibson, and M.B. Roberfroid, DIETARY MODULATION OF THE HUMAN COLONIC MICROBIOTA - INTRODUCING THE CONCEPT OF PREBIOTICS. *Journal of Nutrition* 125 (1995) 1401-1412.
- [19] M. Roberfroid, Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition* 137 (2007) 830S-837S.
- [20] F. Depeint, G. Tzortzis, J. Vulevic, K. I'Anson, and G.R. Gibson, Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic



activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition* 87 (2008) 785-791.

[21] A. Franck, Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87 (2002) S287-S291.

[22] C. Cherbut, Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *British Journal of Nutrition* 87 (2002) S159-S162.

[23] M.B. Roberfroid, J.A.E. Van Loo, and G.R. Gibson, The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition* 128 (1998) 11-19.

[24] M.A. Levrat, C. Remesy, and C. Demigne, HIGH PROPIONIC-ACID FERMENTATIONS AND MINERAL ACCUMULATION IN THE CECUM OF RATS ADAPTED TO DIFFERENT LEVELS OF INULIN. *Journal of Nutrition* 121 (1991) 1730-1737.

[25] J.M. Campbell, G.C. Fahey, and B.W. Wolf, Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition* 127 (1997) 130-136.

[26] B. Kleessen, L. Hartmann, and M. Blaut, Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition* 86 (2001) 291-300.

[27] R.G. Crittenden, and M.J. Playne, Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 7 (1996) 353-361.

[28] I.R. Rowland, and R. Tanaka, THE EFFECTS OF TRANSGALACTOSYLATED OLIGOSACCHARIDES ON GUT FLORA METABOLISM IN RATS ASSOCIATED WITH A HUMAN FECAL MICROFLORA. *Journal of Applied Bacteriology* 74 (1993) 667-674.

[29] Y. Bouhnik, B. Flourie, L. DagayAbensour, P. Pochart, G. Gramet, M. Durand, and J.C. Rambaud, Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *Journal of Nutrition* 127 (1997) 444-448.

[30] M. Ito, M. Kimura, Y. Deguchi, A. Miyamoriwatabe, T. Yajima, and T. Kan, EFFECTS OF TRANSGALACTOSYLATED DISACCHARIDES ON THE HUMAN INTESTINAL MICROFLORA AND THEIR METABOLISM. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 39 (1993) 279-288.

[31] G. Boehm, M. Lidestri, P. Casetta, J. Jelinek, F. Negretti, B. Stahl, and A. Marini, Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Archives of Disease in Childhood* 86 (2002) 178-181.

[32] G. Moro, I. Minoli, M. Mosca, S. Fanaro, J. Jelinek, B. Stahl, and G. Boehm, Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 34 (2002) 291-295.

[33] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D. Debeer, D. Caldwell, D. Korber, and G. James, BIOFILMS, THE CUSTOMIZED MICRONICHE. *Journal of Bacteriology* 176 (1994) 2137-2142.

[34] J.W. Costerton, P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284 (1999) 1318-1322.

[35] H.C. Flemming, and J. Wingender, The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8 (2010) 623-633.

[36] B. Frolund, R. Palmgren, K. Keiding, and P.H. Nielsen, Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30 (1996) 1749-1758.

- [37] X. Zogaj, M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, and U. Romling, The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology* 39 (2001) 1452-1463.
- [38] J. Wingender, M. Strathmann, A. Rode, A. Leis, and H.C. Flemming, Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Growth in Biofilms, Pt a: Developmental and Molecular Biological Aspects* 336 (2001) 302-314.
- [39] D. Debeer, P. Stoodley, F. Roe, and Z. Lewandowski, EFFECTS OF BIOFILM STRUCTURES ON OXYGEN DISTRIBUTION AND MASS-TRANSPORT. *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994) 1131-1138.
- [40] A. Conrad, M. Kontro, M.M. Keinanen, A. Cadoret, P. Faure, L. Mansuy-Huault, and J.C. Block, Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 38 (2003) 1093-1105.
- [41] S. Molin, and T. Tolker-Nielsen, Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (2003) 255-261.
- [42] C. Leck, and E.K. Bigg, Biogenic particles in the surface microlayer and overlying atmosphere in the central Arctic Ocean during summer. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* 57 (2005) 305-316.
- [43] B. Bansal, and X.D. Chen, A critical review of milk fouling in heat exchangers. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5 (2006) 27-33.
- [44] P.B. Eckburg, E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson, and D.A. Relman, Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308 (2005) 1635-1638.
- [45] K.C. Marshall, and R.H. Cruickshank, Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces. *Archives of Microbiology* 91 (1973) 29-40.
- [46] B. Henderson, S. Nair, J. Pallas, and M.A. Williams, Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. *Fems Microbiology Reviews* 35 (2011) 147-200.
- [47] K.C. Marshall, ADHESION OF MARINE-BACTERIA - A CITATION-CLASSIC COMMENTARY ON MECHANISM OF THE INITIAL EVENTS IN THE SORPTION OF MARINE-BACTERIA TO SURFACES BY MARSHALL,K.C., STOUT,R., AND MITCHELL,R. *Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences* (1992) 8-8.
- [48] B. Carpentier, and O. Cerf, BIOFILMS AND THEIR CONSEQUENCES, WITH PARTICULAR REFERENCE TO HYGIENE IN THE FOOD-INDUSTRY. *Journal of Applied Bacteriology* 75 (1993) 499-511.
- [49] E.J.W. Verwey, Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry* 51 (1947) 631-636.
- [50] C.J. Van Oss, R.J. Good, and M.K. Chaudhury, The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 111 (1986) 378-390.
- [51] C.J. van Oss, M.K. Chaudhury, and R.J. Good, Monopolar surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 28 (1987) 35-64.
- [52] M.N. Bellon-Fontaine, N. Mozes, H.C. van der Mei, J. Sjollem, O. Cerf, P.G. Rouxhet, and H.J. Busscher, A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophys* 17 (1990) 93-106.

- [53] G. Procházková, V. Jirků, L. Bartovská, and T. Brányik, POUŽITÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH NÁSTROJŮ PRO PREDIKCI MIKROBIÁLNÍ ADHEZE, *Chemické listy*, 2011, pp. 856-863.
- [54] N. Mozes, and P.G. Rouxhet, METHODS FOR MEASURING HYDROPHOBICITY OF MICROORGANISMS. *Journal of Microbiological Methods* 6 (1987) 99-112.
- [55] R. Pankov, and K.M. Yamada, Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 115 (2002) 3861-3863.
- [56] J.M. Patti, B.L. Allen, M.J. McGavin, and M. Hook, MSCRAMM-MEDIATED ADHERENCE OF MICROORGANISMS TO HOST TISSUES. *Annual Review of Microbiology* 48 (1994) 585-617.
- [57] C. Chagnot, A. Listrat, T. Astruc, and M. Desvaux, Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. *Cellular Microbiology* 14 (2012) 1687-1696.
- [58] H. Sandig, J. McDonald, J. Gilmour, M. Arno, T.H. Lee, and D.J. Cousins, Fibronectin is a TH1-specific molecule in human subjects, *J Allergy Clin Immunol*, United States, 2009, pp. 528-35, 535 e1-5.
- [59] U. Schwarz-Linek, M. Hook, and J.R. Potts, Fibronectin-binding proteins of Gram-positive cocci. *Microbes and Infection* 8 (2006) 2291-2298.
- [60] S.J. Peacock, T.J. Foster, B.J. Cameron, and A.R. Berendt, Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology-Uk* 145 (1999) 3477-3486.
- [61] R.J. Williams, B. Henderson, and S.P. Nair, *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins A and B possess a second fibronectin binding region that may have biological relevance to bone tissues. *Calcified Tissue International* 70 (2002) 416-421.
- [62] F.D. Lowy, J. Fant, L.L. Higgins, S.K. Ogawa, and V.B. Hatcher, STAPHYLOCOCCUS-AUREUS - HUMAN-ENDOTHELIAL CELL-INTERACTIONS. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 98 (1988) 137-146.
- [63] I. Nuzzo, M.R. Sanges, A. Folgore, and C.R. Carratelli, Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 27 (2000) 235-240.
- [64] S. Ahmed, S. Meghji, R.J. Williams, B. Henderson, J.H. Brock, and S.P. Nair, *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun* 69 (2001) 2872-7.
- [65] S. Ricard-Blum, The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2011).
- [66] S.R. Nallapareddy, G.M. Weinstock, and B.E. Murray, Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Molecular Microbiology* 47 (2003) 1733-1747.
- [67] M. Durbeej, Laminins. *Cell and Tissue Research* 339 (2010) 259-268.
- [68] J. Antikainen, L. Anton, J. Sillanpaa, and T.K. Korhonen, Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Molecular Microbiology* 46 (2002) 381-394.
- [69] T.J. Wells, T.N. McNeilly, M. Totsika, A. Mahajan, D.L. Gally, and M.A. Schembri, The *Escherichia coli* O157:H7 EhaB autotransporter protein binds to laminin and collagen I and induces a serum IgA response in O157:H7 challenged cattle. *Environmental Microbiology* 11 (2009) 1803-1814.

- [70] P.W. Park, T.J. Broekelmann, B.R. Mecham, and R.P. Mecham, Characterization of the elastin binding domain in the cell-surface 25-kDa elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS). *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 2845-2850.
- [71] F.M. Keane, A. Loughman, V. Valtulina, M. Brennan, P. Speziale, and T.J. Foster, Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 63 (2007) 711-723.
- [72] M.X. Zhou, and H. Wu, Glycosylation and biogenesis of a family of serine-rich bacterial adhesins. *Microbiology-Sgm* 155 (2009) 317-327.
- [73] A. Lizcano, C.J. Sanchez, and C.J. Orihuela, A role for glycosylated serine-rich repeat proteins in Gram-positive bacterial pathogenesis. *Molecular Oral Microbiology* 27 (2012) 257-269.
- [74] V.J. McCracken, and R.G. Lorenz, The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology* 3 (2001) 1-11.
- [75] C. Laboisse, A. Jarry, J.E. Branka, D. Merlin, C. BouHanna, and G. Vallette, Recent aspects of the regulation of intestinal mucus secretion. *Proceedings of the Nutrition Society* 55 (1996) 259-264.
- [76] J. Dekker, J.W.A. Rossen, H.A. Buller, and A.W.C. Einerhand, The MUC family: an obituary. *Trends in Biochemical Sciences* 27 (2002) 126-131.
- [77] J.B. Matthews, A. Garner, J. Dent, R.F. McCloy, S. Rune, and A.L. Blum, REALITIES OF MUCOSAL PROTECTION IN THE UPPER GASTROINTESTINAL-TRACT - PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2 (1990) 111-118.
- [78] J.R. Gum, J.W. Hicks, N.W. Toribara, B. Siddiki, and Y.S. Kim, MOLECULAR-CLONING OF HUMAN INTESTINAL MUCIN (MUC2) CDNA - IDENTIFICATION OF THE AMINO-TERMINUS AND OVERALL SEQUENCE SIMILARITY TO PREPRO-VON-WILLEBRAND FACTOR. *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 2440-2446.
- [79] C. Atuma, V. Strugala, A. Allen, and L. Holm, The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 280 (2001) G922-G929.
- [80] F. Backhed, R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson, and J.I. Gordon, Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307 (2005) 1915-1920.
- [81] A.C. Ouwehand, P.V. Kirjavainen, C. Shortt, and S. Salminen, Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 9 (1999) 43-52.
- [82] Y.K. Lee, C.Y. Lim, W.L. Teng, A.C. Ouwehand, E.M. Tuomola, and S. Salminen, Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 3692-3697.
- [83] T. Mukai, T. Asasaka, E. Sato, K. Mori, M. Matsumoto, and H. Ohori, Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 32 (2002) 105-110.
- [84] K. Todoriki, T. Mukai, S. Sato, and T. Toba, Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology* 91 (2001) 154-159.
- [85] E. Vitini, S. Alvarez, M. Medina, M. Medici, M.V. de Budeguer, and G. Perdigon, Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 24 (2000) 223-232.

- [86] P.W. Parodi, The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *Australian Journal of Dairy Technology* 54 (1999) 103-121.
- [87] C. Dunne, L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J.K. Collins, In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 73 (2001) 386S-392S.
- [88] K.A. Karlsson, J. Angstrom, J. Bergstrom, and B. Lanne, MICROBIAL INTERACTION WITH ANIMAL-CELL SURFACE CARBOHYDRATES. *Apmis* 100 (1992) 71-83.
- [89] W.H. Pan, P.L. Li, and Z.Y. Liu, The correlation between surface hydrophobicity and adherence of Bifidobacterium strains from centenarians' faeces. *Anaerobe* 12 (2006) 148-152.
- [90] M.H. Coconnier, T.R. Klaenhammer, S. Kerneis, M.F. Bernet, and A.L. Servin, Protein-mediated adhesion of lactobacillus-acidophilus bg2fo4 on human enterocyte and mucus-secreting cell-lines in culture. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1992) 2034-2039.
- [91] M. Pinto, S. Robineleon, M.D. Appay, M. Keding, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simonassmann, K. Haffen, J. Fogh, and A. Zweibaum, ENTEROCYTE-LIKE DIFFERENTIATION AND POLARIZATION OF THE HUMAN-COLON CARCINOMA CELL-LINE CACO-2 IN CULTURE. *Biology of the Cell* 47 (1983) 323-330.
- [92] T. Lesuffleur, A. Barbat, E. Dussaulx, and A. Zweibaum, GROWTH ADAPTATION TO METHOTREXATE OF HT-29 HUMAN COLON-CARCINOMA CELLS IS ASSOCIATED WITH THEIR ABILITY TO DIFFERENTIATE INTO COLUMNAR ABSORPTIVE AND MUCUS-SECRETING CELLS. *Cancer Research* 50 (1990) 6334-6343.
- [93] M. Rinkinen, E. Westermarck, S. Salminen, and A.C. Ouwehand, Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology* 97 (2003) 55-61.
- [94] E. Izquierdo, M. Medina, S. Ennahar, E. Marchioni, and Y. Sanz, Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for Bifidobacterium longum strains. *Current Microbiology* 56 (2008) 613-618.
- [95] J.M. Laparra, and Y. Sanz, Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology* 49 (2009) 695-701.
- [96] F. He, A.C. Ouwehand, E. Isolauri, H. Hashimoto, Y. Benno, and S. Salminen, Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30 (2001) 43-7.
- [97] X.J. Li, L.Y. Yue, X.F. Guan, and S.Y. Qiao, The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology* 104 (2008) 1082-1091.
- [98] M.A. Bianchi, D. Del Rio, N. Pellegrini, G. Sansebastiano, E. Neviani, and F. Brighenti, A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology* 39 (2004) 301-305.
- [99] E. Leteurtre, V. Gouyer, K. Rousseau, O. Moreau, A. Barbat, D. Swallow, G. Huet, and T. Lesuffleur, Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biology of the Cell* 96 (2004) 145-151.

- [100] C. Pontier, J. Pachot, R. Botham, B. Lenfant, and P. Arnaud, HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (2001) 1608-1619.
- [101] M.D. Peterson, and M.S. Mooseker, CHARACTERIZATION OF THE ENTEROCYTE-LIKE BRUSH-BORDER CYTOSKELETON OF THE C2BBE CLONES OF THE HUMAN INTESTINAL-CELL LINE, CACO-2. *Journal of Cell Science* 102 (1992) 581-600.
- [102] S.K. Kops, D.K. Lowe, W.M. Bement, and A.B. West, Migration of Salmonella typhi through intestinal epithelial monolayers: An in vitro study. *Microbiology and Immunology* 40 (1996) 799-811.
- [103] J. Crociani, J.P. Grill, M. Huppert, and J. Ballongue, ADHESION OF DIFFERENT BIFIDOBACTERIA STRAINS TO HUMAN ENTEROCYTE-LIKE CACO-2 CELLS AND COMPARISON WITH IN-VIVO STUDY. *Letters in Applied Microbiology* 21 (1995) 146-148.
- [104] N. Larsen, P. Nissen, and W.G.T. Willats, The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of Lactobacillus ssp and E-coli O138. *International Journal of Food Microbiology* 114 (2007) 113-119.
- [105] E. Tuomola, R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri, and S. Salminen, Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 73 (2001) 393S-398S.
- [106] G. Zarate, V.M. De Ambrosini, A.P. Chaia, and S. Gonzalez, Some factors affecting the adherence of probiotic Propionibacterium acidipropionici CRL 1198 to intestinal epithelial cells. *Canadian Journal of Microbiology* 48 (2002) 449-457.
- [107] A.J. Hedges, Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *International Journal of Food Microbiology* 76 (2002) 207-214.
- [108] A.A. Miles, CITATION CLASSIC - ESTIMATION OF THE BACTERICIDAL POWER OF THE BLOOD. *Current Contents/Life Sciences* (1979) L12-L12.
- [109] B.M. Corcoran, C. Stanton, G.F. Fitzgerald, and R.P. Ross, Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005) 3060-3067.
- [110] P. Ruas-Madiedo, and C.G. de los Reyes-Gavilan, Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 88 (2005) 843-56.
- [111] M. Gleinser, V. Grimm, D. Zhurina, J. Yuan, and C.U. Riedel, Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the Bifidobacterium bifidum-specific lipoprotein BopA. *Microb Cell Fact* 11 (2012) 80.
- [112] S. Yesillik, N. Yildirim, A. Dikici, and A. Yildiz, Antibacterial Effects of Some Fermented Commercial and Homemade Dairy Products and 0.9% Lactic Acid against Selected Foodborne Pathogens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6 (2011) 189-195.
- [113] F. Ruzicka, V. Hola, M. Votava, R. Tejkalova, R. Horvat, M. Heroldova, and V. Woznicova, Biofilm detection and the clinical significance of Staphylococcus epidermidis isolates. *Folia Microbiologica* 49 (2004) 596-600.
- [114] G. Tzortzis, Functional properties of the second generation prebiotic Galacto-oligosaccharide (B-GOS). *Agro Food Industry Hi-Tech* 20 (2009) 43-46.
- [115] L. Coulier, J. Timmermans, R. Bas, R. Van Den Dool, I. Haaksman, B. Klarenbeck, T. Slaghek, and W. Van Dongen, In-Depth Characterization of Prebiotic Galacto-oligosaccharides by a Combination of Analytical Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 8488-8495.
- [116] D.H. Jones, and A.I. Matus, ISOLATION OF SYNAPTIC PLASMA-MEMBRANE FROM BRAIN BY COMBINED FLOTATION-SEDIMENTATION

- DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION. *Biochimica Et Biophysica Acta* 356 (1974) 276-287.
- [117] C. Lofstrom, J. Schelin, B. Norling, H. Vigre, J. Hoorfar, and P. Radstrom, Culture-independent quantification of *Salmonella enterica* in carcass gauze swabs by flotation prior to real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 145 (2011) S103-S109.
- [118] J.D. Greene, and T.R. Klaenhammer, Factors involved in adherence of lactobacilli to human caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994) 4487-4494.
- [119] E. Bertino, S. Arslanoglu, C. Martano, P. Di Nicola, F. Giuliani, C. Peila, E. Cester, A. Pirra, A. Coscia, and G. Moro, Biological, nutritional and clinical aspects of feeding preterm infants with human milk. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 26 (2012) 9-13.
- [120] K. Shoaf, G.L. Mulvey, G.D. Armstrong, and R.W. Hutkins, Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity* 74 (2006) 6920-6928.
- [121] L.E.J. Searle, W.A. Cooley, G. Jones, A. Nunez, B. Crudgington, U. Weyer, A.H. Dugdale, G. Tzortzis, J.W. Collins, M.J. Woodward, and R.M. La Ragione, Purified galactooligosaccharide, derived from a mixture produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adhesion and invasion in vitro and in vivo. *Journal of Medical Microbiology* 59 (2010) 1428-1439.

# Význam probiotik ve výživě a v prevenci střevních onemocnění

M. KREJČÍ,<sup>1</sup> R. KADLEC,<sup>2</sup> J. KREJČÍ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>LabMediaServis, s.r.o., Jaroměř

<sup>2</sup>Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>3</sup>Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

### SOUHRN

Krejčí M., Kadlec R., Krejčí J. **Význam probiotik ve výživě a v prevenci střevních onemocnění zvířat.** Veterinářství 2013;63:11-14.

Ve stručném přehledu jsou uvedeny základní údaje týkající se využití probiotik ve výživě zvířat, kromě toho jsou zmíněny i možnosti jejich použití v prevenci střevních onemocnění hospodářských zvířat. Jsou vysvětleny mechanismy jimiž ovlivňují základní funkce zažívacího traktu a jakým způsobem zlepšují využití krmiva. Vedle nutričních aspektů jejich použití, jsou zdůrazněny i jejich imunomodulační, protizánětlivé a antiinfekční aktivity jimiž přispívají k prevenci střevních infekcí převážně infekční etiologie. Zmíněny jsou i meze a úskalí použití probiotik; jejich neznalost má často za následek nízkou efektivitu jejich nasazení. V závěru jsou shrnuty vlastnosti, které by dobrá probiotická kultura měla mít a naznačeny obtíže spojené s jejich hledáním.

### SUMMARY

Krejčí M., Kadlec R., Krejčí J. **The role of probiotics in nutrition and prevention of intestinal diseases in animals.** Veterinářství 2013;63:11-14.

Basic data on the use of probiotics in animal nutrition are briefly summarized and possibilities of their use in prevention of intestinal diseases in farm animals are mentioned. Mechanisms of their effects on the main functions of the digestive tract and on the improvement of feed efficiency are explained. In addition to nutritional aspects of the use of probiotics, their immunomodulating, anti-inflammatory and anti-infectious activities contributing to prevention of intestinal diseases of mainly infectious etiology are emphasized. Limitations and risks associated with the use of probiotics are also mentioned; lack of their knowledge often leads to low effectiveness of probiotics. Finally, the characteristics which a good probiotic culture should have are summarized and problems associated with the search for them are indicated.

### Úvod

Výživa hospodářských zvířat je v současné době vystavena novým výzvám spočívajících v základních změnách paradigmatu v přístupu k nutriční prevenci infekčních onemocnění doprovázejících velkovýrobní charakter jejich odchovu. Dosavadní přístup byl charakterizovaný přidáváním aditiv vykazujících různé antimikrobiální aktivity. Současná doba však ukazuje, že tento přístup k nutriční prevenci infekčních onemocnění se již vyčerpal. Svědčí o tom potřeba stálého stupňování těchto komponent, v současné době již značně přesahující únosnou mez. Vedle těchto skutečností

však existují ještě další důvody (epidemiologické, ekologické aj.), které nás nutí vzdát se jejich podávání. Týká se to zejména krmných antibiotik, jejichž preventivní a „růstově stimulační“ podávání byl již v nedávné době zastaveno, nebo dosud tolerovaného preventivního podávání oxidu zinku odstaveným selatům. Uvolněný prostor na trhu a potřeba eliminovat případné střevní infekce jimž jsou novorozená a časně odstavená mláďata v hojně míře vystavena, vede výrobce krmiv k zavádění nových výrobků, které by měly vyřazené prostředky nahradit.<sup>1,2</sup> Zcela mimořádné místo mezi uvažo-



## Seznam některých mikroorganismů nejčastěji používaných u zvířat jako probiotika

Rod	Druh
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. longum</i> <i>B. thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i>

vanými náhradami krmných aditiv s antibakteriální aktivitou zaujímají probiotika. Nejen tím, že jsou spolu s prebiotiky schopna částečně eliminovat infekce vyvolané patogenními bakteriemi, ale především tím, že na rozdíl od přeceňovaných „růstově stimulačních“ aktivit antibiotik, skutečně pozitivně směrem ovlivňují využití živin ve střevě svých hostitelů a tím i nepřímo jejich vývoj a růst. Při této příležitosti je nutné připomenout, že růst potencující vlastnosti krmných antibiotik, popisované před více jak půl stoletím se již dávno vyčerpaly a již před několika desetiletími se je v opakovaných pokusech nepodařilo znovu prokázat.<sup>3</sup>

Pro pochopení role probiotik ve fyziologii vyšších obratlovců je třeba uvést si několik závažných skutečností, které při běžném pohledu často unikají. Vzhledem k tomu, že interakce mikroorganismů s hostitelem byla, s výjimkou laboratorních zvířat, nejlépe studována u člověka, následující skutečnosti týkající se jeho fyziologie považujeme za relevantní i pro ostatní monogastričné vyšší obratlovcy. Význam bakteriální mikroflóry střeva vynikne, uvědomíme-li si že z  $10^{14}$  buněk, z nichž se skládá lidský organismus, pouze 10% tvoří somatické buňky (jen  $10^{13}$ ). Zbývajících 90% procent je tvořeno bakteriálními mikroorganismy. S ohledem na jejich výrazně menší velikost a zejména nižší váhu, úhrnná hmotnost všech bakterií obsažených v lidském střevě činí sice jen něco více jak jeden kilogram; na druhé straně v lidském těle jsou pouze dva orgány, které svojí hmotností tuto hodnotu převyšují (játra a mozek). V této souvislosti je nutno připomenout, že, co se metabolické aktivity týče, úhrn bakteriálního obsahu střeva aktivitu jater dokonce převyšuje.<sup>4</sup> Z uvedeného by mělo vyplývat, že tak velké množství metabolicky velmi aktivní hmoty by nemělo být přehlíženo. Zatím jen tušíme jaké funkce tento difúzně rozprostřený orgán v těle svých hostitelů vykonává.

Střevní mikroflóra je neobyčejně komplexní systém tvořený více jak tisícem bakteriálních druhů, z nichž však téměř 80% zatím nedovedeme kultivovat. Mezi nimi existuje řada vztahů, jak synergičských, tak i antagonistických. Jejich výzkum a pochopení je jedním z nejzávažnějších

úkolů biomedicínských věd. Mohlo by se zdát, že závažnosti právě zmíněné problematiky je snad poněkud přeceňována. Na tuto námitku lze odpovědět dalším srovnáním, které může ozřejmit skutečnosti, které často unikají běžnému pohledu na uvedenou problematiku a podtrhnout již řečené. Je důležité uvědomit si plošné relace na nichž se aktivity střevní mikroflóry uskutečňují; celková plocha střevní sliznice dospělého člověka dosahuje téměř 300 m<sup>2</sup>, zatímco plocha povrchu těla dosahuje jen asi dvou čtverečních metrů. Z toho srovnání vyplývá, že střevní sliznice tvoří významné rozhraní mezi vnějším a vnitřním prostředím každého organismu. Pro správnou funkci dějů probíhajících na tomto rozhraní zásadní roli hrají právě mikroorganismy které jsou zde shromážděny. Jejich druhové složení a vzájemné proporce vytvářejí prostředí pro děje na této ploše uskutečňované.

Z uvedených skutečností plyne, že použití probiotik k optimalizaci střevních funkcí je příkladem moderního přístupu k výživě hospodářských zvířat, tím, že na jedné straně chrání jejich střevo před bakteriálními infekcemi, a na druhé straně se podílejí na procesech spojených s optimálním využitím živin obsažených v krmivu. V následujícím textu uvedeme hlavní aktivity probiotik jimiž se mohou podílet na správném fungování dějů probíhajících na střevní sliznici.

Avšak dříve než tak učiníme, je nutno definovat pojem probiotika. Není zcela jasné kdo a kdy tento pojem vlastně zavedl; ačkoliv jsou uváděni různí autoři; podle našeho mínění prvním kdo jej použil byl německý bakteriolog Werner Kollath (1892 – 1970), když chtěl, ve srovnání s antibiotiky, zdůraznit jejich opačné působení na funkci střevní mikroflóry. Pro definici probiotik existuje několik variant. Nejčastěji je používána definice Fullerova,<sup>5</sup> která je definuje jako živé mikrobiální doplňky potravy, které příznivě ovlivňují mikrobiální rovnováhu trávicího traktu a působí ve prospěch hostitele. Definice světových organizací FAO/WHO zdůrazňuje zejména zdravotní aspekt probiotik tím, že je definuje jako: „Živé mikroorganismy, které podány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdraví hostitele“.

## Význam probiotik

Jak již vyplývá z výše uvedených definic, probiotika napomáhají udržovat mikrobiální rovnováhu ve střevě a významně tak přispívají ke zlepšení fyziologických funkcí střevní sliznice. Mnohem širší využití však mají probiotika v podpoře trávení, stejně jako v obraně střeva proti infekci. Starší, převážně empirické, znalosti pozitivního působení bakteriálním kvašením natráveného krmiva byly v posledních letech nahrazeny cíleným přidáváním vybraných bakteriálních druhů buď přímo do krmné dávky, nebo jako konzervanty objemné píce. Jejich použití jako doplňku krmiva vychází z pochopení fyziologické funkce střevní mikroflóry, která spolu s trávicími šťávami je další složkou procesu trávení. Digestivní účinky probiotik je třeba spatřovat zejména v následujících působeních:

- snížení pH střevního obsahu (produkce kyseliny mléčné),
- produkce proteolytických a sacharolytických enzymů, zvyšujících využitelnost živin obsažených v krmivu,
- regulace střevní motility,
- pozitivní ovlivnění skladby střevní mikroflóry.

Zatímco o digestivních účincích probiotik nebylo nikdy pochyb, jejich schopnost chránit střevo před působením patogenních mikroorganismů byla někdy zpochybňována. V současné době však již existuje dostatek důkazů o jejich účincích nejen preventivních, ale v některých případech i léčebných. Jsou založeny především na těchto aktivitách:

- přednostní kolonizaci střevní sliznice nejen mláďat, ale i zvířat vystavených náhlým změnám krmné dávky<sup>6</sup> a životního prostředí. Tento druh profylaktického působení probiotických mikroorganismů je spojován s jevem nazvaným jako **kompetitivní exkluze**, kdy jsou na povrchu sliznice volná vazebná místa obsazována žádoucími mikroorganismy (hovoříme o tak zvané receptorové blokaci). Tímto způsobem je zabráňováno v uchycení a přemnožení patogenních (zástupci rodů *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Vibrio*), potenciálně patogenních (někteří zástupci rodů *Helicobacter*, *Clostridium*, *Candida*) či oportunních mikroorganismů (zástupci rodů *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, někteří zástupci rodu *Streptococcus* či některé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*).
- tvorba kyseliny mléčné, která snižováním acidity střevního obsahu, nevytváří vhodné prostředí pro přemnožení některých patogenních mikroorganismů. Toho dosahují několika způsoby, z nichž nejvýznamnější jsou konkurenční užití stejného substrátu, snížení pH produkovanou kyselinou mléčnou a snížení koncentrace O<sub>2</sub> za současného zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub>.
- produkce látek vykazujících antibakteriální aktivity inhibující množení některých bakteriálních druhů.<sup>7</sup> Nejvýznamnější z nich jsou bakteriociny mezi které řadíme například koliciny, bulgaricin, acidolin, laktocidin, acidophilin či reuterin.<sup>8</sup>
- Výše popsané účinky probiotik (kompetitivní exkluze a úprava prostředí v zažívacím traktu dosahují u některých mikroorganismů takové míry, že lze hovořit o přímém antagonismu vůči některým patogenům či oportunním patogenům (například proti salmonelám, vibriím, či enteropatogenním, enterotoxigenním a enteroinvazivním *E. coli*).

Zatímco, role střevní mikroflóry ve vývoji novorozeneckých mláďat je známa již delší dobu, její neobyčejný význam v modulaci lokální slizniční imunity byl doceněn relativně nedávno.<sup>9,10,11</sup> Výzkum interakce mezi slizniční mikroflórou a jejím imunitním systémem je teprve na samém počátku. Aktivace tohoto systému bakteriemi střevní mikroflóry má nesporný význam zejména v post-

partálním období, kdy nastává důležitá etapa zrání imunitního systému sliznic. Toto období proto rozhoduje o jeho budoucí schopnosti zdolávat infekce pomocí specifických i nespecifických faktorů imunity.<sup>12</sup>

V poslední době je rovněž věnována značná pozornost studiu protizánětlivých účinků některých probiotik (například *L. casei*, popřípadě *S. boulardii*). Jejich léčebné a preventivní účinky byly prokázána nejen u lidí při idiopatických střevních zánětech snížením produkce prozánětlivých cytokinů, ale i ve veterinární medicíně,<sup>13</sup> zejména jako prevence nekrotické enteritidy drůbeže.<sup>14</sup>

Kromě toho je ještě nutné zmínit, že některé nutričně významné látky (zejména biologicky aktivní peptidy vznikající štěpením bílkovin mléka), mohou vzniknout jen za přispění metabolické aktivity určitých probiotických bakterií. Tyto látky svými účinky na oběhový či imunitní systém dalece přesahují význam ostatních nutričních faktorů.

Nemalý význam má i schopnost některých bakterií střevní mikroflóry produkovat vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, pyridoxin, cyanokobalamin, niacin, kyselinu listovou a pantotenovou), vitamin K či mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které pak slouží jako substrát pro buňky tlustého střeva (kolonocyty), ovlivňují prokrvení střevní sliznice a motilitu střeva.<sup>15</sup>

## Oblasti vhodné pro podávání probiotik domácím zvířatům

V oblasti výživy hospodářských zvířat a ve veterinární medicíně, probiotika se mohou uplatnit zejména ve dvou oblastech: v podpoře růstu v důsledku zlepšeného využití krmiva a v prevenci infekčních i neinfekčních poruch zažívání. Jejich preventivní účinky se projevují zejména ve stavech stresu (jako je například manipulace se zvířaty či jejich přeprava, změna v krmné dávce, prudké změny teploty, stísněné podmínky, zhoršená zoohygiena atp.) při střevních poruchách různé etiologie. Při nich, vedle již popsaného protiinfekčního působení se rovněž uplatňují i jejich protizánětlivé účinky. Zvláštní oblastí použití probiotik je jejich preventivní podávání novorozenečným mláďatům. Tímto způsobem ošetřená mláďata snáze odolávají průjemovým onemocněním, často doprovázejícím první dny jejich života. V tomto směru, nejlepší data byla získána u selat preventivně suplementovaných probiotiky od narození až po odstav.<sup>16,17</sup> Výsledky jejich terapeutického podávání mláďatům hospodářských zvířat neprokázaly významný efekt.

## Probiotické mikroorganismy užívané ve výživě hospodářských zvířat

### Bakterie mléčného kvašení:

- laktobacily: *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*
- bifidobakterie: *B. bifidum*
- enterokoky: *E. faecium*, *E. durans*
- streptokoky: *S. lactis*, *S. thermophilus*, *S. diuylactus*

**Ostatní probiotické mikroorganismy:**

- bacily: *B. subtilis*, *B. toyoi*
- kvasinky: *Sacharomyces cerevisiae*, *Torulopsis spp.*
- plísně: *Aspergillus oryzae*

**Úskalí spojená s použitím probiotik ve výživě hospodářských zvířat**

Příčiny selhávání očekávaného účinku probiotik jsou různé. Mezi nejčastější důvody patří:

- přečechování schopností probiotik odolat v konkurenčním soupeření vysokému množství patogenických mikroorganismů,
- opomíjení zásadní skutečnosti, že skutečnými původci střevních infekcí nemusejí být jen bakterie, ale též viry, případně jiné mikroorganismy, které již kompetitivně nesoupeří s probiotiky ani o matrix ani o povrchové receptory, nýbrž invadují přímo do enterocytů,
- nevhodná kombinace probiotických kmenů podávaných současně, které s ohledem na přirozený antagonismus některých z nich, může rušit jejich pozitivní efekty vykazované pokud jsou-li aplikovány samostatně,
- volba probiotika nevykazujícího dostatečnou míru příznivých vlastností.

**Vlastnosti dobrých probiotik**

Abyste mikroorganismus vykazující probiotické účinky mohl zaznamenat příznivý efekt v prostředí střeva hostitelského organismu, musí nejprve odolat nepříznivému prostředí žaludku a dále baktericidním účinkům žluči v duodenu. Míra rezistence žaludečním a žlučovým kyselinám jsou tedy důležité vlastnosti vhodného probiotika. V ochraně střeva významnou roli mohou hrát pouze ty bakteriální kmeny, které jsou schopny ve větším rozsahu adherovat na povrch střevní sliznici a tímto způsobem její kolonizovat. Účinek probiotických bakterií, které toho nejsou schopny, je pouze přechodný a proto jen velmi omezený. Mimo schopnosti adherovat na povrch enterocytů, vhodný probiotický kmen by rovněž měl mít krátký generační čas, a navíc by měl produkovat látky, které by inhibovaly růst konkurenční mikroflóry; samozřejmě by měly být schopny přežívat a množit se v prostředí zažívacího traktu. Studium vzájemných vztahů střevní mikroflóry, a to jak synergických, tak i antagonických, je předmětem intenzivního výzkumu. V souvislosti se studiem interakcí mikrobiálních druhů a jejich společenstev na pevných površích byla odhalena existence nesmírně zajímavého jevu, později nazvaného biofilmem. Práce věnované tomuto problému ukázaly, že některé bakteriální druhy mají tendenci se samoorganizovat a vytvářet vzájemně se podporující společenstva, jejichž nezbytnou podmínkou je již zmíněná adheze na příslušné povrchy. V rámci takto vzniklého společenství se vytvářejí nejen metabolické a nutriční synergie, ale i komplikovaná komunikace prostřednictvím secernovaných látek. Vše co zde bylo řečeno o biofilmech obecně, platí i o specializovaných biofilmech vznikajících

na povrchu střevní sliznice. Dosavadní, jen velmi dílčí poznatky o struktuře a funkci biofilmu dovolují pochopit smysl dříve uvedených skutečností, týkajících se požadavků na vhodný probiotický kmen.

Výše uvedené skutečnosti dokládají, že nedávny zákaz podávání antibiotik, případně jiných antibakteriálních aditiv, k prevenci nebo jako „růstových stimulatorů“, může být plně kompenzován použitím probiotik. Jejich použití kromě toho však přináší další pozitivní efekty spojené s fyziologií trávení a vyšším využitím krmiva. Vzhledem k tomu, že pozornost zaměřená na fyziologickou a obrannou roli střevní mikroflóry a její modulaci prostřednictvím cíleného podávání probiotik nemá zatím dlouhé trvání, lze očekávat, že intenzivní výzkum této oblasti teprve v budoucnu přinese řadu nových, zásadních poznatků.

Článek vznikl s podporou grantů Ministerstva zemědělství České republiky: MZe 0002716202 a MZe ČR - Q191B274 a Ministerstva školství, mládeže a sportu České republiky: AdmireVet; No. CZ 1.05/2.1.00/01.0006; ED0006/01/01.

**Literatura:**

1. Svoboda M., Zralý Z., Trčková M., Slámová R., Baňoch T., Vondrušková H. Neantibiotické stimulatory růstu Veterinářství 2010;60:166-170.
2. Vondrušková H., Zralý Z., Trčková M., Slámová R., Baňoch T., Svoboda M. Neantibiotické stimulatory růstu 2. část. Veterinářství 2010;60:411-415.
3. Fox S. M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. Vet Med Food-Anim Practice 1988;8:806-830.
4. Tlaskalova-Hogenova H., Stepankova R., Hudcovic T., Tuckova L., Cukrowska B., Lodinova-Zadnikova R., Kozakova H., Rossmann P., Bartova J., Sokol D., Funda D.P., Borovska D., Rehakova Z., Sinkora J., Hofman J., Drastich P., Kokesova A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. Immunol Lett. 2004;93:97-108.
5. Fuller R. Ecological studies on the Lactobacillus Flora Associated with the Crop Epithelium of the Fowl. J. Appl. Bacteriol. 1973;36:131-139.
6. Mead G. C. Prospects for 'competitive exclusion' treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. Vet J 2000;159:111-123.
7. Savage D. C. Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientists. Curr. Issues Intest. Microbiol 2001;2:1-15.
8. Nemcova R. 1997. Kriteria pro výběr laktobacilů pro probiotické účely. Vet Med (Praha) 42:19-27.
9. Dugas B., Mercenier A., Lenoir-Wijnkoop I., Aumard C., Dugas N., Postaire E. Immunity and probiotics. Immunol Today 1999;20:387-390.
10. Isolauri E. Probiotics in human disease. Am J Clin Nutr 2001;73:1142-1146.
11. Drakes M., Blanchard T., Czinn S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. Infect Immun. 2004;72:3299-3309.
12. Parvez S., Malik K.A., Ah K.S., Kim H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol 2006;100:1171-1185.
13. Geier M.S., Mikkelson L.L., Torok V.A., Allison G.E., Ormrod C.G., Bouillanne M., Hughes R.J., Choct M. Comparison of alternatives to in-feed antimicrobials for the prevention of clinical necrotic enteritis. J Appl Microbiol 2010;109:1329-1338.
14. La Ragione R.M., Narbad A., Gasson M.J., Woodward M.J. In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* F19785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. Lett. Appl Microbiol 2004;38:197-205.
15. Ohashi Y., Ushida K. Health-beneficial effects of probiotics: its mode of action. Anim Sci J 2009;80:361-371.
16. Lallés JP., Bosé P., Smidt H., Stokes CR. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. Proc Nutr Soc. 2007;66:260-8.
17. Zeyner A., Boldt E. Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2006;90:25-31.

### **Mikrobiální biofilm a jeho význam na zdraví, výživu a chov zvířat – úvod do problematiky**

**Kadlec, R.**

*Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., pracoviště Pohořelice*

Před třiceti lety se ukázalo, že mikroorganismy se mohou vyskytovat ve dvou formách. Bakterie mimo zkumavek mikrobiologických laboratoří žijí většinou přisedle ve formě biofilmů, což výrazně změnilo obecně přijímanou představu bakterií, jako volně plovoucích, soliterních mikroorganismů. Biofilm je strukturované společenství mikroorganismů žijící adhezivně na živých nebo neživých površích. Společenství, které produkuje ve velké míře extracelulární hmotu, která jej výrazně chrání před nejrůznějšími vlivy okolí např. antibiotika nebo desinfekcí. Biofilm, jako majoritní forma existence mikroorganismů, se dotýká a ovlivňuje mnoho lidských činností a může být významným faktorem, ovlivňující chov a zdraví zvířat, ale i zpracování živočišných produktů.

#### **Úvod**

V roce 1683 Antonie van Leeuwenhoek, majitel obchodu se smíšeným zbožím, seškrábl povlak ze svých zubů, rozředil jej dešťovou vodou a vložil pod vlastnoručně vyrobený mikroskop. Byl první člověk, který pozoroval bakterie v jejich přirozeném prostředí a mikroorganismy vůbec. V následujících stoletích došlo k velkému rozvoji mikrobiologie, ale mikroorganismy byly povětšinou zkoumány *in vitro*, kde izolovány, probíhala kultivace na bohatých živných půdách, na kterých se však bakterie chovaly zcela odlišně od svého přirozeného prostředí. Teprve až o 300 let později, po mnoha letech zkoumání bakterií jako volně plavoucích, planktonických individualit, si vědci začali uvědomovat fakt, že naprostá většina bakterií ve svém přirozeném prostředí žije jinak - přisedle, ve formě společenství, obklopená ochranným slizem a svými vlastnostmi se zásadně liší od planktonických buněk, např. jsou vysoce odolné vůči zevním vlivům. Byl zformován koncept biofilmů, jako normální životní forma většiny bakterií a nejen jich.

#### **Biofilm**

Biofilm, jak už bylo naznačeno je strukturované společenství mikroorganismů, uložené v extracelulární hlenové matici, kterou produkují a která tvoří trojrozměrnou síť kanálků. Biofilmy jsou většinou přisedlé k inertním nebo i živým povrchům ponořeným ve vodném prostředí nebo alespoň s dostatečným přísunem vlhkosti, tvoří rozmanité makroskopické útvary, a jsou charakterizovány genetickou diverzitou a schopností komunikace mezi jejími členy. Mikroorganismy rostoucí ve formě biofilmu vykazují podstatně jiné vlastnosti než planktonické buňky, vzrůstá u nich odolnost vůči desinfekcím nebo antibiotikům, kde v některých případech mohou demonstrovat až tisíckrát vyšší odolnost než jejich planktonická forma. V přirozeném prostředí jsou biofilmy mnohohoduhové, což vyžaduje určitou míru symbiózy a komunikace. Biofilmy představují vyšší a složitější způsob života mikrobů a jsou analogií tkání vyšších organismů.

Nejen bakterie, téměř každý druh mikroorganismů jako jsou archea, protozoa nebo řasy mají mechanismus adherence a tvorby biofilmu. Biofilmy jsou všudypřítomné, je možné je nalézt na poušti i na ledovcích, biofilmy osidlují půdu, ale lze je objevit i na tak kuriózních místech jako je palivové systémy letadel nebo horké, podmořské prameny. Bakterie jsou schopny se z biofilmů opět uvolňovat a kolonizovat další povrchy.



## Biofilm a zdraví

Ač se to zdá paradoxem, většinu z celkového počtu buněk ať už lidského nebo zvířecího těla tvoří bakterie. Jen ve střevě žije přes 600 druhů mikroorganismů a jejich celkový počet je tedy desetkrát vyšší než počet buněk těla. Ukazuje se, že většina těchto bakterií se vyskytuje ve formě biofilmu. Biofilmy se ale podílejí i na širokém spektru nemocí ať už zvířat a nebo lidí. Je odhadnuto, že až 80% všech infekčních chorob je způsobeno biofilmy.

Biofilm se může vytvořit na povrchu jakéhokoliv umělého povrchu implantovaného do těla anebo přicházejícího s tělem do styku. Biofilm se může tvořit na povrchu močových i intravenózních katetrů, umělých chlopní, implantátů, kontaktních čoček, způsobují zubní kaz, umožňuje vznik chronických močových infekcí, katetrových sepsí, endokarditid atd. Vlivem biofilmů se prodlužuje čas k hojení ran a velmi často dochází k perzistujícím infekcím.

U zvířat se biofilmy podílejí například na chronické pneumonii u prasat a dobytka nebo aspergilose u drůbeže. Jedním z nejdůležitějších choroboplodných zárodků způsobujících záněty plic u telat je *Mycoplasma bovis*, který též má schopnost tvořit biofilm.

Další chorobou, na které se podílejí biofilmy je mastitida, která stále zůstává jednou z nejvíce důležitých nemocí v mléčném průmyslu. Zvláště opakující se infekce a rezistence infekcí na antibiotika způsobují nemalé ztráty chovatelům. Ekonomické ztráty v důsledku mastitidy u hovězího dobytka je jen v USA odhadována na 1,8 miliardy dolarů. To je zhruba 10% celkové hodnoty prodaného mléka a zhruba dvě třetiny této ztráty připadá na sníženou produkci mléka u subklinicky infikovaných krav. Biofilmy se též významně podílejí na chorobách kulturních plodin. Ve zpracovatelském a potravinářském průmyslu biofilmy hrají důležitou roli např. v kontaminaci masa, mléčných produktů, vajec a technologického zařízení. Patogeny jako jsou *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* apod. též mohou tvořit biofilm, který je odolný vůči obvyklým metodám mytí a sanitace. Biofilmy mohou zvyšovat korozi potrubí, mění hydrodynamické vlastnosti toku a dokonce mohou způsobit i úplné mechanické ucpání. Vzhledem k minimální náročnosti biofilmů na živiny, biofilmy jsou běžnými prostředky téměř nezníčitelné a mohou být neustálou hrozbou kontaminace a infekce. Biofilm se tvoří na tepelných výměnících v mlékárnách, kde bakterie mohou adherovat přímo na povrch výměníku. Díky stálému přísunu živin a velké odolnosti na čistící proces se biofilm v těchto systémech pomnoží a mohou infikovat další součásti systému.

## Fyziologický biofilm

Mikroorganismy, se podstatnou měrou podílejí na trávení přijaté potravy v trávicím traktu většiny živočichů. V bachtu přežvýkavců vytvářejí mikroorganismy populaci tvořící biofilm asociovanou s pevnými částicemi potravy, populaci asociovanou s gastrointestinální tekutinou anebo populaci adherovanou na povrch sliznic. Adheze těchto bakterií probíhá formou velmi specifické asociace. Dle všeobecného principu mikrobiální ekologie se každý organismus snaží umístit do nejvhodnějšího prostředí z hlediska výživy a okolních podmínek a rozmnožovat se uvnitř fyziologicky integrované komunity. Pozorování růstu bakterií asociovaných s částicemi potravy ukazuje, že každý druh adheruje k vlastnímu nerozpustnému substrátu, např. celulóza, protein, škrob a produkuje enzymy které jsou schopny degradovat nerozpustný substrát na rozpustné nutriety. Protože většina trávicích procesů zahrnuje koordinaci fyziologicky souvisejících aktivit, často vidíme rozvoj strukturovaného společenství, kde metabolické produkty primárně trávicích organismů se stávají substrátem dalších členů vrstevnatého biofilmu.

Všeobecně, přítomnost dobře adoptovaných mikrobiálních biofilmů na povrchu tkání je benefitem v tom, že tyto buňky fyziologicky spolupracují a biofilm zamezuje adhezi patogením bakteriím a virům.

Jak bylo uvedeno, schopnost tvořit biofilm u mikroorganismů představuje důležitý faktor, který může do značné míry předurčovat patogenitu mikroorganismů. Tvorba biofilmu může být na jedné straně benefitem, na druhé straně, ale může být zde zvýšené riziko virulence. Je na dalším zkoumání, aby tyto interakce byly lépe popsány.

#### Literatura

- BEUF, M., RIZZO, G., LEULIET, J.C. A critical review of milk fouling in heat exchangers. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5: 27-33., US Environmental Protection Agency. Health Risks From Microbial Growth and Biofilms in Drinking Water Distribution Systems, June 17, 2002, 50 p.
- ČERNOHORSKÁ L., VOTAVA M. Biofilmy a jejich význam v lékařské mikrobiologii, Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 51, 2002, č. 4, s. 161–164
- MCALLISTER, T.A., H.D. BAE, G.A. JONES, AND K.-J. CHENG. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72:3004-3018.

#### Abstract

##### ***Microbial biofilm and its impact on animal health, nutrition and breeding***

*Biofilm are estimated to be responsible for 80% of all human and animal bacterial infections. Biofilms are matrix-enclosed microbial populations adherent to each other or solid surfaces or tissues. Biofilms are extremely resistant to immune system, antibiotics and disinfectants. Conversely, biofilms in the ruminant digestive tract play an important role in digestion and overall function of the gastrointestinal tract. In this article importance of biofilm on animal health, nutrition and breeding is presented.*

---

Práce byla připravena za podpory NAZV 1B44037.

---

#### Kontakt:

MSc. Robert Kadlec  
Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., pracoviště Pohořelice  
Vídeňská 699, 691 23 Pohořelice  
e-mail: vuvz@vuvz.cz

## IN VITRO MODELY ADHERENCE PROBIOTIK - PŘEHLED

R. Kadlec<sup>1</sup>, L. Křížová<sup>2</sup>, D. Halová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

<sup>2</sup> Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.

### In vitro models of probiotics adhesion - a minireview

#### Abstrakt

Příspěvek se zabývá problematikou stanovení adherence probiotických kmenů bakterií metodami *in vitro*. V úvodu je popsána mukózní vrstva nacházející se v gastrointestinálním traktu a její charakteristické vlastnosti. Dále je popsána problematika probiotik a kritérií používaných při selekci potenciálních probiotických kmenů, z nichž nejdůležitější je adherence. Stručně jsou popsány a porovnány používané *in vitro* modely pro studium adherence probiotických kmenů.

**Klíčová slova:** adherence, probiotika, *in vitro*, mucin, buněčné kultury

#### Abstract

Minireview is focused on the problems of determination of adhesion of probiotic strains using *in vitro* models. At first, description of gastrointestinal mucus layer and its characteristic properties is given. Further, probiotics and criteria used for their selection are characterised with adhesion as the most important selection criterion. Currently used *in vitro* models are described and compared.

**Key words:** adhesion, probiotics, *in vitro*, mucin, cell cultures

#### Úvod

Mukózní povrch je přirozenou bariérou gastrointestinálního traktu, která jej chrání před patogenními mikroorganismy. Je komplexním organickým systémem tvořeným intestinálním epitelem, imunitními buňkami a rezidentní mikroflórou. Intestinální epitel je pokryt specializovanými pohárkovými buňkami, které sekretují vysokomolekulární glykoproteiny nazývané mucin, který má silný negativní povrchový náboj a velkou hydratační kapacitu. Tvoří hlavní strukturální složku mukózní vrstvy. Mucin se nachází především na obvodu epitelálních buněk a v jejich extracelulárním prostředí nebo pokrývá epitelální buňky. Vrstva mucinu slouží nejen jako bariéra, která brání difuzi nežádoucích makromolekul a pronikání škodlivých substancí a toxinů do vnitřního prostředí, ale má i mnoho dalších funkcí, jako je lubrikace lumenu střeva usnadňující pasáž tráveniny, zachovávání hydratační vrstvy epitelu a tvorí propustnou gelovou vrstvu pro výměnu plynů a živin s intestinálním

epitelem. Muciny mohou také obsahovat specifické oligosacharidy, které napodobují svojí strukturou epitelální receptory, na které naváží patogenní bakterie, a tím je imobilizují. Kromě toho obsahují vazebná místa pro rezidentní mikroflóru a udržují vysoké koncentrace imunoglobulinu a tím brání ataku a kolonizaci patogenních mikroorganismů<sup>1</sup>.

Doposud bylo identifikováno na 20 různých typů mucinů. V gastrointestinálním traktu, především pak v tlustém střevě, převládá mucin označený MUC2. V nedávných studiích bylo zjištěno, že se tento mucin skládá ze dvou vrstev. Ačkoliv obě vrstvy jsou tvořeny převážně MUC2 mucinem, mají rozdílné vlastnosti a funkce. Vnitřní vrstva přiléhá k epitelu střeva a je prosta bakterií, protože má ve své struktuře pouze malé póry, které neumožňují přímý kontakt s epitelálními buňkami. Vnější vrstva ohraničuje lumen a vzniká chemickými a fyzikálními pochody z vrstvy vnitřní, má menší hustotu a obsahuje vysoký počet bakterií, kterým škýtá ideální prostředí - je pro ně nejen důležitým zdrojem energie, ale rovněž umožňuje vazbu bakterií na četná vazebná místa. Vnitřní přilnavou vrstvu je možné odstranit pouze jemným seškrábnutím, zatímco vnější, volně přiléhající vrstva se dá snadno odstranit šetrným odsátím<sup>2</sup>.

Rezidentní mikroflóra, která trvale sídlí v gastrointestinálním traktu je tvořena především bifidobakteriemi, laktobacily, enterokoky a propionibakteriemi, které se podílejí na udržování rovnováhy mikrobiálního prostředí, na omezování kolonizace a invaze patogenů, na zachování epitelální integrity a na podpoře imunitních funkcí. Pro zachování a podporu výše uvedených vlastností rezidentní mikroflóry se ve výživě člověka využívají probiotika. Od probiotických kmenů se očekává, že budou mít především schopnost kolonizovat, alespoň dočasně, mukózní povrch tlustého střeva a chránit sliznici před napadením patogeny, jakými jsou např. některé kmeny *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* nebo jiné intestinální nebo potravní patogeny, dále schopnost povzbuzovat imunitní odezvy organismu a také by měly vykazovat antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti<sup>3</sup>. Základním a nezbytným předpokladem pro výše uvedené vlastnosti probiotických bakterií je jejich schopnost adherence k intestinálnímu mukóznímu gelu nebo k epitelálním buňkám<sup>4</sup>. Bakteriální adherence k intestinálnímu povrchu je často zprostředkována pomocí specifických vazeb mezi proteiny bakteriálního povrchu (lektiny) ke komplementárním oligosacharidům na povrchu tkání. Nicméně bakterie mohou také adherovat nespecificky, pomocí hydrofobních interakcí s intestinálním povrchem<sup>5</sup>. Kmeny s nejvyšší schopností adherence mají největší vliv na zdraví hostitele<sup>6</sup>. Proto je adherence považována za jedno ze základních selekčních kritérií pro probiotické mikroorganismy.

Stanovit adhezenci mikroorganismů metodou *in vivo* je obtížné, proto byly vyvinuty modely studií *in vitro*, které mohou být prováděny na různých povrchích simulujících



prostředí střeva. Nejčastěji jsou v těchto studiích používány humánní epiteliální buněčné linie HT-29 a Caco-2 (např. 6), které jsou obecně považovány za modely diferencované humánní intestinální mukózy, protože vykazují v modelech *in vitro* morfologické a funkční vlastnosti dospělých enterocytů<sup>6</sup>. Komparativní studie rovněž sledují adhezenci bakterií k buňkám HT29-MTX, což je homogenní populace humánních pohárkových buněk sekretujících mukus s cílem zjistit podíl mukózní vrstvy na interakci bakterií s intestinálním povrchem<sup>4</sup>. V pokusech *in vitro* se také využívá imobilizovaný intestinální mukus, mucinové agarové tubusy ve fermentorech, nebo celé fermentační systémy s mucinovými nosiči. Při sledování adhezenčních schopností se rovněž využívá značení bakterií radioaktivními izotopy nebo fluoreskujícími látkami.

### In vitro modely pro studium adherence

#### Adherence bakterií k mucinu

Jedná se o nejjednodušší model vyhodnocení adherence k intestinálnímu mukusu, který je založen na imobilizaci komerčně dostupného mucinu na povrchu mikrotitračních destiček<sup>7</sup>. Výsledky adherence však vykazují větší variabilitu, než jaká je pozorována při použití buněčných kultur<sup>8</sup>. Pro vyhodnocení adherence je možné také využít humánního mucinu získaného ze vzorků stolice. Při použití syntetického a fekálního mucinu pro zjišťování adherence u komerčně dostupných probiotických bakterií *L. rhamnosus GG* a *B. lactis Bb12* nebyly zjištěny průkazné rozdíly v naměřených hodnotách. Pro stanovení rozdílu v adhezenci bakterií k mukózní vrstvě vytvořené v různých částech střeva se jako model používá intestinální mucin odebraný z různých částí střeva prasat<sup>8</sup>.

#### Adherence bakterií k buněčným kulturám

Pro tento typ studií *in vitro* jsou využívány buněčné kultury humánních intestinálních epiteliálních buněčných linií především Caco-2 buněk a HT29-MTX buněk, které lépe simulují prostředí *in vivo*. Caco-2 buňky vytvářejí kultury tvořené homogenní a polarizovanou jednoduchou vrstvou, která se svým charakterem blíží dospělým humánním enterocytům v tenkém střevě, čehož se využívá při studiu buněčných interakcí. Předchozí studie (např. 10) prokázaly, že fluorescenční značení bakterií ve spojení s jednovrstvou kulturou Caco-2 buněk je vhodný model pro studie adherence a může být využíván jako alternativa k radioaktivně značeným bakteriím. Nicméně, tyto kultury Caco-2 buněk nevytvářejí dostatečnou vrstvu mukusu, a proto i hodnoty adherence některých bakteriálních kmenů (např. *L. rhamnosus GG*, *B. lactis Bb12* nebo *B. animalis* IATA-A2) k Caco-2 buňkám jsou výrazně nižší než k mucinu. A naopak adherence některých kmenů patogenních bakterií *E. coli* k Caco-2 kulturám je vyšší než k mucinu<sup>8</sup>.

Buněčná linie HT29-MTX vznikla z izolace HT29 buněk adaptovaných na methotrexát (MTX), které se diferencují na pohárkové buňky, sekretující mucin. Při použití samot-

ných buněk HT29-MTX, jsou pozorovány výrazně nižší hodnoty adherence u všech testovaných probiotických kmenů, ve srovnání s hodnotami získanými u Caco-2 buněk<sup>8</sup>.

V intestinálním epitelu představují enterocyty a pohárkové buňky 2 základní fenotypy buněk. Pro zpřesnění *in vitro* studií bakteriální adherence byly proto vyvinuty modely využívající ko-kultury Caco-2 buněk reprezentujících enterocyty a HT29-MTX reprezentujících pohárkové buňky sekretující mucin<sup>11</sup> v poměru 90:10, který nejvíce odpovídá přirozeným podmínkám v intestinu.

Od Caco-2 buněčné linie byly odvozeny buněčné linie C2BBE (linie označené 1 a 2), které vytvářejí jednoduchou polarizovanou vrstvu buněk s apikální kartáčovou vrstvou srovnatelnou s buňkami v humánním intestinu<sup>12</sup>. Ačkoli tyto buněčné linie byly používány jako *in vitro* model pro studium průniku bakterie *Salmonella typhi* přes intestinální epitel, linie C2BBE1 představuje potenciální alternativní model pro studium vztahů mezi probiotickými bakteriemi a intestinálními epiteliálními buňkami, jak již bylo ověřeno např. ve studii<sup>13</sup>.

Prasečí intestinální epiteliální buněčné linie IPEC-J2 jsou v poslední době používány jako relevantní *in vitro* modely pro studium intestinálních mezibuněčných interakcí<sup>14</sup>, protože i IPEC-J2 buňky mohou diferencovat do buněk vykazujících vlastnosti enterocytů.

#### Vyjádření adherence

Adherence probiotických bakterií je nejčastěji vyjadřována jako procento bakterií adherovaných k počátečnímu množství bakterií přidaných k zvolenému médiu (např. k Caco-2 buňkám). V případě použití radioaktivně značených bakterií je adherence vyjádřena jako procento radioaktivity naměřené po adhezenci ve srovnání s radioaktivitou mikrobiální suspenze přidané k zvolenému médiu. Podobně i v případě využití fluorescenčního značení bakterií. Pro kvalitativní vyhodnocení procesu adherence jsou využívány elektronové mikroskopy.

### Závěr

Rozdíly v adhezenční schopnosti bakterií k mucinu, kulturám HT29-MTX a Caco-2:HT29-MTX (90:10) mohou být způsobeny rozdílným typem mucinu v uvedených modelech. V mnoha studiích bylo prokázáno, že adherence u různých metod *in vitro* se liší dokonce i u stejného kmene, což naznačuje, že bakteriální struktury zahrnuté do procesu vazby na epiteliální buňky a mukózní vrstvu mohou být rozdílné. Kromě toho bylo prokázáno, že adherence může být pozitivně ovlivněna takovými faktory, jako je použité médium, teplota a pH. Rovněž bivalentní ionty, jako třeba Ca<sup>2+</sup> mohou bakteriální adhezenci ovlivnit<sup>15</sup>. Ačkoli použití buněčných kultur místo extrahovaného mucinu lépe odpovídá situaci v živém organismu, je nutné rovněž vzít v úvahu typ buněk i strukturu buněčných kultur, protože to určuje povahu adhezních míst v systému. Proto využitím různých *in vitro* metod pro studium adhe-



rence získáme komplexnější informace o rozdílech v adhezní schopnosti jednotlivých bakteriálních kmenů a můžeme tak odlišit jednotlivé typy interakcí a molekul, které zprostředkují interakce mezi hostitelem a mikroorganismem.

#### Literatura

- <sup>1</sup> FORSTNER, J.F., FORSTNER, G.G. 1994. Gastrointestinal mucus; in Johnson LR (ed): Physiology of the Gastrointestinal Tract. New York, Raven Press, s. 1255-1283.
- <sup>2</sup> ATUMA, C., STRUGULA, V., ALLEN, A., HOLM, L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 280: s. G922-G929.
- <sup>3</sup> OUWEHAND, A.C., KIRJAVAINEN, P.V., SHORTT, C. AND SALMINEN, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.*, 9, s. 43-52.
- <sup>4</sup> DUNNE, C., O'MAHONY, L., MURPHY, L., THORNTON, G., MORRISSEY, D., O'HALLORAN, S., FEENEY, M., FLYNN, S. ET AL. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, s. S386-S392.
- <sup>5</sup> PAN, W.H., LI, P.L., LIU, Z.Y. 2006. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of Bifidobacterium strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 12, s. 148-152.
- <sup>6</sup> COCONNIER, M., KLAENHAMMER, T.R., KERNEIS, S., BERNET, M. AND SERVIN, A.L. 1992. Protein-mediated adhesion of Lactobacillus acidophilus BG2F04 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, s. 2034-2039.
- <sup>7</sup> IZQUIERDO, E., MEDINA, M., ENNAHAR, S., MARCHIONI, E. AND SANZ, Y. 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for bifidobacterium longum strains. *Curr. Microbiol.*, 56, s. 613-618.
- <sup>8</sup> LAPARRA J.M., SANZ Y. 2009. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, s. 695-701.
- <sup>9</sup> LI, X.J., YUE, L.Y., GUAN, X.F. AND QIAO, S.Y. 2008. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *J. Appl. Microbiol.*, 104, s. 1082-1091.
- <sup>10</sup> BIANCHI, M.A., DEL RIO, D., PELLEGRINI, N., SANSEBASTIANO, G., NEVIANI, E. AND BRIGHENTI, F. 2004. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, s. 301-305.
- <sup>11</sup> PONTIER, C., PACHOT, J., BOTHAM, R., LENFANT, B. AND ARNAUD, P. 2001. HT29-MTX and Caco-2 / TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *J. Pharm. Sci.*, 90, s. 1608-1619.
- <sup>12</sup> PETERSON, M.D. AND MOOSEKER, M.S. 1992. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BB6 clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J. Cell Sci.*, 102, s. 581-600.
- <sup>13</sup> CROCIANI, J., GRILL, J.P., HUPPERT, M. AND BALLONGUE, J. 1995. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21, s. 146-148.
- <sup>14</sup> LARSEN N, NISSEN P, WILLATS W.G.T. 2007. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, s. 113-119.
- <sup>15</sup> ZARATE, G., MORATA DE, A.V., PEREZ, C.A., GONZALEZ, S. 2002. Some factors affecting the adherence of probiotic Propionibacterium acidipropionic CRL 1198 to intestinal epithelial cells. *Can. J. Microbiol.* 48, s. 449-457

Další použitá literatura je k dispozici u autorů.

#### Poděkování

Tato práce byla podporována prostředky projektu MZe ČR - QI 91B274 (NAZV-VAK 2008, program Potravinářství).

Přijato do tisku 4. 1. 2011  
Lektorováno 24. 1. 2011

## KYSELINA MLÉČNÁ JAKO POLOPRODUKT K VÝROBĚ POLYLAKTÁTŮ A BIODEGRADOVATELNÝCH PLASTŮ

Binder M.<sup>1</sup>, Drbohlav J.<sup>1</sup>, Šalaková A.<sup>1</sup>, Nehyba A.<sup>2</sup>, Sedlařík V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> VÚM s.r.o. Praha

<sup>2</sup> Milcom a.s. Praha

<sup>3</sup> Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

### Lactid acid as semi product for the production of polylactates and bio-degradable plastics

#### Abstrakt

Sladká syrovátka je v současné době pro většinu sýráren, kde vzniká při výrobě sýrů, odpadním produktem. Poslední trendy ve výzkumu biodegradovatelných plastů na bázi polylaktátů, které by měly sloužit k balení např. potravinářských a dalších výrobků, využívají jako základní surovinu kyselinu mléčnou. Cílem této práce bylo optimalizovat přípravu kyseliny mléčné ze syrovátky, která je významným zdrojem laktózy. Byla sestavena aparatura pro fermentaci sladké syrovátky a na základě výsledků předcházejícího výzkumu vybrán vhodný kmen *Lbc. helveticus* CCDM 98 a zvolena optimální fermentační teplota 42 °C. Jako alternativní surovina byl místo syrovátky použit permeát - odpadní produkt získaný průmyslovou ultrafiltrací odtučněného mléka při výrobě proteinového koncentrátu. Byly použity tři druhy syrovátky a dva druhy permeátu. Některé fermentace proběhly za přidavku suplementu kvasničného extraktu. Průběhy pH v čase u jednotlivých fermentací byly znázorněny graficky a další výsledky sestaveny do tabulky. K posunu reakční rovnováhy byla vznikající kyselina mléčná neutralizována uhličitánem vápenatým. Vzniklý mléčan vápenatý byl konvertován kyselinou sírovou na kyselinu mléčnou a vedlejší produkt síran vápenatý byl dekantací a vakuovou filtrací odstraněn. Následně byla separovaná kyselina mléčná zahuštěna na vakuové odparce a podrobena analýze na obsah především L-kyseliny mléčné a D-kyseliny mléčné a zbytkové laktózy. Z dosavadních výsledků se jako nejlepší jeví fermentace syrovátky s přidávkou 0,5 % kvasničného autolyzátu a uhličitánem vápenatým přidávaného jednorázově na začátku fermentace nebo postupně v průběhu fermentace, za použití 11 % inokula *Lbc. helveticus* CCDM 98, kdy došlo k více jak 90 % konverzi laktózy na kyselinu mléčnou.

**Klíčová slova:** syrovátka, permeát, polylaktát, biodegradovatelné plasty

#### Abstract

Sweet whey, which is a by-product in cheese processing, is considered for the most cheese dairies as a waste product.

## **Vliv kultivace kmene *Lactobacillus acidophilus* ve formě biofilmu na probiotické vlastnosti**

**Kadlec R., Jakubec M., Ryšávka P.,**

### **1 Abstrakt**

Probiotika jsou živé mikroorganismy, která pokud jsou přijímána v dostatečném množství působí pozitivním účinkem na hostitele. Mechanismus účinku je různorodý a zahrnuje: vylepšení gastrointestinální bariéry, modifikaci střevní mikroflóry pomocí indukce produkce antimikrobiálních peptidů hostitelem, uvolňování probiotických antimikrobiálních faktorů, kompetice pro adhezenci na střevní epitel a imunomodulaci hostitele. S mechanizmy účinku a průchodu hostitelským gastrointestinálním systémem jsou spojeny i probiotické testy vyžadované po probiotických kmenech. Mezi hlavní zkoumané parametry patří schopnost odolání sníženému pH, schopnost odolání žlučí, schopnost inhibice růstu patogenních kmenů a adherence na tkáňové kultury simulující střevní epitel.

Zde byly zkoumány vybrané parametry nové formy probiotického preparátu – biofilmové probiotikum. To je tvoří probiotický kmen *Lactobacillus acidophilus* 10B narostlý na částicích biofilmu. Vlastnosti biofilmu se značně liší od planktonické formy v mnoha ohledech z nichž nejzajímavější parametry z hlediska probiotických vlastností je odolnost vůči environmentálním vlivům, antimikrobiálním látkám a zvýšená schopnost kompetice ve vícedruhovém prostředí {Mah, 2001, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents}.

Bylo provedeno srovnání planktonické a biofilmové formy probiotika *Lactobacillus acidophilus* v následujících vlastnostech (i) odolnost proti sníženému pH, (ii) odolnost proti působení žlučových solí, (iii) odherence na tkáňové kultury a polystyren, (iv) schopnost inhibice růstu patogenních kmenů a (v) rezistence vůči antibiotikům.

Biofilmový typ probiotika vykázal odlišné parametry než typ planktonický. Mezi změněné parametry patří: zvýšená odolnost proti nízkému pH; zvýšená odolnost proti působení žlučových solí; zvýšená adherence na polystyren; změna v inhibici patogenních kmenů. Nezměněna byla schopnost adherence na tkáňové kultury a odolnost vůči antibiotikům.

## 2 Metodika

### 2.1 Vzorky

Na všechny metodiky byly použity následující vzorky:

- Vzorek lyofilizovaných bakterií kmene 10B adherovaných na biofilmu. Před vlastní analýzou byl tento vzorek rozpuštěný v temperovaném MRS bujónu (K+)
- Vzorek planktonických bakterií kmene 10B - připravená 24 hodinová kultura (K-)

### 2.2 Miles-Misra plotnová metoda

CFU všech vzorků bylo určeno pomocí modifikované metody Miles-Misra {Hedges, 2002, Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts; Miles, 1979, CITATION CLASSIC - ESTIMATION OF THE BACTERICIDAL POWER OF THE BLOOD}. Vzorek je rozředěn ve fosfátovém pufru (NaCl – 8 g/l; KCl - 0,24 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O - 2,88 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,24 g/l; všechny chemikálie – p.a. Penta) a rozkapán na misku v objemu 10 μl. Po inkubaci je spočítáno množství kolonií v jedné kapce a přepočítáno na celkové množství CFU v ml pomocí následujícího vzorce. Po inkubaci byly spočítány viditelně oddělené kolonie bakterií a CFU bylo spočítáno podle vzorce:

$$CFU \cdot ml^{-1} = \frac{(CFU / \text{objem kapky})}{\text{zředění}}$$

kde:

CFU – počet spočítaných kolonií v kapce

zředění – řád zředění ve tvaru 10<sup>-x</sup>

Po logaritmaci výsledků byla spočítána směrodatná odchylka měření podle vzorce:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

kde:

$\bar{x}$  = aritmetický průměr

n – počet spočítatelných kapek

### 2.3 Statistické vyhodnocení - T-test

Na vyhodnocení v bodech 2.1 až 2.3 byl použit Studentův dvouvýběrový nepárový T-test. Tento test dokáže určit, zda dvě normální rozdělení mající stejný rozptyl, z nichž pochází dva nezávislé výběry, mají stejné střední hodnoty. Tedy že pocházejí z jednoho stejného vzorku. Shodnost rozptylů byla ověřena F-testem. Pokud výsledná hodnota  $p > 0,05$  jsou rozptyly obou dat stejné a může být použit T-test.

T-test je následně vypočítán podle vzorce:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1 X_2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

kde:

$$S_{X_1 X_2} = \sqrt{\frac{1}{2}(S_{X_1}^2 + S_{X_2}^2)}$$

$S_{X_1}$  – směrodatná odchylka souboru 1

$S_{X_2}$  – směrodatná odchylka souboru 2

$\bar{X}_1$  – průměr souboru 1

$\bar{X}_2$  – průměr souboru 2

$n_1$  – počet hodnot v souboru 1

$n_2$  – počet hodnot v souboru 2

Vypočítána hodnota byla srovnána jako s tabelovanými hodnotami pro hladinu významnosti 0,05 a převedena na p. Pokud  $p < 0,05$  jsou soubory se skupin s odlišnou střední hodnotou – jsou tedy odlišné při 95% pravděpodobnosti.

#### **2.4 Vliv biofilmu na přežívání kmene 10B roztoku solí o nízkém pH**

Byl připraven roztok solí simulující prostředí žaludku o složení: NaCl (2.05 g.l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.60 g.l<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0.11 g.l<sup>-1</sup>) a KCl (0.37 g.l<sup>-1</sup>) {Corcoran, 2005, Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars}. V roztoku bylo upraveno pH pomocí 1 M HCl na pH 1, 2 a 3. V těchto připravených roztocích byly oba dva vzorky inkubovány 2 hodiny na třepačce při 37°C. V časech 0,5, 1 a 2 hodiny byl odebrán vzorek a bylo v něm neutralizováno pH pomocí 1 M NaHCO<sub>3</sub>. Počet CFU ve vzorku byl určen pomocí modifikované plotnové metod Miles-Misra. Každý pokus byl proveden ve třech opakováních. Všechny uvedené chemikálie jsou kvality p.a. NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, HCl – Penta, zbývající chemikálie – Sigma.

#### **2.5 Vliv biofilmu na přežívání kmene 10B v roztoku žluči**

Vzorek K+ a K- byl inkubován v 0,3% roztoku žluči (Bile porcine - Sigma) po dobu 4 hodin při 37°C {Ruas-Madiedo, 2005, Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria}. Každou hodinu byl odebrán vzorek a bylo určeno CFU pomocí modifikované plotnové metody Miles-Misra. Každý pokus byl proveden ve třech opakováních.

#### **2.6 Vliv biofilmu na schopnost adherence kmene 10B na polystyren a na tkáňovou kulturu HT29**

Vzorek K+ a K- byl inkubován na tkáňové kultuře nebo na polystyrenu po dobu 0, 1, 2, a 3 hodin. Následně byl roztok nad povrchem odsán a povrch byl třikrát promyt připraveným fosfátovým pufrům (pH 7,4) {Gleinser, 2012, Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the Bifidobacterium bifidum-specific lipoprotein BopA}. U tkáňové kultury byl následně přidán trypsin (prasečí - 0,12% SAFC Biosciences) a po uvolnění buněk se substrátu byl přidán fosfátový pufr a vzorek byl ultrazvukován (ultrazvukový generátor o síle 2 krát 180 W nastavený - 60%/SWEEP). U polystyrenu byla mikrozkuřavka s adherovanými bakteriemi a fosfátovým pufrům přímo ultrazvukována. Následně byla určeno CFU pomocí modifikované plotnové metody Miles-Misra. Každý pokus byl připraven ve třech opakováních.

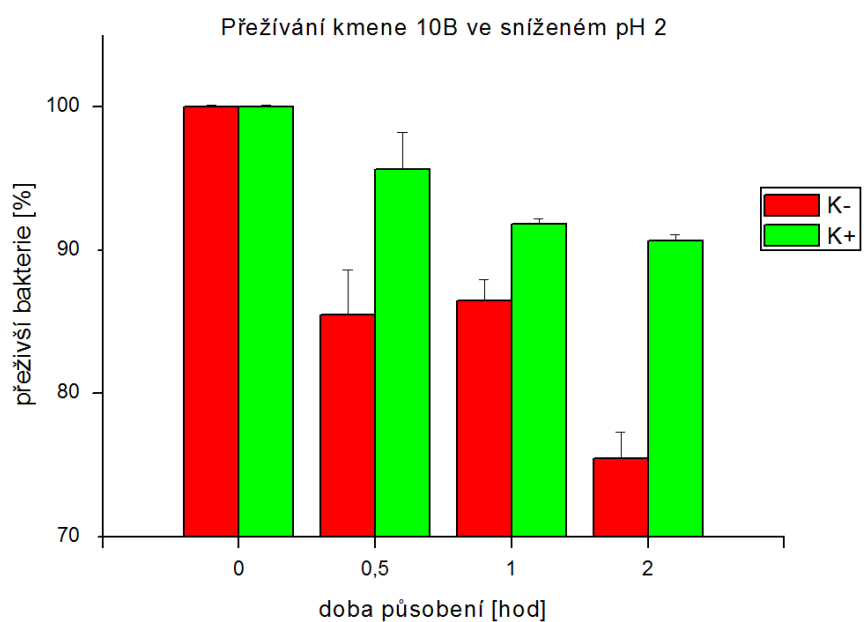
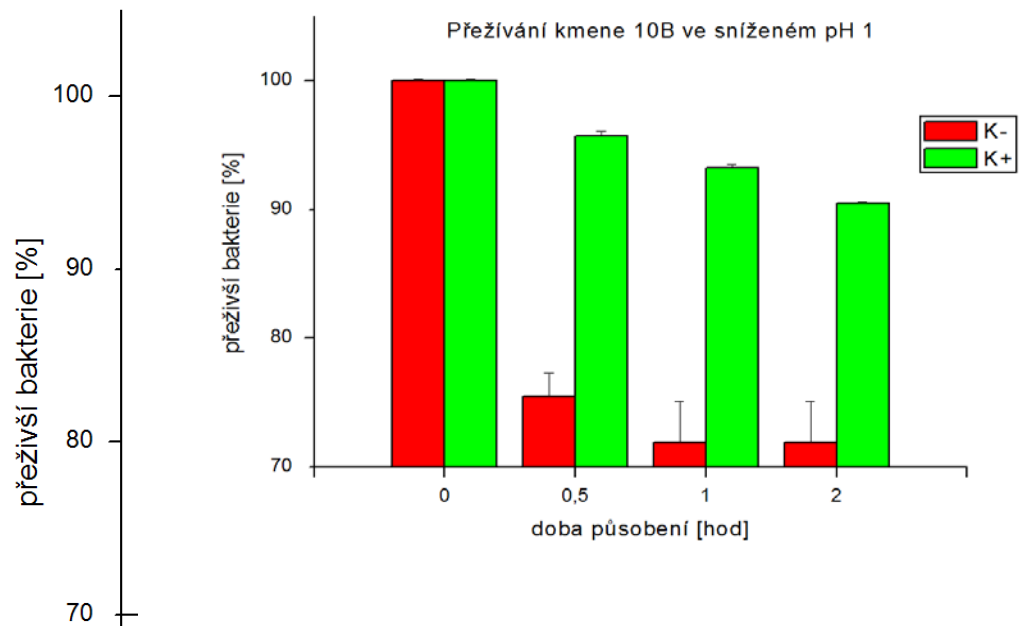
#### **2.7 Inhibice růstu vybraných patogenních kmenů**

Vzorky K+ a K- byly zlyzovány pomocí vysokoúčinného ultrazvukového homogenizátoru (SONOPULS HD 3400 – 400W amplituda 80% + pulzace 4 sekundy). Následně byly lyzované vzorky přefiltrovány přes bakteriální filtr 0,45 μm. Následně byly na misky s agarem a rozetřenými patogeny nakapáno 10 μl takto zlyzovaného vzorku a také 10 μl vzorku viabilních bakterií K+ a K- {Yesillik, 2011, Antibacterial Effects of Some Fermented Commercial and Homemade Dairy Products and 0.9% Lactic Acid against Selected Foodborne Pathogens}. Po inkubaci 24 hodin při 37°C (*Clostridium sordelli*- anaerobně) byly odečteny vzniklé inhibiční zóny. Test byl opakován dvakrát a uveden je průměr těchto výsledků vyjádřený jako rezistence, senzitivita či neurčitelnost.

#### **2.8 Měření sensitivity + rezistence kmene 10B vůči vybraným antibiotikům**

Měření rezistence a senzitivity kmene 10B vůči antibiotikům bylo měřeno klasickou diskovou difúzní metodou při použití papírových antibiotických štítků {Bauer Aw, 1959, Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci: An analysis of technique and results}. Test byl opakován třikrát a uveden je průměr těchto výsledků vyjádřený jako rezistence, senzitivita či neurčitelnost.

### 3.1 Vliv biofilmu na přežívání kmene 10B roztoku solí o nízkém pH



**Graf č. 1,2 a 3:** Vliv sníženého pH na procento přeživších bakterií planktonických (K-) a biofilmových (K+) bakterií kmene 10B.

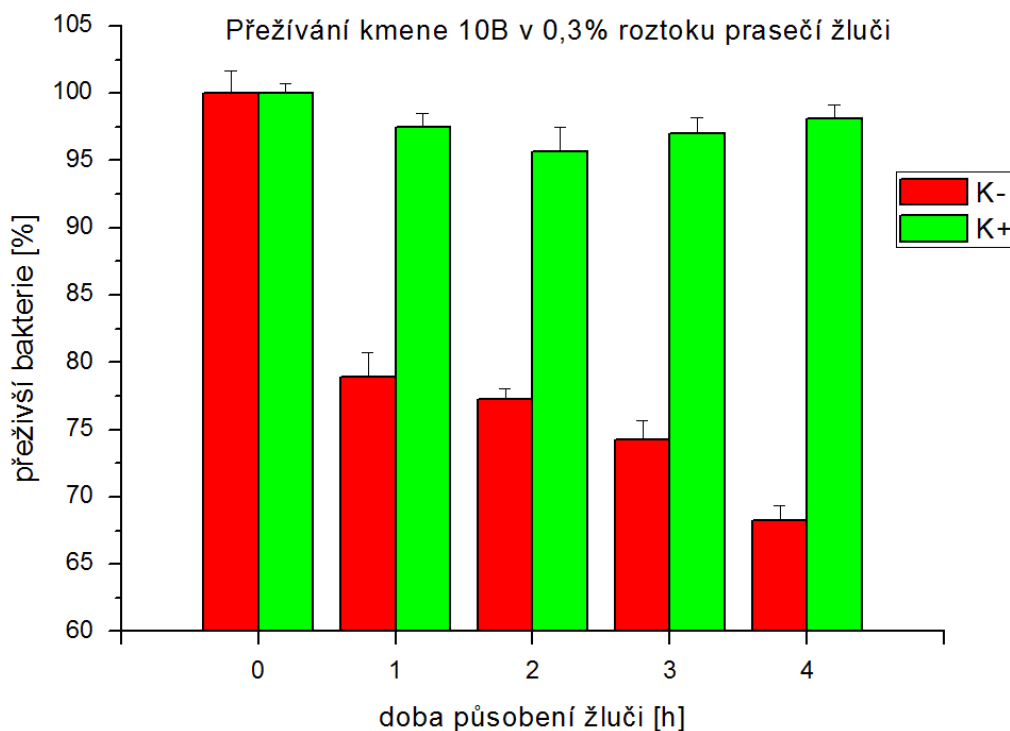
**Tabulka č. 1:** Tabulka naměřených hodnot CFU použitých v grafu č. 1, 2 a 3.

pH	doba	průměr změny CFU bez biofilmu [%]	směrodatná odchylka – bez biofilmu [%]	průměr změny CFU s biofilmem [%]	směrodatná odchylka – s biofilmem [%]
X	0	100	0,10133	100	0,1134
1	0,5	75,47856	1,84712	95,7039	0,35319
	1	71,93963	3,15767	93,2497	0,24792
	2	71,93963	3,15767	90,48988	0,10651
2	0,5	85,48085	3,15767	95,6384	2,56939
	1	86,50248	1,45074	91,84896	0,3307
	2	75,47856	1,84712	90,65764	0,41766
3	0,5	84,76921	2,3271	94,83307	0,33665
	1	88,38672	1,31055	94,82653	0,4451
	2	75,47856	1,84712	93,79761	0,72641

**Tabulka č. 2:** Výsledky statistických analýz.

pH	čas	p-rozptylu	p – dvouvýběrový t-test	Statisticky významný rozdíl
1	0,5	>0,05	<0,05	ANO
	1	>0,05	<0,05	ANO
	2	>0,05	<0,05	ANO
2	0,5	0,0076408125	<0,05	NEHODNOTITELNÉ
	1	>0,05	<0,05	ANO
	2	>0,05	<0,05	ANO
3	0,5	>0,05	<0,05	ANO
	1	0,0088497179	<0,05	NEHODNOTITELNÉ
	2	>0,05	<0,05	ANO

### 3.2 Vliv biofilmu na přežívání kmene 10B v roztoku žluči





**Graf č. 4:** Procento přeživších bakterií při působení žluči 0,3% prasečí žluči. (K+ probiotikum na biofilmu; K- planktonická forma)

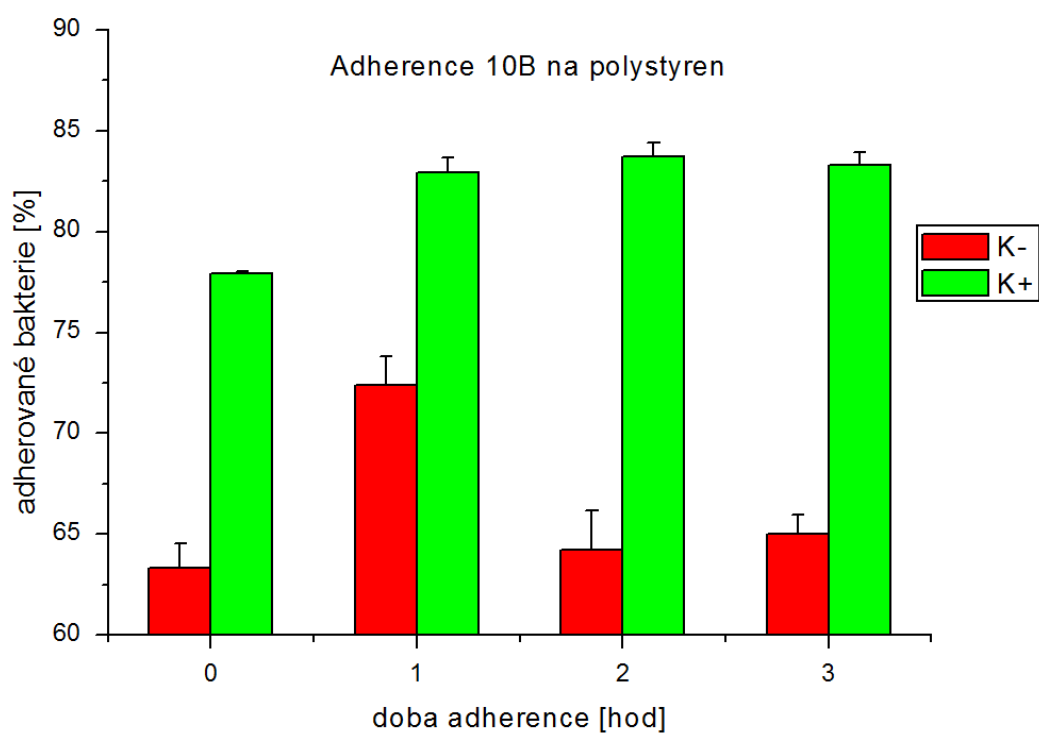
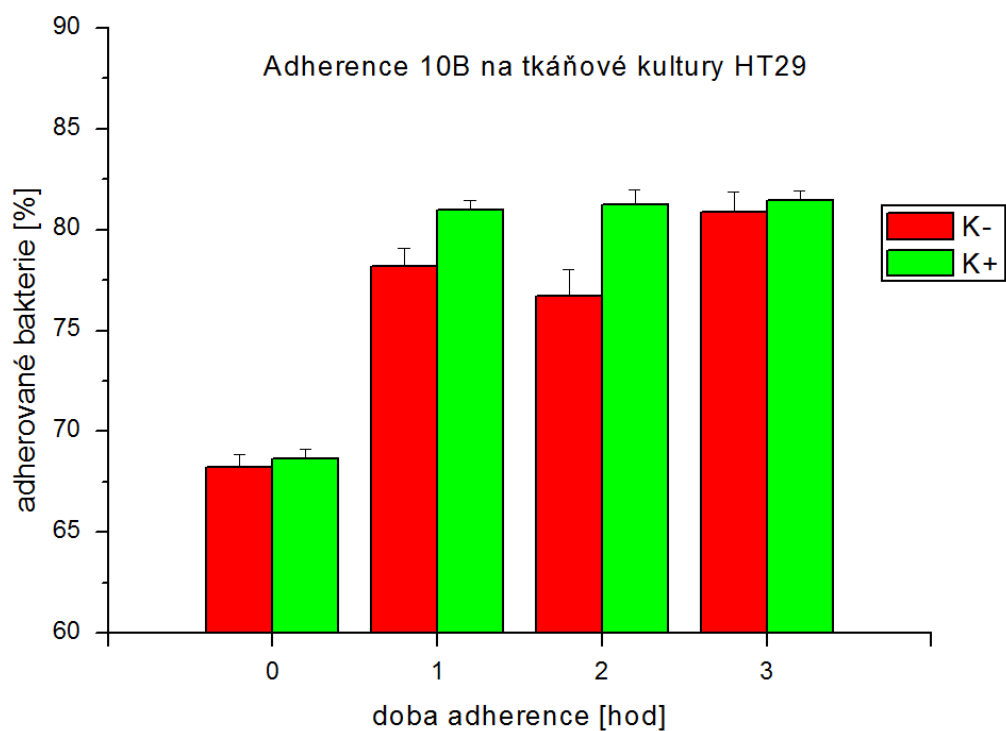
**Tabulka č. 3:** Naměřené hodnoty použité v grafu č. 4.

doba působení 0,3% žluči [hod]	průměr změny CFU bez biofilmu [%]	směrodatná odchylka – bez biofilmu [%]	průměr změny CFU s biofilmem [%]	směrodatná odchylka – s biofilmem [%]
0	100	1,64875	100	0,73736
1	78,91281	1,80939	97,47786	0,99634
2	77,27194	0,74756	95,64432	1,85993
3	74,23406	1,44467	96,99977	1,16814
4	68,2458	1,12057	98,15343	0,96784

**Tabulka č. 4:** Výsledky statistických analýz.

doba působení 0,3% žluči [hod]	p-rozptylu	p – dvouvýběrový t-test	Statisticky významný rozdíl
1	>0,05	<0,05	ANO
2	>0,05	<0,05	ANO
3	>0,05	<0,05	ANO
4	>0,05	<0,05	ANO

### **3.3 Vliv biofilmu na schopnost adherence kmene 10B na polystyren a na tkáňovou kulturu HT29**



**Graf č. 5 a 6:** Procento adherovaných buněk na HT29 a na polystyren – srovnání při použití biofilmu.

**Tabulka č. 5:** Naměřené hodnoty použité v grafech č. 4 a 5.



Doba adherence [hod]	Adherence na HT29				Adherence na polystyren			
	K-		K+		K-		K+	
	CFU [%]	směrodatná odchylka [%]	CFU [%]	směrodatná odchylka [%]	CFU [%]	směrodatná odchylka [%]	CFU [%]	směrodatná odchylka [%]
0	68,2046	0,67756	68,67109	0,44219	63,34212	1,22415	77,92095	0,10095
1	78,1756	0,89996	81,00262	0,44417	72,40964	1,40091	82,90424	0,77736
2	76,72687	1,32312	81,23935	0,74903	64,23841	1,91254	83,72657	0,66673
3	80,85035	1,00655	81,47302	0,47221	65,01422	0,93796	83,28369	0,65737

**Tabulka č. 6:** Výsledky statistických analýz.

	čas	p-rozptylu	p – dvouvýběrový t-test	Statisticky významný rozdíl
HT29	0	>0,05	0,292712367	NE
	1	>0,05	0,157481809	NE
	2	0,0485400242	<0,05	NEHODNOTITELNÉ
	3	>0,05	0,30547547	NE
Polystyren	0	>0,05	<0,05	ANO
	1	>0,05	<0,05	ANO
	2	0,0117093427	<0,05	NEHODNOTITELNÉ
	3	>0,05	<0,05	ANO

### 3.4 Inhibice růstu vybraných patogenních kmenů

**Tabulka č. 4:** Výsledky měření inhibice patogenních kmenů (S – senzitivita, R – rezistence, I – neurčitelnost).

Kmen	S/R/I			
	Živé buňky		Lyzát	
	bez biofilmu	s biofilmem	bez biofilmu	s biofilmem
<i>Listeria monocytogenes</i> HUB-3	S	I	R	R
<i>Clostridium sordelli</i> CCM 4611	S	S	R	R
<i>Escherichia coli</i> CCM 3988	I	S	I	I
<i>Shigella flexneri</i> HUB-9	R	R	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1960	R	R	R	R
<i>Salmonella ser. enteritidis</i> HUB-22	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	R	S	R	R
<i>Proteus vulgaris</i> CCM 1749	R	R	R	R
<i>Candida albicans</i> CCM 8269	R	R	R	R

### 3.5 Měření sensitivity + rezistence kmene 10B vůči vybraným antibiotikům

Planktonický kmen bez biofilmu a lyofilizovaný vzorek narostlý na biofilmu mají stejnou rezistenci a sensitivitu, která je uvedena v následující tabulce.

**Tabulka č. 5:** Výsledky difúzního testu (S – senzitivita, R – rezistence, I – neurčitelnost).

Antibiotikum	µg ATB/disk	S/R/I
Amoxycillin/Clavulanic acid 2:1	30	S
Penicillin G	10	S
Cephalothin	10	S
Enrofloxacin Baytril	5	R
Tetracycline	30	S
Ampicillin	10	S
Ceftiofur	30	S
Amoxycillin	25	S
Streptomycin	10	R
Sulphamethoxazol/ Trimethoprim	25	R
Sulphafurazol	300	R

## 4 Závěr

Lyofilizované probiotikum narostlé na biofilmu je odolnější ( $\alpha=0,05$ ) než probiotikum planktonické při působení roztoku solí o sníženém pH 1 a vůči 0,3% roztoku prasečí žluči. Při působení roztoku o pH 2 je probiotikum na biofilmu odolnější při době působení delší než je 0,5 hodiny. U roztoku o pH 3 zajišťuje biofilm ochranu před působením v časech 0,5 a 2 hodiny. Při působení 1 hodinu vykazuje i planktonická forma kmene 10B určitou formu adaptace.

Biofilm nezajišťuje lepší schopnost adherence kmene 10B na tkáňové kultury, ale umožňuje lepší adherenci na polystyren. To je pravděpodobně způsobeno hydrofobní interakcí částic biofilmu s povrchem polystyrenu.

Biofilm také posílil schopnost inhibice *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Escherichia coli* CCM 3988. Naproti tomu potlačil schopnost inhibice *Listeria monocytogenes* HUB-3. Schopnost kmene inhibovat *Clostridium sordelli* CCM 4611 zůstala nezměněna.

Růst na biofilmu neměl žádný vliv na rezistenci vůči antibiotikům. Kmen 10B je stále stejně senzitivní vůči antibiotikům uvedeným v tabulce č. 5.

## 5 Reference

- [1] T.F.C. Mah, and G.A. O'Toole, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology 9 (2001) 34-39.
- [2] A.J. Hedges, Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. International Journal of Food Microbiology 76 (2002) 207-214.
- [3] A.A. Miles, CITATION CLASSIC - ESTIMATION OF THE BACTERICIDAL POWER OF THE BLOOD. Current Contents/Life Sciences (1979) L12-L12.
- [4] B.M. Corcoran, C. Stanton, G.F. Fitzgerald, and R.P. Ross, Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. Applied and Environmental Microbiology 71 (2005) 3060-3067.
- [5] P. Ruas-Madiedo, and C.G. de los Reyes-Gavilan, Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. J Dairy Sci 88 (2005) 843-56.

- [6] M. Gleinser, V. Grimm, D. Zhurina, J. Yuan, and C.U. Riedel, Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA. *Microb Cell Fact* 11 (2012) 80.
- [7] S. Yesillik, N. Yildirim, A. Dikici, and A. Yildiz, Antibacterial Effects of Some Fermented Commercial and Homemade Dairy Products and 0.9% Lactic Acid against Selected Foodborne Pathogens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6 (2011) 189-195.
- [8] P.D.K.W. Bauer Aw, Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci: An analysis of technique and results. *Archives of Internal Medicine* 104 (1959) 208-216.

## ORIGINAL ARTICLE

**A novel flotation technique for the separation of nonadherent micro-organisms from a substrate**Robert Kadlec<sup>1</sup>, Martin Jakubec<sup>1</sup> and Zoran Jaglic<sup>2</sup><sup>1</sup> Dairy Research Institute, Ltd., Prague, Czech Republic<sup>2</sup> Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

**Significance and Impact of the Study:** This is the first study that suggests using flotation agents to separate planktonic from adhered bacteria. When a high-density solution is used, buoyancy of bacteria ensures their segregation in the solution. Flotation agents could be used instead of washing procedure, which is inaccurate and hardly reproducible. High-density flotation agents could be used for more precise evaluation of bacterial adherence in many assays, such as research of biofilms or evaluation of probiotics.

**Keywords**

adherence, biofilm, caesium chloride, flotation, washing procedure.

**Correspondence**

Martin Jakubec, Ke Dvoru 12a, Prague 6, 160 00, Czech Republic.

E-mail: M.Jakubec@email.cz

2013/2131: received 22 October 2013, revised 10 February 2014 and accepted 10 February 2014

doi:10.1111/lam.12234

**Abstract**

An understanding of adherence ability is crucial in many areas, for example, in research on biofilms, evaluation of probiotics or in biotechnology. In all these analyses, the reproducible washing is very important in the prevention of false results. During washing, the force, direction of the flow, position of the pipette tip, number of washing cycles, type of washing solution and the way of removing the washing solution can be sources of inappropriate stress to attached cells. To overcome these problems, we here propose the use of high mass density solutions as flotation agents. As the density of bacteria is lower than that of the flotation solutions, nonattached or weakly attached bacteria are moved to the surface due to hydrostatic force. Caesium chloride, ammonium nitrate and sodium diatrizoate solutions, which are commonly used as FAs, were compared with a standard method of rinsing. Several concentrations of agents were used to investigate the optimal concentration and influence of hydrostatic pressure on adhered micro-organisms. We show that flotation is a rapid method for distinguishing between adhered and weakly attached or loosed cells with reproducible results. Due to its range of possible mass density concentration, the best FA was shown to be caesium chloride.

**Introduction**

Most of the methods used for the study of adherence are based on nonflow cultivation in which the separation of adherent and planktonic bacteria can only be achieved by rinsing. The purpose of rinsing is to remove nonattached and weakly attached micro-organisms from the surface and to distinguish between actively adhered cells and the influence of sedimentation. For proper rinsing, the force and direction of flow should be the same in all experiments, and this can be difficult to achieve during manual rinsing (Hijikata *et al.* 1993; Nagasaka *et al.* 1997). Also, inadequate shear stress related to rinsing could cause the

release of attached bacteria or cell culture from the bottom of a well. In addition, different numbers of washing steps and different types of washing solution have been reported in the literature (Table 1). Such variability in the methodology of washing makes comparison between different studies difficult.

This problem could be overcome using a flotation technique for the separation of nonadhered bacteria from the substrate. Flotation with high mass density solutions has been variously used for the separation of DNA fragments (Aprodu *et al.* 2011), viruses (Hijikata *et al.* 1993; Nagasaka *et al.* 1997), isolation of bacteria (Vanittanakom *et al.* 1995; Wolffs *et al.* 2004; Lofstrom *et al.* 2011) or

**Table 1** Number of washing cycles during adherence experiments

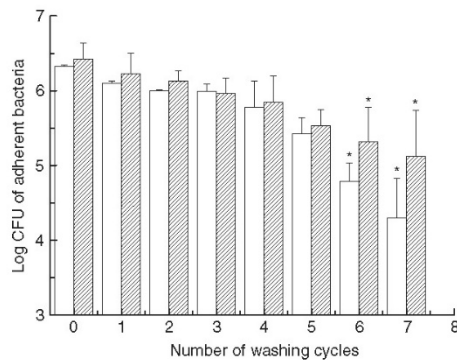
Number of washing cycles	Reference
2	Juntunen <i>et al.</i> (2001); Bianchi <i>et al.</i> (2004); Cepeljnik <i>et al.</i> (2007); Laparra and Sanz (2009)
3	(Tuomola and Salminen (1998); Forestier <i>et al.</i> (2001); Le Blay <i>et al.</i> (2004); Moussavi and Adams (2010)
4	Greene and Klaenhammer (1994); Jacobsen <i>et al.</i> (1999); Kapczynski <i>et al.</i> (2000); Huang <i>et al.</i> (2003)
5	Chauviere <i>et al.</i> (1992); Crociani <i>et al.</i> (1995)
6	Dibb-Fuller <i>et al.</i> (2001)

parasites (Cox 1970). As the mass density of bacteria or other elements is lower than that of the flotation solutions, nonattached bacteria are moved to the surface due to the hydrostatic force. The use of flotation represents a novel method, which could simplify and standardize procedures in research on adherence.

The aim of this study was to compare flotation with washing and to define the most suitable mass density for the most suitable flotation agent. We have tested three common used flotation agents (FAs): caesium chloride (CsCl), ammonium nitrate (NaNO<sub>3</sub>) and sodium diatrizoate.

## Results and discussion

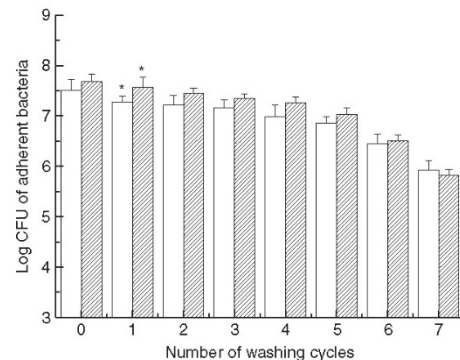
Figure 1 shows the results obtained after different numbers of washing cycles. There was an obvious decrease in



**Figure 1** Influence of number of washing cycles on numbers of adherent bacteria. Changes in adherent bacteria are on the y-axis (log CFU) and numbers of washing cycles on the x-axis. Bacterial solution was at OD<sub>600</sub> = 0.5. \* statistically significant difference between biofilm-positive and biofilm-negative strain (Student's *t*-test with *P* < 0.05). (□) Biofilm-negative strain and (▨) biofilm-positive strain.

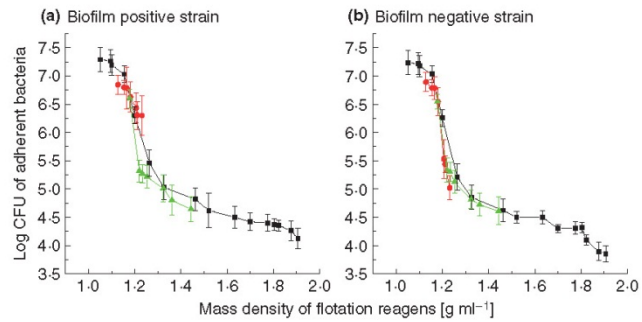
the number of adherent bacteria with increasing number of washing cycles. With all numbers of washing cycles, a steady decrease in adherent bacteria in both the biofilm-positive and the biofilm-negative strain was observed. This suggests that every washing step released some amount of adherent bacteria. The decrease in CFU in the samples of the biofilm-negative strain was more obvious when compared to the biofilm-positive strain, but overall the trend was similar. A comparison of fluorescent detection and plate count enumeration is shown in Fig. 2 and demonstrates that fluorescent and CFU count detection yielded similar results. This indicates that fluorescence could potentially be used for the detection of adherent and planktonic bacteria during flotation. However, due to low sensitivity (limit of detection is log 6), much higher concentration of used bacterial strain (OD<sub>600</sub> = 1) must be used through the experiments. This was the reason why we have used fluorescence detection only for verification of results from plate count enumeration methodology.

The results of the flotation experiments with different FAs are shown in Fig. 3. It was observed that most bacteria were abruptly released from the bottom after application of FAs with mass densities in the range of 1.13–1.30 g.ml<sup>-1</sup> regardless of the chemical nature of the FA. After further application of FA in concentrations higher than 1.40 g.ml<sup>-1</sup>, only a slight decrease in the number of attached cells was observed. The trend in both strains was the same but the flotation effect was higher for the biofilm-negative strain as more cells were floated



**Figure 2** Comparison of fluorescence detection and plate enumeration of biofilm-negative strain adherence with different numbers of washing cycles. Bacterial solution was at OD<sub>600</sub> = 1. \* statistically significant difference between plate enumeration and fluorescence (Student's *t*-test with *P* < 0.05). (□) Plate enumeration and (▨) Fluorescence detection.

**Figure 3** Influence of different mass densities of flotation agents on the numbers of adherent bacteria. Results from flotation of biofilm-positive (a) and biofilm-negative strain (b). (—) CsCl; (—) sodium diatrizoate and (—) NaNO<sub>3</sub>.



with same density of FA than in the biofilm-positive strain.

Linear regression was performed on data in Fig. 3, to compare flotation agents in mass densities up to 1.40 g·ml<sup>-1</sup>. Results are summarized in Table 2. Calculated slope corresponds to efficiency of used FAs (effect of increasing mass density on number of adherent bacteria). The highest overall efficiency was observed when CsCl was used (slope: 9.29 for biofilm positive and 9.72 for biofilm negative). FA with highest difference between both strains was diatrizoate (5.79 for biofilm positive and 19.56 for biofilm negative). NaNO<sub>3</sub> was least efficient (5.49 for biofilm positive and 5.55 for biofilm negative).

Apart from the mentioned FAs, we also tested several other chemicals that can be used as FAs, but most of them were discarded due to their high toxicity for the bacterial strains used (ethylene glycol), high viscosity (sucrose, dextran) or low mass densities of the prepared solutions (magnesium sulphate, polyethylene glycol, PERCOLL).

Flotation is a widely used method for separation of DNA (Okamoto *et al.* 1998), virus particles or parts of cells (Jones and Matus 1974). However, this is the first study to report the use of flotation for the separation of bacteria. The use of the hydrostatic pressure of the FA is the underlying principle of flotation. Hydrostatic pressure can be expressed using a simple equation:

$$F_h = V_{\text{bac}} \cdot \rho_{\text{fa}} \cdot g \quad (1)$$

where  $V_{\text{bac}}$  is the volume of bacteria,  $\rho_{\text{fa}}$  is the mass density of the used FA and  $g$  is gravitational acceleration. It is quite difficult to determine the mass density of bacteria. The exact mass density for *Staphylococcus epidermidis* is not known, but, for example, the mass density of *Escherichia coli* was determined to be about 1.160 g·ml<sup>-1</sup> (Godin *et al.* 2007). Moreover, cell density is affected by cell age, storage conditions and solution tonicity. Also, it was observed that extracellular polymer substances of biofilm-positive strains are produced constantly and are attached to the surface of cells (Ruzicka *et al.* 2007). These high-molecular-weight polymers could also alter the final cell density. It is highly probable that the mass density of a particular bacterial strain is not represented by an exact value but rather moves within certain ranges. In these particular strains, the value seems to be between 1.13 and 1.30 g·ml<sup>-1</sup>. The density of the FA should always be higher than the density of bacteria; otherwise, the flotation effect will only be partial or slower. We have shown that a FA density higher than 1.40 g·ml<sup>-1</sup> gives reproducible results, which is sufficient for the separation of most planktonic and weakly adhered bacteria.

The decreasing numbers of adherent bacteria with the number of washing cycles observed in this study were in accordance with results obtained by some other authors

**Table 2** Linear regression of flotation results

Flotation agent	Biofilm positive			Biofilm negative		
	R <sup>2</sup> *	Slope coefficient	STE†	R <sup>2</sup> *	Slope coefficient	STE†
CsCl	0.8981	-9.288	0.4005	0.8881	-9.720	0.4418
NaNO <sub>3</sub>	0.6118	-5.493	0.5602	0.6075	-5.556	0.5719
Diatrizoate	0.4435	-5.785	0.8927	0.7955	-19.57	1.271

Only results from flotation up to 1.40 g ml<sup>-1</sup> are used.

\*Coefficient of determination.

†Standard error of slope coefficient.

(Table 1). These authors have tried to optimize the number of washing steps for their specific assay. This, however, has led to a certain degree of variability in the results obtained making comparison between different studies quite difficult. The use of flotation could solve this problem through the use of standardized solutions that (if the mass densities are high enough) yield reproducible results in the number of remaining adherent bacteria.

In conclusion, high concentrations of CsCl and NaNO<sub>3</sub> with mass densities of 1.40 g.ml<sup>-1</sup> and higher could be used for the separation of planktonic and adherent bacteria. The method may also find application outside the area of research on bacterial attachment with several others nontoxic high-density chemicals.

## Material and methods

### Bacterial strains and cultivation protocol

The bacterial strains used in the experiments were type strains of *Staph. epidermidis*, which were previously determined as biofilm positive (Czech collection of microorganisms – CCM 4418) and biofilm negative (CCM 7221) according to the microtitre plate assay and to the presence of the *ica* locus (Ruzicka *et al.* 2004). The biofilm-positive strain has shown a greater ability to adhere in comparison with the biofilm-negative strain. Before the experiment, each strain was cultivated for 24 hours in tryptic soy broth (Sigma, Rodermark, Germany), at 37°C under aerobic conditions and with agitation. Bacterial cultures were then centrifuged and resuspended in phosphate buffer saline (PBS; pH = 7.5) and diluted to OD<sub>600</sub> = 0.5.

### Flotation agents and chemicals

The following flotation agents were tested: caesium chloride, sodium diatrizoate and sodium nitrate. All the laboratory chemicals and the FAs used in this study were of reagent grade purity and were purchased from Sigma, Germany. The FAs were dissolved in sterile PBS before use. Maximal-achieved concentrations and mass (measured using a pycnometer; Kavalierglass, a.s., Czech republic) were as follows: CsCl – 1.956 g.ml<sup>-1</sup>; diatrizoate – 1.220 g.ml<sup>-1</sup>; and NaNO<sub>3</sub> – 1.426 g.ml<sup>-1</sup>. Listed mass densities were maximal, and we used several different mass densities of each FA in the flotation assay. The FAs were also tested for their toxicity against the bacterial strains used in this study (see Table S1). After one hour of exposure to FA, the viability of bacteria was determined by measuring colony-forming units (CFU) after cultivation on tryptic soy agar (Sigma) for 24 h at 37°C. The survival rate of the bacterial strains after exposure to FAs was in all cases higher than 95%.

### Flotation and washing assay

The bacterial strain solutions in PBS (150 µl; prepared as described above) were incubated for one hour at 37°C in a transparent 96-well microtitre polystyrene plate (Nalge Nunc International, Penfield, NY, USA). To separate nonattached cells, 150 µl of FA of different mass densities was added. The same volume of PBS was used as a blank.

Simultaneously, the washing procedure was also tested. The solution was gently aspirated using a micropipette from the side of the well, and 300 µl of PBS was evenly added with the same position of the pipette tip. This was repeated in the range of one to seven washes. After flotation/washing, the content of the well was discarded. Bacterial cells were finally released by adding 150 µl of PBS to the well followed by sonication in an ultrasound bath (Ecoson, 180 W, 8 min). The numbers of adhered cells were determined by plate enumeration (CFU counting) on tryptic soy agar plates after incubation under aerobic conditions at 37°C for 24 hours. Each experiment was performed with three separate aliquots and in three independent replicates. Statistic evaluation of washing results was performed by Student's two sample independent *t*-test with null hypothesis that adhesion of biofilm-positive and biofilm-negative strains is not different in each step of washing. Results from flotation was evaluated by linear regression up to 1.4 g.ml<sup>-1</sup>. Slope of all three flotation agent was calculated, and results were compared.

### Plate enumeration verification

The plate enumeration (CFU counting) and correlation with number of adhered cells were verified using fluorescent staining (Syto 24; Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA). The fluorescence was measured using a Synergy fluorescent reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). To draw the calibration line of dependence between fluorescence and CFU, tenfold serial bacterial dilutions with known numbers of CFU were stained with Syto 24. The adhered cells were then quantified after different numbers of washing cycles using both plate enumeration and fluorescent staining. Plate enumeration correlated highly with fluorescent staining (Fig. 2). Due to the relatively low sensitivity of the fluorescent staining (detection limit of 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) and partial inhibition of fluorescence by FAs (especially by CsCl), plate enumeration (CFU counting) was selected as the method of choice for quantification of adhered cells. Statistical evaluation of the results was performed by Student's two sample independent *t*-test with null hypothesis that results from fluorescent detection and plate counting are indifferent in each step of washing.

### Acknowledgements

The work was financially supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (MZe CZ -QJ1310258 and project QJ1210301) and by institutional support for the research organizations - CZ No. RO0513.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Aprodu, I., Walcher, G., Schelin, J., Hein, I., Norling, B., Radstrom, P., Nicolau, A. and Wagner, M. (2011) Advanced sample preparation for the molecular quantification of *Staphylococcus aureus* in artificially and naturally contaminated milk. *Int J Food Microbiol* **145**, 61–65.
- Bianchi, M.A., Del Rio, D., Pellegrini, N., Sansebastiano, G., Neviani, E. and Brighenti, F. (2004) A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Lett Appl Microbiol* **39**, 301–305.
- Cepeljnik, T., Lah, B., Narat, M. and Marinsek-Logar, R. (2007) Adaptation of adhesion test using Caco-2 cells for anaerobic bacterium *Pseudobutyryivibrio xylanivorans*, a Probiotic candidate. *Folia Microbiol* **52**, 367–373.
- Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Fourniat, J. and Servin, A.L. (1992) Adhesion of human *Lactobacillus Acidophilus* strain Lb to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J Gen Microbiol* **138**, 1689–1696.
- Cox, F.E.G. (1970) Separation of parasites in sucrose gradients. *Nature* **227**, 192–194.
- Crociani, J., Grill, J.P., Huppert, M. and Ballongue, J. (1995) Adhesion of different *Bifidobacteria* strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in-vivo study. *Lett Appl Microbiol* **21**, 146–148.
- Dibb-Fuller, M.P., Best, A., Stagg, D.A., Cooley, W.A. and Woodward, M.J. (2001) An in-vitro model for studying the interaction of *Escherichia coli* O157: H7 and other enteropathogens with bovine primary cell cultures. *J Med Microbiol* **50**, 759–769.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. and Joly, B. (2001) Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol* **152**, 167–173.
- Godin, M., Bryan, A.K., Burg, T.P., Babcock, K. and Manalis, S.R. (2007) Measuring the mass, density, and size of particles and cells using a suspended microchannel resonator. *Appl Phys Lett* **91**, 121–123.
- Greene, J.D. and Klaenhammer, T.R. (1994) Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4487–4494.
- Hijikata, M., Shimizu, Y.K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J.W., Alter, H.J., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1993) Equilibrium centrifugation studies of Hepatitis C virus evidence for circulating immune complexes. *J Virol* **67**, 1953–1958.
- Huang, T.T., Sturgis, J., Gomez, R., Geng, T., Bashir, R., Bhunia, A.K., Robinson, J.P. and Ladisch, M.R. (2003) Composite surface for blocking bacterial adsorption on protein biochips. *Biotechnol Bioeng* **81**, 618–624.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. *et al.* (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**, 4949–4954.
- Jones, D.H. and Matus, A.I. (1974) Isolation of synaptic plasma-membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* **356**, 276–287.
- Juntunen, M., Kirjavainen, P.V., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. and Isolauri, E. (2001) Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 293–296.
- Kapczynski, D.R., Meinersmann, R.J. and Lee, M.D. (2000) Adherence of *Lactobacillus* to intestinal 407 cells in culture correlates with fibronectin binding. *Curr Microbiol* **41**, 136–141.
- Laparra, J.M. and Sanz, Y. (2009) Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol* **49**, 695–701.
- Le Blay, G.L., Fliss, I. and Lacroix, C. (2004) Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods. *J Microbiol Methods* **59**, 211–221.
- Lofstrom, C., Schelin, J., Norling, B., Vigre, H., Hoorfar, J. and Radstrom, P. (2011) Culture independent quantification of *Salmonella enterica* in carcass gauze swabs by flotation prior to real-time PCR. *Int J Food Microbiol* **145**, S103–S109.
- Moussavi, M. and Adams, M.C. (2010) An in vitro study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations. *Curr Microbiol* **60**, 327–335.
- Nagasaka, A., Hige, S., Matsushima, T., Yoshida, J., Sasaki, Y., Tsunematsu, I. and Asaka, M. (1997) Differential flotation centrifugation study of hepatitis C virus and response to interferon therapy. *J Med Virol* **52**, 190–194.
- Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1998) Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* **56**, 128–132.
- Ruzicka, F., Hola, V., Votava, M., Tejkalova, R., Horvat, R., Heroldova, M. and Woznicova, V. (2004) Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol* **49**, 596–600.
- Ruzicka, F., Horka, M., Hola, V. and Votava, M. (2007) Capillary Isoelectric Focusing - Useful tool for detection of the biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Microbiol Methods* **68**, 530–535.



Tuomola, E.M. and Salminen, S.J. (1998) Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol* **41**, 45–51.

Vanittanakom, N., Mekaprateep, M., Sriburee, P., Vanittanakom, P. and Khanjanasthiti, P. (1995) Efficiency of the flotation method in the isolation of *Penicillium marneffei* from seeded soil. *J Med Vet Mycol* **33**, 271–273.

Wolfs, P., Knutsson, R., Norling, B. and Radstrom, P. (2004) Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork

samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. *J Clin Microbiol* **42**, 1042–1047.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Results of toxicity test of used FAs on both biofilm-positive and biofilm-negative bacterial strains.



## The effect of prebiotics on adherence of probiotics

Robert Kadlec and Martin Jakubec<sup>1</sup>

Dairy Research Institute Ltd., Prague, Czech Republic

### ABSTRACT

Prebiotics are generally considered to promote the function or viability of probiotics via their fermentation, but their effect on the adherence of probiotics is still unclear. In this study, we examined the effect of 4 commercially available prebiotics [Orafti GR, Orafti P95, and Orafti Synergy (Beneo GmbH, Mannheim, Germany), and Vivinal (Friesland Foods Domo, Amersfoort, the Netherlands)] and 3 simple saccharides (glucose, galactose, and lactose) on the adherence of 5 probiotic type strains, 2 lactococci starter cultures, and 5 potential dairy probiotic strains from the Culture Collection of Dairy Microorganisms (Tábor, Czech Republic). Adherence was tested in microtiter plates on the following types of substrate: polystyrene alone and polystyrene coated with either porcine mucus or cocultures of the human colon cell lines Caco2 and HT29-MXT (1:9 ratio of HT29-MXT:Caco2). Adherence was evaluated as a change in fluorescence in the well of a microtiter plate. The most commonly observed effect (with a few exceptions) of prebiotics was decreased adherence of the tested strains observed on all types of substrate. The tested saccharides, which are part of the residual compounds of the used prebiotics, had a very similar effect—eliciting a decrease in adherence ability in the majority of the probiotic strains.

**Key words:** prebiotic, inulin, galactooligosaccharide, gastrointestinal adherence

### INTRODUCTION

Probiotics are live bacteria that may confer a health benefit on the host. More than 20 yr ago, Fuller (1989) defined probiotics as “live microbial feed supplements which beneficially affect the host animal by improving its intestinal microbial balance.” However, the most common definition used currently is from the World Health Organization, which defines probiotics as “live microorganisms, which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host.” For

declaration of a bacterial strain as a probiotic, several criteria must be fulfilled, including good adherence of the probiotic on intestinal epithelial cells and intestinal mucus. Adherence is an essential process for the survival and proliferation of probiotic microorganisms in the gut; the mere passage of a probiotic through the digestive system is seen as insufficient for induction of a clinical effect. Prebiotics are generally considered to improve the function of probiotics but their influence on the adherence of probiotics is still unknown. Currently many strains of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *Enterococcus* spp. exist that are commonly used in probiotic products, especially in fermented milk (Saarela et al., 2000). These strains were defined as probiotics due to determination of certain properties, such as no pathogenicity (Dugas et al., 1999), survival in the gastrointestinal tract (Lo Curto et al., 2011), ability to adhere to the intestine (Laparra and Sanz, 2009), prevention of gut infections and pathogen adherence to the intestine (Alvarez-Olmos and Oberhelman, 2001; Lee et al., 2000; Mukai et al., 2002), and no production of gases (Gill and Guarner, 2004). The ability of probiotics to adhere to the intestine is an important feature enabling their persistence and proliferation in the intestine (Parvez et al., 2006).

The beneficial effect of probiotics can be enhanced by using prebiotics [i.e., “non-digestible food ingredients that stimulate the growth and (or) activity of a limited number of bacteria in the colon”; Gibson and Roberfroid, 1995]. These non-digestible ingredients are oligosaccharides and polysaccharides, which are resistant to gastric acidity, hydrolysis by mammalian enzymes, and gastrointestinal absorption (Gibson, 2004). On the other hand, they can be fermented by intestinal microflora, which results in the selective growth and increased activity of beneficial microflora. Several studies exist dealing with the influence of prebiotics on probiotics, but so far, only a handful of studies have reported changes in adherence after the addition of prebiotics (Kavanaugh et al., 2013; Koh et al., 2013).

Various in vitro models have been used for the evaluation of adherence ability. The simplest assay is based on immobilization of commercially available mucin on a microtiter plate (Tuomola et al., 1999), but the most widely used model is coculture with human colon cell

Received August 30, 2013.

Accepted December 8, 2013.

<sup>1</sup>Corresponding author: M.Jakubec@email.cz

lines (usually Caco-2 and HT29) in a microtiter plate (Aissi et al., 2001). The disadvantage of these assays is that the used cells are cancer cells, which can be unstable and may or may not be identical to normal epithelial cells. Further, they do not produce mucin. The Caco-2 cells resemble both colonocytes and enterocytes; HT-29 cells can be differentiated by methotrexate into cells that constantly produce a mucin layer (Lesuffleur et al., 1990). These differentiated cells labeled as HT29-MXT were used in the current study.

The aim of this study was to describe the influence of prebiotics on the adherence abilities of several probiotic and dairy cultures. Because every used prebiotic contains a significant amount of simple saccharides, we also included these saccharides in the testing. Adherence was measured on widely used models: on polystyrene alone and polystyrene coated with either mucin or cocultures of Caco2:HT29-MXT. To this end, we evaluated the influence of 4 commercially available prebiotics and 3 simple saccharides on 5 type probiotic strains and 8 dairy milk cultures. Subsequently, we attempted to identify the main mechanisms that influence the adherence of probiotic and prebiotic combinations. For this purpose, one strain was selected for measurement of  $\zeta$ -potential changes when cultivated with selected prebiotics.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains and Cultivation Conditions

All used strains were from the Culture Collection of Dairy Microorganisms (CCDM; Tábor, Czech Republic). The following probiotic type strains were used: *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 598<sup>T</sup>, *Lactobacillus acidophilus* CCDM 79<sup>T</sup>, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 617<sup>T</sup>, *Enterococcus durans* CCDM 500<sup>T</sup>, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CCDM 374<sup>T</sup>. Several other strains isolated by the Dairy Research Institute Ltd. were also included: *Lactococcus* sour cream starter culture CCDM 17, *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 731, *E. durans* CCDM 922A, *Enterococcus faecium* CDM 945, *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 94, *Lb. rhamnosus* CCDM 150, *Lb. acidophilus* CCDM 151, and *Lb. rhamnosus* CCDM 289. The strains of genus *Lactococcus* and *Enterococcus* and sour cream starter culture were cultivated in M17 broth (Sigma Deutschland GmbH, Rödermark, Germany). The strain of genus *Lactobacillus* was cultivated in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (*Lactobacillus* broth according to de Man, Rogosa, and Sharpe; Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Germany). The strain of genus *Bifidobacterium* was cultivated in MRS broth with the addition of 0.5% L-cysteine hydrochloride (biochemical quality;

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). All strains were cultivated at 37°C for 20 h before the beginning of the experiment. After the cultivation, bacterial cells were pelleted (centrifuged) at 10,000 × *g* for 10 min at room temperature washed twice in PBS (pH = 7), and finally resuspended in PBS to an optical density at a wavelength of 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.5.

### Bacterial Staining with SYTO 24

Prior to the experiment, bacterial cells suspended in PBS were stained by adding 5 μM SYTO 24 fluorescein (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), which specifically binds to DNA and RNA. Bacterial cells were then incubated for 30 min at 37°C in the dark.

### Cell Cultures and Simulation of Intestinal Epithelium

For in vitro simulation of intestinal epithelium, cocultures of 2 cell strains from The American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) were used: HT29 (ATCC HTB-38; passage 137 to 147) and Caco-2 (ATCC HTB-39; passage 20 to 30). At first, HT29 cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium with 15% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 1% sodium pyruvate. The HT29 cultures were then differentiated using methotrexate as described previously (Lesuffleur et al., 1990). The Caco-2 cells were cultivated in Eagle's minimal essential medium with 20% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 1% L-glutamine.

Finally, the cells strains were cocultivated in microtiter plates (see below) at a 1:9 ratio of HT29-MXT:Caco2. A cell mixture with a starting density of 1 × 10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup> was cultivated at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> until the bottoms of the wells were covered by cells (typically 14 d). The cultivation medium used for the cell mixture was the same as that used for the cultivation of Caco-2 cells (see above). All media and chemicals used for cell culture were purchased from Lonza Group Ltd. (Cologne, Germany).

### Prebiotics

In the experiments described below, 4 prebiotic substances were used: (1) Orafti GR (Beneo GmbH, Mannheim, Germany): a white powder that contains mainly chicory inulin with polymeric degrees from 2 to 60 (average of >10; composition: >90% inulin, <4% glucose and fructose, and <8% saccharose); (2) Orafti P95 (Beneo GmbH): white hygroscopic powder that contains mainly oligofructose, a product of the partial enzyme hydrolysis of chicory inulin (composition: >93.2% oligofructose and <6.8% glucose + fructose

+ saccharose); (3) Orafit Synergy (Beneo GmbH): hygroscopic powder, which is a combination of inulin with a selected length of chains and specific fraction of oligofructose (polymeric degrees not provided; composition: 90–94% inulin + oligofructose and 6–10% glucose + fructose + saccharose); and (4) Vivinal GOS (Friesland Foods Domo, Amersfoort, the Netherlands): non-colored syrup (composition: >57% galactooligosaccharides, <23% lactose, <22% glucose, and <0.8% galactose).

#### Adherence Assay

Three types of surface modifications of microtiter plates were used in the adherence assay: (1) nontransparent black polystyrene 96-well microtiter plates (Nalge Nunc International, Penfield, NY), without modifications; (2) mucin-coated nontransparent black 96-well polystyrene plates [Nalge Nunc International; i.e., the plates were incubated with 0.5 mg/mL porcine mucin (Sigma Deutschland GmbH) for 4 h at 4°C and then gently washed 3 times with PBS]; and (3) HT-29:Caco-2-coated transparent 96-well microtiter plates (Nalge Nunc International) prepared as described above. The adherence assays were carried out as follows: (1) 100 µL of the bacterial suspension stained with SYTO 24 was dispensed to each well, (2) 100 µL of 5% (wt/vol) prebiotic or saccharide solution was added to each well (the final concentration of prebiotics or saccharides was 2.5%), (3) the mixtures were incubated for 60 min at 37°C (HT-29:Caco-2-coated plates were incubated in the presence of 5% CO<sub>2</sub>) and after incubation, the wells of microtiter plates were gently washed with PBS 3 times (PBS was preheated to 37°C for washing of the HT-29:Caco-2-coated plates); and (4) 100 µL of PBS per well was dispersed and fluorescence was measured using a Synergy 2 reader (Beneo GmbH) with sensitivity set to 100 and with filters of wavelengths 485/20 nm (excitation) and 530/25 nm (emission). All samples were measured in 4 aliquots obtained from 3 independent experiments.

#### Measurement of ζ-Potential

Based on the results of adherence, *Lb. rhamnosus* CCDM 150 was selected for additional assessment of changes in ζ-potential after the addition of the prebiotics. This particular strain had shown a significant increase in adherence when Orafit P95 was used. The theory that increase may have been caused by a change in charge was tested. The sample was prepared in the same way as for the adherence assay and ζ-potential was measured in a Zetasizer 3000 instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK).

#### Statistics and Data Processing

Collected data were evaluated using Statistica 10 (StatSoft, Prague, Czech Republic), Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA), and MatlabR2013a (The MathWorks Inc., Natick, MA). All measurements in each experiment were standardized and converted to percentage fluorescence using the following equation:

$$X (\%) = \frac{(X_{RFU} - NC)}{(PC - NC)},$$

where  $X (\%)$  = converted relative fluorescent units to percentage against the positive control,  $X_{RFU}$  = fluorescence of the well measured in relative fluorescent units,  $NC$  = negative control (i.e., unspecific fluorescence of the well), and  $PC$  = positive control (i.e., fluorescence of stained bacteria without washing).

Statistically significant differences between groups of prebiotics/saccharides in one probiotic strain were evaluated using a one-way ANOVA. The null hypothesis used in ANOVA was that adherence with prebiotics/saccharides shows no change (i.e., adherence is the same as in the control group without any additives). Groups of prebiotics and saccharides that could be distinguished from the group without any additive were found using the Tukey-Kramer method. Results from all groups were then evaluated using the 3-way ANOVA with interaction model type. The following were selected as factors: (1) prebiotic, (2) probiotic, and (3) substrate.

#### RESULTS AND DISCUSSION

The results are listed in Tables 1, 2 and Table 3 and in Figure 1. The results from one-way ANOVA are labeled with an asterisk (\*) if a significant ( $P < 0.05$ ) decrease/increase adherence of bacterial cells occurred compared with the control grown without prebiotics or saccharides. Arrows indicate an increase or decrease in adherence after the addition of the prebiotic or saccharide.

The results from 3-way ANOVA showed that no general correlation existed between the used prebiotics, prebiotics, or type of substrate and all variables behaved independently. The observed interactions of prebiotics and probiotics were very different even if different strains of the same species were used. In general, it was observed that the use of prebiotics or saccharides decreased the ability of probiotic bacteria to adhere. However, in some combinations, an increase in adherence was observed. Examples of these exceptions are *Lb. rhamnosus* CCDM 150, *E. durans* CCDM 500<sup>T</sup>, and *B. animalis* ssp. *lactis* CCDM 74<sup>T</sup>, which exhibited

Table 1. The values of adherence on a polystyrene surface<sup>1</sup>

Prebiotic	Lactococcus lactis sp. lactis		Enterococcus faecium		Enterococcus faecium		Lactobacillus rhamnosus		Lactobacillus acidophilus		Lb. rhamnosus		Lb. rhamnosus		Lb. acidophilus		Lc. lactis		Bifidobacterium animalis sp. lactis	
	start culture	CCDM 17	922A	CCDM 945	CCDM 94	CCDM 150	CCDM 151	CCDM 289	CCDM 598 <sup>†</sup>	CCDM 79 <sup>†</sup>	CCDM 79 <sup>†</sup>	CCDM 289	CCDM 598 <sup>†</sup>	CCDM 79 <sup>†</sup>	CCDM 617 <sup>†</sup>	CCDM 500 <sup>†</sup>	CCDM 74 <sup>†</sup>	CCDM 500 <sup>†</sup>	CCDM 617 <sup>†</sup>	CCDM 74 <sup>†</sup>
Orafi GR	1.06 ± 0.30*	16.22 ± 0.71 ↓	0.90 ± 0.29*	2.33 ± 0.57*	0.44 ± 0.13*	1.89 ± 0.40*	2.58 ± 0.79*	1.33 ± 0.31*	0.32 ± 0.09*	0.85 ± 0.14*	2.77 ± 0.74*	3.55 ± 0.55*	0.43 ± 0.11*	3.81 ± 0.70*	2.47 ± 0.26*	3.55 ± 0.55*	0.43 ± 0.11*	3.81 ± 0.70*	2.47 ± 0.26*	3.55 ± 0.55*
Orafi P95	4.69 ± 0.47 ↑	17.50 ± 1.22 ↑	6.97 ± 0.98*	7.92 ± 1.15 ↑	4.41 ± 0.38*	2.81 ± 0.41*	1.99 ± 0.26*	1.63 ± 0.58*	0.23 ± 0.05*	0.83 ± 0.10*	3.81 ± 0.70*	2.47 ± 0.26*	0.45 ± 0.19*	2.27 ± 0.58*	5.82 ± 1.80 ↓	1.87 ± 0.34*	1.87 ± 0.34*	5.82 ± 1.80 ↓	1.87 ± 0.34*	1.87 ± 0.34*
Vivinal	3.84 ± 0.38 ↑	31.94 ± 2.76**	8.30 ± 1.25*	11.02 ± 0.79*	7.86 ± 0.68*	3.00 ± 0.31*	3.46 ± 0.46*	13.30 ± 1.60*	1.42 ± 0.38*	4.99 ± 0.70*	6.40 ± 1.30 ↓	3.44 ± 0.68*	1.81 ± 0.36*	3.48 ± 0.71*	2.58 ± 1.10*	1.69 ± 0.16*	1.69 ± 0.16*	3.48 ± 0.71*	2.58 ± 1.10*	1.69 ± 0.16*
Lactose	4.12 ± 0.40 ↑	25.98 ± 3.52**	1.46 ± 0.51*	9.18 ± 0.90*	4.49 ± 0.68*	1.76 ± 0.31*	5.78 ± 1.00*	9.41 ± 0.81*	1.39 ± 0.40*	5.67 ± 0.47*	22.40 ± 1.00*	4.55 ± 0.52*	11.11 ± 1.66*	4.55 ± 0.52*	11.11 ± 1.66*	1.46 ± 0.48*	1.46 ± 0.48*	4.55 ± 0.52*	11.11 ± 1.66*	1.46 ± 0.48*
Glucose	8.48 ± 0.43*	7.48 ± 0.88*	23.82 ± 2.47*	20.80 ± 1.65*	28.14 ± 4.72*	2.05 ± 0.45*	5.97 ± 0.90*	4.43 ± 0.83*	8.38 ± 0.70*	22.40 ± 1.00*	17.88 ± 2.50**	6.33 ± 0.53*	16.83 ± 2.38*	17.88 ± 2.50**	6.33 ± 0.53*	1.55 ± 0.28*	1.55 ± 0.28*	17.88 ± 2.50**	6.33 ± 0.53*	1.55 ± 0.28*
Galactose	4.76 ± 0.18 ↑	7.65 ± 0.74*	18.64 ± 1.10*	5.51 ± 0.77 ↑	25.15 ± 5.05*	9.21 ± 0.55*	5.71 ± 0.92*	6.93 ± 1.20*	10.15 ± 1.04*	17.88 ± 2.50**	6.33 ± 0.53*	16.83 ± 2.38*	1.55 ± 0.28*	6.33 ± 0.53*	16.83 ± 2.38*	8.23 ± 1.48	8.23 ± 1.48	6.33 ± 0.53*	16.83 ± 2.38*	8.23 ± 1.48
None	3.71 ± 0.76	17.48 ± 2.06	32.16 ± 7.18	5.25 ± 0.84	41.90 ± 4.57	24.65 ± 6.69	24.65 ± 6.69	14.25 ± 1.80	6.76 ± 1.87	7.58 ± 1.08	8.05 ± 0.38	8.23 ± 1.48	5.45 ± 0.54	8.05 ± 0.38	8.23 ± 1.48	5.45 ± 0.54	5.45 ± 0.54	8.05 ± 0.38	8.23 ± 1.48	5.45 ± 0.54

<sup>1</sup>Increase (↑) or decrease (↓) in adherence is illustrated by arrows. All bacterial strains used were obtained from the Culture Collection of Dairy Microorganisms (Tábor, Czech Republic). The prebiotics Orafi GR, Orafi P95, and Orafi Synergy were purchased from Beneo GmbH (Mannheim, Germany); Vivinal was purchased from Friesland Foods Domo (Amersfoort, the Netherlands). Lactose, glucose, and galactose were purchased from Sigma Deutschland GmbH (Rödermark, Germany).

\*  $P < 0.05$  [statistically different from the none group (without prebiotic or saccharides) by one-way ANOVA].

Table 2. The values of adherence on a polystyrene surface coated with mucin<sup>1</sup>

Prebiotic	Lactococcus lactis sp. lactis		Enterococcus faecium		Enterococcus faecium		Lactobacillus rhamnosus		Lactobacillus acidophilus		Lb. rhamnosus		Lb. rhamnosus		Lb. acidophilus		Lc. lactis		Bifidobacterium animalis sp. lactis	
	start culture	CCDM 17	922A	CCDM 945	CCDM 94	CCDM 150	CCDM 151	CCDM 289	CCDM 598 <sup>†</sup>	CCDM 79 <sup>†</sup>	CCDM 79 <sup>†</sup>	CCDM 289	CCDM 598 <sup>†</sup>	CCDM 79 <sup>†</sup>	CCDM 617 <sup>†</sup>	CCDM 500 <sup>†</sup>	CCDM 74 <sup>†</sup>	CCDM 500 <sup>†</sup>	CCDM 617 <sup>†</sup>	CCDM 74 <sup>†</sup>
Orafi GR	3.95 ± 0.52*	4.16 ± 0.81 ↓	4.27 ± 0.97 ↑	0.24 ± 0.16*	4.96 ± 1.53*	6.19 ± 2.23 ↑	1.80 ± 0.44*	1.96 ± 0.33*	0.25 ± 0.07*	1.88 ± 0.38*	1.43 ± 0.18*	0.25 ± 0.07*	0.21 ± 0.07*	1.88 ± 0.38*	0.51 ± 0.08*	0.12 ± 0.08*	0.885 ± 0.15*	0.23 ± 0.07*	0.23 ± 0.07*	0.885 ± 0.15*
Orafi P95	6.20 ± 1.69*	6.40 ± 1.88 ↓	1.88 ± 0.56 ↓	2.05 ± 0.30 ↑	3.62 ± 0.62*	28.06 ± 5.38*	3.05 ± 0.79*	3.38 ± 0.50*	2.23 ± 0.31*	3.02 ± 0.62 ↓	1.17 ± 0.14*	0.59 ± 0.09*	7.44 ± 1.17 ↑	0.78 ± 0.10*	0.48 ± 0.10*	3.50 ± 0.36 ↓	3.50 ± 0.36 ↓	0.48 ± 0.10*	3.50 ± 0.36 ↓	3.50 ± 0.36 ↓
Vivinal	5.00 ± 1.69*	6.40 ± 1.88 ↓	1.88 ± 0.56 ↓	2.05 ± 0.30 ↑	3.62 ± 0.62*	28.06 ± 5.38*	3.05 ± 0.79*	3.38 ± 0.50*	2.23 ± 0.31*	3.02 ± 0.62 ↓	1.17 ± 0.14*	0.59 ± 0.09*	7.44 ± 1.17 ↑	0.78 ± 0.10*	0.48 ± 0.10*	3.50 ± 0.36 ↓	3.50 ± 0.36 ↓	0.48 ± 0.10*	3.50 ± 0.36 ↓	3.50 ± 0.36 ↓
Lactose	3.39 ± 0.93*	7.10 ± 1.63 ↑	1.56 ± 0.45 ↓	1.37 ± 0.46 ↓	10.68 ± 2.70	2.70 ± 0.92 ↓	3.37 ± 0.48*	3.94 ± 0.76*	0.75 ± 0.11*	3.63 ± 0.49 ↓	0.74 ± 0.08*	0.61 ± 0.11*	4.21 ± 0.78 ↓	10.33 ± 1.07*	10.94 ± 1.77*	1.87 ± 0.99 ↓	1.45 ± 0.36 ↓	3.65 ± 0.73*	3.47 ± 0.66*	3.55 ± 0.66 ↓
Glucose	10.33 ± 1.07*	10.94 ± 1.77*	1.87 ± 0.99 ↓	1.45 ± 0.36 ↓	3.65 ± 0.73*	2.98 ± 0.73 ↓	6.76 ± 0.81*	3.47 ± 0.66*	1.89 ± 0.57*	5.62 ± 0.54 ↓	10.41 ± 1.28*	0.57 ± 0.11*	3.55 ± 0.66 ↓	11.22 ± 1.34*	11.45 ± 1.23*	2.01 ± 0.53 ↓	1.46 ± 0.49 ↓	2.54 ± 0.88*	3.25 ± 0.87 ↓	3.11 ± 0.63 ↓
Galactose	26.42 ± 6.58	6.69 ± 1.80	3.85 ± 1.09	1.92 ± 0.48	10.16 ± 1.41	4.40 ± 0.61	15.38 ± 0.86	8.28 ± 1.07	5.45 ± 0.53	5.66 ± 0.44	1.97 ± 0.70	1.38 ± 0.33	5.61 ± 1.05	15.38 ± 0.86	8.28 ± 1.07	5.45 ± 0.53	5.66 ± 0.44	1.97 ± 0.70	1.38 ± 0.33	5.61 ± 1.05

<sup>1</sup>Increase (↑) or decrease (↓) in adherence is illustrated by arrows. All bacterial strains used were obtained from the Culture Collection of Dairy Microorganisms (Tábor, Czech Republic). The prebiotics Orafi GR, Orafi P95, and Orafi Synergy were purchased from Beneo GmbH (Mannheim, Germany); Vivinal was purchased from Friesland Foods Domo (Amersfoort, the Netherlands). Lactose, glucose, and galactose were purchased from Sigma Deutschland GmbH (Rödermark, Germany).

\*  $P < 0.05$  [statistically different from the none group (without prebiotic or saccharides) by one-way ANOVA].



Table 3. The values of adherence on polystyrene surface coated with cell cocultures (HT29-MXT:Caoc2)<sup>1</sup>

Prebiotic	Sour cream start culture	Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM		Enterococcus durans CCDM		Enterococcus faecium CCDM		Bifidobacterium lactis CCDM		Lactobacterium rhamnosus CCDM		Lactobacillus acidophilus CCDM		Lb. rhamnosus CCDM		Lb. rhamnosus actidophilus CCDM		Lc. lactis ssp. lactis CCDM		Bifidobacterium animalis ssp. lactis CCDM	
		731	922A	945	94	150	151	289	598 <sup>†</sup>	79 <sup>†</sup>	617 <sup>†</sup>	900 <sup>†</sup>	74 <sup>†</sup>								
Orafit GR	2.85 ± 0.38*↓	11.47 ± 1.60 ↓	3.48 ± 0.69*↓	1.02 ± 0.32*↓	26.05 ± 3.17 ↓	35.50 ± 4.51*↓	0.41 ± 0.32*↓	13.02 ± 0.43 ↓	2.16 ± 0.44*↓	1.04 ± 0.60*↓	2.77 ± 0.53*↓	2.44 ± 0.61*↓	1.32 ± 0.69*↓	1.16 ± 0.72*↓	0.66 ± 0.51*↓	0.39 ± 0.37*↓	2.46 ± 0.64*↓				
Orafit P95	2.80 ± 1.16*↓	32.77 ± 1.68*↑	6.15 ± 1.26 ↓	0.96 ± 0.51*↓	35.55 ± 3.87*↓	35.55 ± 3.87*↓	0.96 ± 0.51*↓	39.23 ± 1.26*↑	3.87 ± 0.78*↓	1.47 ± 0.78*↓	8.95 ± 0.61*↓	8.56 ± 2.60 ↑	2.20 ± 0.71*↓	2.20 ± 0.71*↓	5.25 ± 1.18*↑	9.15 ± 1.37*↑					
Vivinal	7.92 ± 0.52*↓	2.62 ± 1.24*↓	6.12 ± 1.79 ↓	2.79 ± 0.81*↓	31.65 ± 3.71*↓	27.9 ± 0.81*↓	1.18 ± 0.13*↓	15.08 ± 1.41 ↓	3.55 ± 0.69*↓	12.54 ± 2.18*↑	1.18 ± 0.13*↓	8.58 ± 2.34 ↑	1.09 ± 0.73*↓	1.09 ± 0.73*↓	5.48 ± 0.87*↑	9.28 ± 0.80*↑					
Lactose	6.18 ± 1.27*↓	2.89 ± 0.42*↓	7.26 ± 1.44 ↓	1.18 ± 0.47*↓	29.61 ± 1.44 ↓	29.61 ± 1.44 ↓	1.18 ± 0.47*↓	12.94 ± 0.99 ↓	3.84 ± 0.54*↓	4.27 ± 1.77*↓	1.28 ± 0.05*↓	4.11 ± 1.25*↓	2.22 ± 0.33*↓	2.22 ± 0.33*↓	4.02 ± 0.78*↑	5.45 ± 1.34*↓					
Glucose	13.80 ± 0.77*↓	9.86 ± 0.95*↓	15.08 ± 1.37*↑	54.79 ± 4.21	35.47 ± 2.42*↑	8.17 ± 0.93*↓	8.17 ± 0.93*↓	8.02 ± 0.73 ↓	3.75 ± 0.49*↓	3.37 ± 0.61*↓	3.93 ± 0.37 ↓	12.66 ± 1.87*↑	1.10 ± 0.53*↓	1.10 ± 0.53*↓	3.65 ± 0.62*↓	3.00 ± 0.82*↓					
Galactose	10.92 ± 1.10*↓	11.08 ± 0.77*↓	14.71 ± 1.09*↑	14.71 ± 1.09*↑	41.10 ± 4.38*↑	41.10 ± 4.38*↑	15.31 ± 1.64	10.29 ± 0.97*↓	16.99 ± 1.89*↑	5.63 ± 0.47 ↓	4.09 ± 0.99*↓	9.18 ± 0.54 ↑	17.83 ± 1.32*↑	17.83 ± 1.32*↑	3.00 ± 0.82*↓	3.00 ± 0.82*↓					
None	20.35 ± 1.35	14.12 ± 1.36	9.61 ± 1.20	80.83 ± 3.64	6.88 ± 0.52	6.88 ± 0.52	11.79 ± 1.48	7.22 ± 2.66	11.58 ± 0.32	11.58 ± 0.32	11.58 ± 0.32	11.58 ± 0.32	11.58 ± 0.32	11.58 ± 0.32	2.38 ± 0.57	7.88 ± 0.53					

<sup>1</sup>Increase (↑) or decrease (↓) in adherence is illustrated by arrows. All bacterial strains used were obtained from the Culture Collection of Dairy Microorganisms (Tábor, Czech Republic). The prebiotics Orafit GR, Orafit P95, and Orafit Synergy were purchased from Beneo GmbH (Mannheim, Germany); Vivinal was purchased from Friesland Foods Domo (Amersfoort, the Netherlands). Lactose, glucose, and galactose were purchased from Sigma. Deutschland GmbH (Rödermark, Germany).

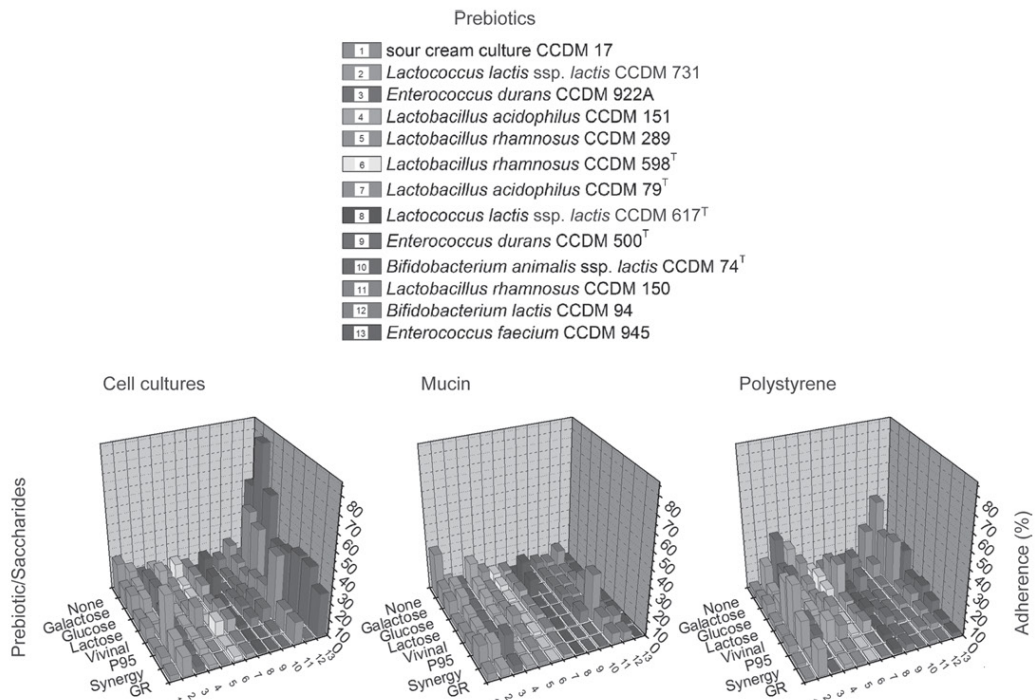
\**P* < 0.05 [statistically different from the none group (without prebiotic or saccharides) by one-way ANOVA].

increases in adherence abilities after the addition of the prebiotic P95 or Vivinal. As has been shown in experiments with simple saccharides, this increase does not seem to be caused by the presence of residual simple saccharides usually present in some prebiotics because in both samples adherence was lower with the addition of lactose, glucose, or galactose. Various results from different combinations of prebiotics and probiotics suggest that different mechanisms of adherence in the strains used play a role. These mechanisms are described only in general terms and so far, no indication exists as to why 2 types of prebiotics can have a different effect on the adherence of 1 strain.

Prebiotics used in experiments are prepared by enzymatic reactions and the products, therefore, contain not 1 pure polymer but often several chemicals that vary in the length of polymer and in the chemical bond between each monomer. For cleavage of bonds β 1→6, β 1→3, or β 1→4 in prebiotics, a series of enzymes is needed (Tzortzis, 2009). This could be one of the reasons why we observed a decrease in adherence. The energy supply of the cell could be preferentially used for the production of these enzymes and the production of adhesins could be reduced.

The prebiotic Vivinal GOS is a galactooligosaccharide that is synthesized with the use of enzymes from *Bacillus circulans*. The main products of this synthesis are polymers with a β 1→4 bond with 3 monomer units (40% of DM). Polymers with more than 3 monomers make up about 20% of the DM. However, the remaining DM also contains a high amount of residual mono- and disaccharides (40% of DM; Coulier et al., 2009). Therefore, it was necessary to perform additional experiments that monitored the effect of simple saccharides on adherence. When Vivinal and lactose were compared, we observed a very similar effect on change in adherence. The effect of lactose on adherence was different from Vivinal only in 3 strains (*Lb. rhamnosus* CCDM 289, *B. lactis* CCDM 94, and *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 617<sup>†</sup>). It is, therefore, obvious that lactose is one of the main factors of Vivinal that influences adherence. The other simple saccharides (glucose and galactose) found in Vivinal do not have a significant effect on adherence.

The remaining prebiotics used in this study are classified as inulin type. Orafit GR is raw inulin isolated from chicory and contains long polymers that consist of up to 60 monomers. Orafit P95 is already partially enzymatically hydrolyzed inulin with a maximum degree of polymerization of around 20 monomers. The effect of these 3 prebiotics on adherence was generally negative and, as mentioned above, only 3 strains showed increases in adherence after Orafit P95 or Vivinal was added. It is, therefore, possible that hydrolyzed inulin is better at promoting adherence because raw prebi-



**Figure 1.** Visualization of adherence of different probiotics on different substrates after addition of prebiotics. The values of adherence and SD can be seen in Tables 1 to 3. The prebiotics Orafti GR, Orafti P95, and Orafti Synergy were purchased from Beneo GmbH (Mannheim, Germany); Vivinal was purchased from Friesland Foods Domo (Amersfoort, the Netherlands). Color version available in the online PDF.

otic Orafti GR had the worst effect on adherence of all monitored probiotics. This supports the aforementioned notion that cells may need to redirect their energy toward metabolic processes at the expense of adherence. Because the conditions of the gastrointestinal tract are hard to mimic, these *in vitro* results should be confirmed in *in vivo* studies to demonstrate the observed effect of prebiotics on the adherence of probiotics.

After addition of prebiotics to the model microorganism *Lb. rhamnosus* CCDM 150, the  $\zeta$ -potential was increased by approximately 10 mV (see Table 4). Changes in intensity of a negative charge are probably one of the main factors influencing the ability to adhere. In this particular strain we observed a strong increase in adherence with prebiotic Orafti P95, suggesting that the mechanism of action of this prebiotic involves a change in the charge of the bacteria. Although we observed a statistically significant increase in  $\zeta$ -potential after

addition of prebiotics, this increase was smallest with the prebiotic Orafti P95, where we observed the largest enhancement of adherence ability. Thus, although the charge of bacteria plays a very important role in adherence, it appears that in these probiotic/prebiotic combinations additional factors exert a greater influence. However, this measurement was only tentative and the exact mechanism of inhibition adherence should be the subject of future research.

The effect of prebiotics is usually evaluated only on the basis of specific fermentation by probiotic strains and by enhancement of beneficial properties of the studied probiotic strains (Gibson et al., 2004). The results reported here do not support the idea that certain prebiotics are generally suitable for use with a particular genus (for example, *Bifidobacterium*) or even for particular species. In fact, the effects on adherence seem to be strongly strain specific. All combinations of

Table 4.  $\zeta$ -Potential changes of *Lactobacillus rhamnosus* CCDM 150 after addition of prebiotic<sup>1</sup>

Prebiotic	$\zeta$ -Potential [-mV]
None	-31.37 ± 2.51
Orafiti GR	-17.37 ± 0.86
Orafiti P95	-17.93 ± 0.78
Orafiti Synergy	-22.07 ± 0.48
Vivinal	-19.47 ± 0.67

<sup>1</sup>The bacterial strain used was obtained from the Culture Collection of Dairy Microorganisms (Tábor, Czech Republic); Orafiti GR, Orafiti P95, and Orafiti Synergy were purchased from Beneo GmbH (Mannheim, Germany); Vivinal was purchased from Friesland Foods Domo (Amersfoort, the Netherlands).

prebiotics and probiotics should, therefore, be tested before their use for influence on adherence.

Koh et al. (2013) observed a neutral effect of tagatose on the adherence of both *Lactobacillus casei* 01 and *Lb. rhamnosus* GG. It should be noted that those authors used HT29 cell lines that only remotely resemble intestinal cells. Kavanaugh et al. (2013) observed a positive effect of human milk oligosaccharides on the adhesion of *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*. However, Orafiti P95 had a neutral effect on adherence in the same study and those authors also observed that this effect on adherence was strongly strain specific. In other studies, a negative effect of prebiotics on the adherence of certain pathogenic strains has been observed. For example, Sarabia-Sainz et al. (2013) described inhibition of the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* by conjugates of glycans and galactooligosaccharides.

Even though research into the effects of prebiotics on adherence is still in its infancy, several studies have already been done that have reported partially negative effects of commercially available prebiotics on adherence and strain-specific effects of prebiotics on adherence abilities (for example, in certain pathogenic strains; Quintero et al., 2011; Kavanaugh et al., 2013; Sarabia-Sainz et al., 2013).

### CONCLUSIONS

We found, under the conditions of this study, that the effects of prebiotics on the adherence of probiotics are, in general, negative and that they can inhibit adherence to both biological and abiotic substrates. Moreover, we observed that the influence of prebiotics on probiotic adherence is strongly strain specific and each combination should be tested individually before use.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, by Institutional support no. RO0513 and by project nos. QI91B274 and QJ1310258.

### REFERENCES

- Aissi, E. A., M. Lecocq, C. Brassart, and S. Bouquelet. 2001. Adhesion of some bifidobacterial strains to human enterocyte-like cells and binding to mucosal glycoproteins. *Microb. Ecol. Health Dis.* 13:32-39.
- Alvarez-Olmos, M. I., and R. A. Oberhelman. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32:1567-1576.
- Coulier, L., J. Timmermans, R. Bas, R. Van Den Dool, I. Haaksman, B. Klarenbeek, T. Slaghek, and W. Van Dongen. 2009. In-depth characterization of prebiotic galacto-oligosaccharides by a combination of analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* 57:8488-8495.
- Dugas, B., A. Mercenier, I. Lenoir-Wijnkoop, C. Arnaud, N. Dugas, and E. Postaire. 1999. Immunity and probiotics. *Immunol. Today* 20:387-390.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
- Gibson, G. R. 2004. From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. *J. Food Sci.* 69:M141-M143.
- Gibson, G. R., H. M. Probert, J. Van Loo, R. A. Rastall, and M. B. Roberfroid. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17:259-275.
- Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125:1401-1412.
- Gill, H. S., and F. Guarner. 2004. Probiotics and human health: A clinical perspective. *Postgrad. Med. J.* 80:516-526.
- Kavanaugh, D. W., J. O'Callaghan, L. F. Buttó, H. Slattery, J. Lane, M. Clyne, M. Kane, L. Joshi, and R. M. Hickey. 2013. Exposure of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* to milk oligosaccharides increases adhesion to epithelial cells and induces a substantial transcriptional response. *PLoS ONE* 8:e67224.
- Koh, J. H., S. H. Choi, S. W. Park, N.-J. Choi, Y. Kim, and S. H. Kim. 2013. Synbiotic impact of tagatose on viability of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG mediated by the phosphotransferase system (PTS). *Food Microbiol.* 36:7-13.
- Laparra, J. M., and Y. Sanz. 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.* 49:695-701.
- Lee, Y. K., C. Y. Lim, W. L. Teng, A. C. Ouwehand, E. M. Tuomola, and S. Salminen. 2000. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3692-3697.
- Lesuffleur, T., A. Barbat, E. Dussaux, and A. Zweibaum. 1990. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon-carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* 50:6334-6343.
- Lo Curto, A., L. Pitino, G. Mandalari, J. R. Dainty, R. M. Faulks, and M. S. J. Wickham. 2011. Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiol.* 28:1359-1366.
- Mukai, T., T. Asasaka, E. Sato, K. Mori, M. Matsumoto, and H. Ohori. 2002. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32:105-110.
- Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang, and H. Y. Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100:1171-1185.
- Quintero, M., M. Maldonado, M. Perez-Munoz, R. Jimenez, T. Fangman, J. Rupnow, A. Wittke, M. Russell, and R. Hutkins. 2011. Adherence inhibition of *Cronobacter sakazakii* to intestinal epithelial cells by prebiotic oligosaccharides. *Curr. Microbiol.* 62:1448-1454.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö, and T. Mattila-Sandholm. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84:197-215.
- Sarabia-Sainz, H. M., C. Armenta-Ruiz, J. A. Sarabia-Sainz, A. M. Guzmán-Partida, A. I. Ledesma-Osuna, L. Vázquez-Moreno, and G. Ramos-Clamont Montfort. 2013. Adhesion of enterotoxigenic



- Escherichia coli* strains to neoglycans synthesised with prebiotic galactooligosaccharides. *Food Chem.* 141:2727-2734.
- Tuomola, E. M., A. C. Ouwehand, and S. J. Salminen. 1999. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Let. Appl. Microbiol.* 28:159-163.
- Tzortzis, G. 2009. Functional properties of the second generation prebiotic galacto-oligosaccharide (B-GOS). *Agro Food Ind. Hi Tech* 20:43-46.