

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Laktobacily a jejich interakce s klostridii a dalšími
sporovertnými bakteriemi kolonizujícími trávicí trakt
kojenců**

Diplomová práce

**Bc. Denisa Körberová
Výživa a potraviny**

doc. Ing. Věra Neuzil Bunešová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Laktobacily a jejich interakce s klostridii a dalšími sporetvornými bakteriemi kolonizujícími trávicí trakt kojenců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí práce doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, vstřícnost a cenné rady, kterých si vážím. Mé poděkování patří také Eugenio Ingribelli, MSc. za pomoc, ochotu a trpělivost při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině, svému příteli a přátelům, kteří mi byli oporou při celém studiu.

Laktobacily a jejich interakce s klostridii a dalšími sporotvornými bakteriemi kolonizující trávicí trakt kojenců

Souhrn

Vybrané kmeny laktobacilů mají schopnost produkovat v rámci svého metabolismu antimikrobiální látky, jako je například reuterin a jsou součástí probiotických doplňků. Mimoto i jejich primární metabolity, jako je laktát a acetát, mohou působit antimikrobiálně. Kdežto sporulující bakterie třídy Clostridia zahrnují velmi variabilní rody a druhy, od zdraví prospěšných butyrát produkujících bakterií s probiotickým potenciálem až po vysoce patogenní bakterie. Ve střevní mikrobiotě kojenců je přítomnost a aktivita potenciálně patogenních sporulujících bakterií ovlivněna jak přítomností přirozeně se vyskytujících prospěšných komenzálních bakterií, tak například probiotickou intervencí, kde se často jedná o kmeny laktobacilů. Je zde však předpoklad, že antimikrobiální aktivita vůči patogenním či komenzálním klostridiím bude u laktobacilů druhově či kmenově specifická.

V této diplomové práci byla *in vitro* zkoumána antimikrobiální aktivita 36 probiotických kmenů laktobacilů, jednalo se jak o lidské izoláty s potenciálem probiotika, tak o kmeny se statutem probiotika izolované z doplňků stravy a dalších produktů, proti 16 kmenům klostridií převážně izolovaných z trávicího traktu kojenců. Screening antimikrobiální aktivity byl proveden pomocí tří metod. Jednalo se o spotovou metodu (Agar Spot Test), která vykazovala velký počet pozitivních výsledků. Což ukazuje, že čerstvě narostlá kultura laktobacilů dokáže potlačit růst klostridií a nejedná se pravděpodobně pouze o působení metabolitů. Tento antimikrobiální účinek zřejmě spočívá v kombinaci působení antimikrobiálních metabolitů jako jsou organické kyseliny, ale i v působení dalších obranných mechanismů jako je tvorba exopolysacharidů a bakteriocinů. Dále bylo v testu inhibice produkce plynu zjištěno, že nejvíce laktobacilů dokáže inhibovat produkci plynu u kmenů *C. tertium*. Nicméně tato metoda potřebuje více opakování pro validní výsledky. Difúzní metoda potvrdila druhovou a kmenovou specifičnost antimikrobiální aktivity metabolitů laktobacilů. Největší antimikrobiální potenciál měly kmeny *Limosilactobacillus reuteri*, na jejichž antimikrobiální aktivitě se pravděpodobně podílí reuterin či další meziprodukty jeho metabolismu jako je 3-hydroxypropionová kyselina (3-HP). To potvrzují i výsledky testování difúzní metodou, kdy 3-HP působila antimikrobiálně v koncentraci 300 mM proti 15 z 16 testovým klostridiím, zhruba vůči polovině testovaných kmenů v koncentraci 150 mM. Taktéž testování kyseliny octové, mléčné a propionové přineslo pozitivní antimikrobiální účinky proti testovaným klostridiím. Celkově při difúzní metodě nejlepší výsledky vykazovaly laktobacily vůči *C. difficile*. *C. difficile* patří mezi nejčastější patogeny způsobující střevní infekce kojenců, proto se laktobacily jeví jako velmi vhodná probiotika pro kojence.

Klíčová slova: Antimikrobiální aktivita; probiotikum; laktobacily; klostridie; patogen; kojeneček

Lactobacilli and their interactions with clostridia and other sporeforming bacteria colonizing the digestive tract of infants

Summary

Selected strains of lactobacilli have the ability to produce antimicrobials such as reuterin as part of their metabolism and are included in probiotic supplements. In addition, their primary metabolites, such as lactate and acetate, may also be antimicrobial. Whereas the sporulating bacteria of the Clostridia class include highly variable genera and species, ranging from health-promoting butyrate-producing bacteria with probiotic potential to highly pathogenic bacteria. In the gut microbiota of infants, the presence and activity of potentially pathogenic sporulating bacteria is influenced by the presence of naturally occurring beneficial commensal bacteria as well as by probiotic intervention, for example, where lactobacilli strains are often involved. However, there is an expectation that antimicrobial activity against pathogenic or commensal clostridia will be species- or strain-specific in lactobacilli.

In this thesis, the antimicrobial activity of 36 probiotic strains of lactobacilli, both human isolates with probiotic potential and strains with probiotic status isolated from dietary supplements and other products, was investigated *in vitro* against 16 strains of clostridia mostly isolated from the digestive tract of infants. Screening for antimicrobial activity was performed using three methods. This was the spot method (Agar Spot Test), which showed a large number of positive results. What is indicating that a freshly grown culture of lactobacilli can inhibit clostridial growth and that it is probably not just the action of metabolites. This antimicrobial effect seems to be a combination of the action of antimicrobial metabolites such as organic acids, but also of other defence mechanisms such as the production of exopolysaccharides and bacteriocins. Furthermore, in the gas production inhibition test, it was found that *C. tertium* strains were the most able to inhibit gas production by lactobacilli. However, this method needs more repetitions for valid results. The diffusion method confirmed the species and strain specificity of the antimicrobial activity of lactobacilli metabolites. *Limosilactobacillus reuteri* strains had the greatest antimicrobial activity, there is probably involved reuterin or other intermediates of its metabolism, such as 3-hydroxypropionic acid (3-HP). This is confirmed by the results of the diffusion method, where 3-HP was antimicrobial at a concentration of 300 mM against 15 of the 16 test clostridia, and against about half of the strains tested at a concentration of 150 mM. Also, used acetic, lactic and propionic acids produced positive antimicrobial effects against the tested clostridia. Overall, lactobacilli showed the best performance against *C. difficile* in the diffusion method. *C. difficile* is one of the most common pathogens causing intestinal infections in infants, therefore lactobacilli appear to be very suitable probiotics for infants.

Keywords: Antimicrobial activity; probiotic; lactobacilli; clostridia; pathogen; infant

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Střevní mikrobiota kojence	12
3.1.1	Střevní sliznice	12
3.1.2	„Zdravý kojeneček“	12
3.1.2.1	Charakteristika a složení střevní mikrobioty	12
3.1.2.2	Vývoj střevní mikrobioty	13
3.2	Laktobacily	16
3.2.1	Obecná charakteristika	16
3.2.2	Charakterizace vybraných druhů laktobacilů	17
3.2.2.1	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	17
3.2.2.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	18
3.2.2.3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
3.2.2.4	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	18
3.2.3	Laktobacily ve střevní mikrobiotě kojenců	19
3.2.4	Antimikrobiální aktivita laktobacilů	20
3.2.4.1	3-hydroxypropionová kyselina	20
3.2.4.2	Reuterin	21
3.3	Klostridie	24
3.3.1	<i>Clostridium perfringens</i>	24
3.3.2	<i>Clostridiodes difficile</i>	25
3.3.3	<i>Clostridium butyricum</i>	25
3.3.4	<i>Eubacterium hallii</i>	26
3.3.5	Další klostridie navázané na mikrobiotu kojence	26
3.4	Interakce laktobacilů s klostridiiemi	27
4	Metodika	28
4.1	Materiály a metody	28
4.1.1	Příprava bakteriálních kultur k testování	30
4.1.1.1	Měření pH	30
4.1.2	Ověření identity testovaných kultur pomocí MALDI TOF MS	30
4.1.3	Příprava a složení kultivačních médií pro testování	31
4.1.4	Spotová metoda (Agar SPOT test)	32
4.1.5	Test produkce plynů	33
4.1.6	Disková difúzní metoda	34

4.1.6.1	Disková difúzní metoda pro kyseliny.....	34
4.1.7	Stanovení metabolitů v supernatantu laktobacilů pomocí iontové chromatografie	35
5	Výsledky	36
5.1	Výsledky testování spotovou metodou	36
5.2	Test produkce plynů	38
5.3	Difúzní metoda.....	40
5.3.1	Působení kyselin v diskové difúzní metodě	42
5.4	Porovnání spotové metody a difúzní metody	44
5.5	Stanovení metabolitů v supernatantu laktobacilů	45
6	Diskuze	46
7	Závěr	49
8	Literatura.....	50
9	Seznam tabulek.....	63
10	Seznam obrázků	64
11	Seznam použitých zkratk a symbolů	65
12	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Střevní sliznice je obzvláště dynamické prostředí, ve kterém neustále dochází k interakcím s biliony komenzálních mikroorganismů, kteří se pravidelně setkávají s patogeny nejrůznější povahy (Paréz-Lopez et al. 2016). Pokud dojde k dysbióze v raném věku, střevní mikrobiota může zůstat narušena po celý život a způsobuje tak větší náchylnost k neinfekčním onemocněním, náchylnější imunitní systém, dojde ke změně osy střevo-mozek (Di Profio et al. 2022), a může dojít k pozdějšímu rozvoji obezity (Turnbaugh et al. 2006), zánětlivých onemocnění střev (Gevers et al. 2014) či diabetu I. typu (Kostic et al. 2015).

Mnoho druhů klostridií se vyskytuje jako komenzálové střevní mikrobioty. Dysbalance mikrobioty však může vést k některým infekcím způsobeným těmito bakteriemi, zejména pak *Clostridioides difficile*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium butyricum*. V mnoha případech může po podání antibiotik dojít k opakované infekci, což ukazuje potřebu nových terapeutických možností, které budou působit na tyto potenciální patogeny a zároveň podpoří obnovu mikrobioty (Monteiro et al. 2019). Mikroorganismy, včetně laktobacilů, v tenkém a tlustém střevě dokončují proces trávení. Jejich metabolity jsou organické kyseliny s krátkým řetězcem, mezi které se řadí např. kyselina mléčná, octová. Tyto kyseliny snižují střevní pH a tím zhoršují podmínky pro nepřátelské bakterie. Také mohou svou přítomností ovlivnit ochranné funkce střevní sliznice, včetně syntézy a sekrece antibakteriálních peptidů a mucinů (Parvez et al. 2006).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Předpokládáme, že antimikrobiální aktivita vůči patogenním či komensálním klostridiím bude u laktobacilů druhově či kmenově specifická. Vzhledem ke značné variabilitě mezi klostridiemi (rod *Clostridium*) a dalšími sporulujícími bakteriemi třídy Clostridia, i zde bude zjištěna variabilita v citlivosti vůči laktobacilům. Cílem práce bylo zpracovat přehled o laktobacilech a sporulujících bakteriích třídy Clostridia, vyskytujících se v trávicím traktu kojenců, včetně dosavadních poznatků o jejich interakci se zaměřením na antimikrobiální aktivitu. V experimentální části pak testovat interakce mezi laktobacily a vybranými zástupci třídy Clostridia.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota kojence

3.1.1 Střevní sliznice

Střevní sliznice je obzvláště dynamické prostředí, ve kterém neustále dochází k interakcím s biliony komenzálních mikroorganismů, kteří se pravidelně setkávají s patogeny nejrozličnější povahy (Paréz-Lopez et al. 2016). Střevní mikrobiota se skládá z více než 1500 druhů rozdělených do více než 50 kmenů (Di Profio et al. 2022). Plocha epitelu střev je poměrně velká, protože klky zvětšují její povrch na 32 m² (Helander & Fändriks 2014). Povrch epitelu gastrointestinálního traktu představuje první ochrannou vrstvu při styku vnitřního a vnějšího prostředí. Druhým ochranným prostředkem je vrstva hlenu, která se skládá ze složité sítě mucinů a antimikrobiálních proteinů, které brání mikroorganismům v přístupu k epiteliálním buňkám. Třetí vrstvu ochrany představuje velké množství imunitních buněk, které sídlí ve střevě, a to buď v organizovaných strukturách, jako jsou Peyeroovy skvrny a mezenterální lymfatické uzliny, nebo roztroušené ve střevním epitelu. Tyto tři vrstvy společně tvoří bariéru, která brání mikroorganismům, aby se dostaly na systémová místa. Avšak mnoho patogenů vlivem vývoje dokáže uniknout i přes ochranné mechanismy hostitele a způsobit tak onemocnění (Paréz-Lopez et al. 2016).

3.1.2 „Zdravý kojeneček“

3.1.2.1 Charakteristika a složení střevní mikrobioty

Současná vědecká literatura identifikuje dětskou střevní mikrobiotu jako mnohostranný orgán ovlivňující řadu aspektů zdraví a vývoje jedince. Střevní mikrobiota kojenců je tvořena biliony mikrobiálních buněk, které sídlí především v tenkém a tlustém střevě (Turrone et al. 2022). Pokud dojde k dysbióze v raném věku, střevní mikrobiota může zůstat narušena po celý život a způsobuje tak větší náchylnost k neinfekčním onemocněním, náchylnější imunitní systém, dojde ke změně osy střev-mozek (Di Profio et al. 2022), a může dojít k pozdějšímu rozvoji obezity (Turnbaugh et al. 2006), zánětlivých onemocnění střev (Gevers et al. 2014) či diabetu I. typu (Kostic et al. 2015). Stále více důkazů naznačuje, že nitroděložní prostředí není sterilní, jak se dříve předpokládalo, ale během těhotenství dochází k přenosu mikrobioty mezi matkou a plodem (Vandenplas et al. 2020).

Matka je důležitým rezervoárem bakterií novorozence. V přenosu z matky na dítě dominují bakterie z rodu *Bacteroides* a *Actinobacteria*, z nichž nejvíce zastoupený rod je *Bifidobacterium*. Nejčastěji to jsou druhy *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a *Bifidobacterium bifidum*, které jsou schopné metabolizovat oligosacharidy přítomné v mateřském mléce. Společně s nimi jsou schopné metabolizovat oligosacharidy z mateřského mléka také druhy rodu *Bacteroides*, jako jsou druhy *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides dorei* a *Bacteroides vulgatus*. Spolu s *Bacteroides* dominují ve střevní mikrobiotě dospělého člověka Firmicutes, které se přenáší z matky na novorozence. Nicméně pouze

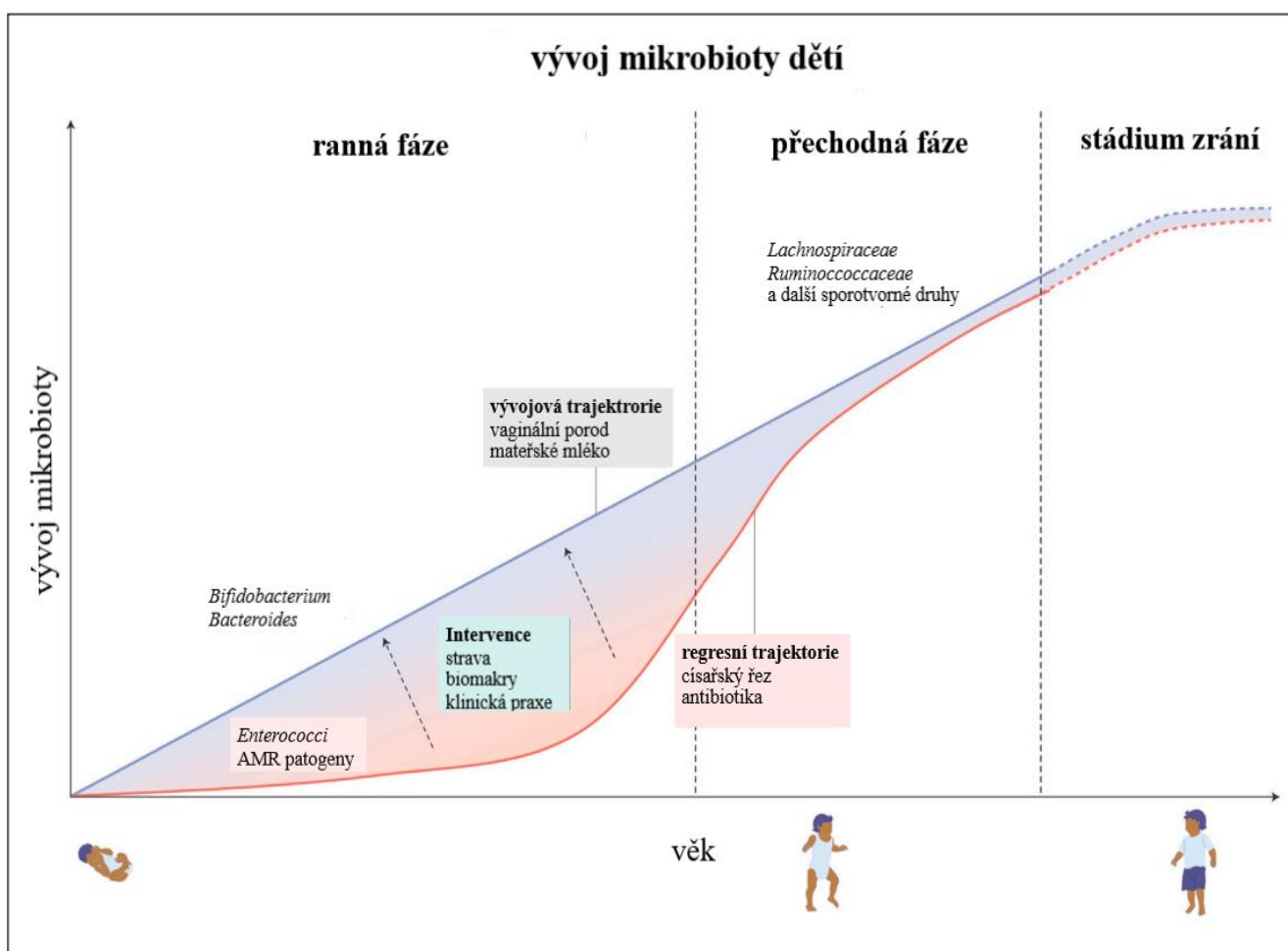
Streptococcus thermophilus a *Veillonella parvula* z nich přetrvávají po prvním měsíci života (Browne et al. 2022).

3.1.2.2 Vývoj střevní mikrobioty

První faktor, který ovlivňuje lidskou mikrobiotu, přichází z matky v průběhu vývoje plodu. Plod je vystavený metabolitům mikrobiálních společenstev matky skrze placentu, které se otisknou do jeho imunitního systému a mohou tak ovlivňovat mikrobiotu jedince v pozdějším životě (Martino et al. 2022). Například střevní mikrobiota matky rozkládá vlákninu na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, jako je acetát, které v tkáni plodu ovlivňuje imprinting spojený s tvorbou T buněk a mohou být spojovány s ochranou před rozvojem astmatu v dospělosti (Thorburn et al. 2015). He et al. (2020) analyzovali 39 párů vzorků (matka-dítě) smolky, plodové vody, stolice, vaginální tekutiny a slin matek a zjistili, že mikroorganismy ve smolce pocházejí z více zdrojů, ale především z plodové vody.

Záhy po narození dojde k osídlení mikroorganismy z matky (především z vagíny, mateřského mléka, kůže, jazyka) a následně z okolního prostředí. Mikroorganismy se dostávají do těla a na povrch těla, kde dochází k rychlému vývoji především u dětí do jednoho roku života (Browne et al. 2022). Studie ukázaly, že složení střevní mikrobioty vaginálně narozených dětí je odlišné od dětí narozených císařským řezem (Stewart et al. 2018). Prostředí obklopující novorozence je dalším přirozeným zdrojem mikrobů, které mohou kolonizovat různá místa těla. Například používání společných předmětů, dotýkání se společných povrchů či vzduch v místnostech. Předpokládá se, že častý kontakt s domácími mazlíčky v raném věku pomáhá rozvoji imunity (Savino et al. 2010). V průběhu času vznikají ekosystémy vyznačující se taxonomickou bohatostí a funkční schopností. Tento proces má různé fáze. Ranou fází, která trvá 6-12 měsíců, kdy dochází k odstavení kojence od mateřského mléka. Tato fáze je důležitým vývojovým oknem pro imunologický a fyziologický vývoj (Browne et al. 2022). Mateřské mléko, které se skládá z laktózy, lipidů, bílkovin a více než 200 různých oligosacharidů, se doporučuje jako první výživa v kojeneckém věku a poskytuje všechny potřebné živiny pro podporu růstu a vývoje. Oligosacharidy z mateřského mléka nejsou hydrolyzovány sacharolytickými enzymy trávicího traktu a dostávají se do tlustého střeva, kde slouží jako metabolické substráty pro střevní bifidobakterie. Produkty metabolismu oligosacharidů (acetát, mravenčan, laktát, 1,2-propandiol) mají příznivé účinky na zdraví hostitele, protože potlačují růst patogenů patřících do čeledí *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* a *Staphylococcaceae*. Kojenci, kteří přijímají výhradně umělou výživu mají odlišnou mikrobiotu, která se vyznačuje nižším výskytem rodu *Bifidobacterium* a zvýšeným výskytem *Clostridium* a *Enterobacteriaceae*, což pravděpodobně koreluje s nedostatkem oligosacharidů z mateřského mléka a vyšším obsahem bílkovin v umělé stravě. Mnohé umělé výživy jsou v dnešní době doplňovány fruktooligosacharidy (FOS) a/nebo galaktooligosacharidy (GOS), přestože to nejsou oligosacharidy z mateřského mléka mohou být využitelné pro většinu druhů bifidobakterií (Di Profio et al. 2022). Další stádium je spojené s přechodem na pevnou stravu, což vede ke kolonizaci různými sporulujícími druhy a snížení množství rodu *Bifidobacterium* (Browne et al. 2022). Kromě toho je zde vyšší přítomnost druhů *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*, což je odraz vyšší rozmanitosti a komplexnosti stravy

v důsledku zavedení vlákniny do stravy (z ovoce, zeleniny a obilovin) a nových zdrojů bílkovin (jako je maso, mléčné výrobky a luštěniny) (Di Profio et al. 2022). Stádium zrání se již podobá složení dospělého člověka tedy hojně zastoupení druhů Bacteroidetes a Firmicutes. Průběh vývojové trajektorie střevní mikrobioty viz Obrázek 1 (Browne et al. 2022). V dětském věku je stravovací prostředí klíčové pro získání správných návyků, které mají později vliv na střevní mikrobiotu a zdraví hostitele. Středomořská strava, která se vyznačuje nízkým zastoupením zpracovaných potravin a vysokým příjmem vlákniny a také antioxidantů se jeví jako velmi vhodná pro zvýšení diverzity střevní mikrobioty, což znamená vyšší počty Bacteroidetes, laktobacilů, bifidobakterií, *Faecalibacterium* spp. a nižší počty Firmicutes a Proteobacteria (Di Profio et al. 2022).



Obrázek 1: Vývoj mikrobioty dětí. Vysvětlivka: AMR patogeny = rezistentní patogeny (upraveno podle Browne et al. 2022).

Doplňování kojenecké mléčné výživy o probiotika a prebiotika je stále běžnější (Tamburini et al. 2016). Kojenecká výživa se vyrábí tak, aby se co nejvíce podobala mateřskému mléku, které obsahuje kromě základních složek poskytujících energii také bakteriální kmeny, protilátky, hormony, imunitní buňky. Ve snaze napodobit tento vysoce funkční "koktejl" zkoumají výrobci možnosti fortifikace kojenecké výživy o širší paletu složek než obsahuje kravské mléko, ze kterého se vyrábí. Mezi takové složky patří probiotika, prebiotika a synbiotika (Dias et al. 2022). Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika

a prebiotika definuje prebiotika jako substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy a přináší zdravotní prospěch (Gibson et al. 2017). Mezi příklady prebiotik, která se v současné době používají v kojenecké výživě, patří oligosacharidy (např. GOS, FOS, rozpustná fermentovatelná vláknina a rostlinné polyfenoly (Dias et al. 2022). Světová zdravotnická organizace (WHO; World Health Organization) a Organizace pro výživu a zemědělství (FAO; Food and Agriculture organization of the United Nations) popisují probiotika jako živé organismy, které při konzumaci v přiměřeném množství přinášejí hostiteli prospěch (Guarner et al. 2011). Nejčastěji používanými probiotickými bakteriemi v doplňcích stravy jsou laktobacily (*L.*) a bifidobakterie (Tamburini et al. 2016; Dias et al. 2022). Na základě 15 studií lze konstatovat, že suplementace probiotiky může snížit riziko infekce gastrointestinálního traktu (GIT) o 26 %, přičemž *Lactocaseibacillus paracasei*, *Limosilactobacillus reuteri* a *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG jsou specificky účinné probiotické kmeny při snižování výskytu a délky trvání infekce GITu (Ahmad et al. 2022). Konkrétně podání *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938 denně kojencům v raném věku může zlepšit příznaky kojenecké koliky (Savino et al. 2010). Dále bylo zjištěno, že dlouhodobá suplementace *L. rhamnosus* GG má vliv na střevní mikrobiotu dětí. Způsobuje zvýšení početnosti kmenů *Lactococcus*, *Ruminococcus* a naopak snižuje zastoupení *Escherichia*. Zdá se, že léčba pomocí *L. rhamnosus* GG brání některým změnám v mikrobiotě, které by mohlo způsobit užívání penicilinu (Korpela et al. 2016). Celkově se předpokládá, že probiotika a prebiotika hrají důležitou roli při modulaci střevní mikrobioty (prostřednictvím podpory skupin prospěšných bakterií a kompetitivního vyloučení patogenů) a v regulaci imunitního systému (ovlivněním slizničních imunitních mechanismů, regulací sekrece imunoglobulinů a cytokinů a podporou integrity střevní epitelální bariéry) (Dias et al. 2022).

Antibiotika patří mezi nejčastěji předepisované léky pro děti. Avšak užívání antibiotik po narození může narušit křehký novorozenecký mikrobiom (Savino et al. 2010).

3.2 Laktobacily

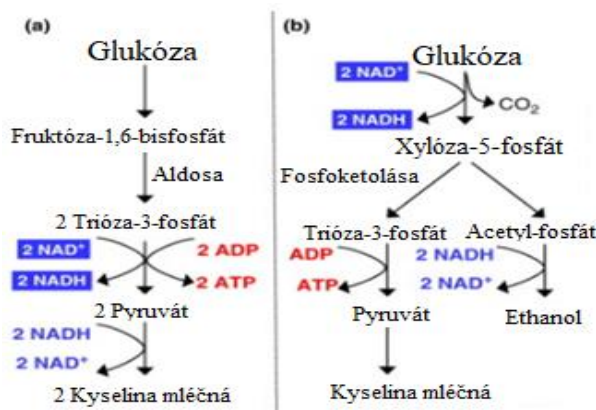
3.2.1 Obecná charakteristika

Rod *Lactobacillus* vytvořen Beijerinckem v roce 1901. Zahrnuje grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující mikroorganismy. Tento rod je řazen do kmene Firmicutes, třídy Bacilli, řádu Lactobacillales, čeledi *Lactobacillaceae*, která zahrnovala rody *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* a *Pediococcus*. Dřívější taxonomie laktobacilů byla založena na fenotypových vlastnostech včetně optimální teploty růstu, využití sacharidů a spekter produkovaných metabolitů. Později ve 20. století byla pro vymezení nových bakteriálních druhů použita genotypová a chemotaxonomická kritéria včetně hybridizace DNA, obsahu mol % G+C a chemické struktury peptidoglykanu. Od roku 1983 se v bakteriální taxonomii používá podobnost genů 16S rRNA, která poskytuje fylogenetická schémata jako páteř pro klasifikaci a nomenklaturu. Během posledních 15 let se stalo široce dostupné sekvenování celých bakteriálních genomů, a jako zlatý standard pro vymezení nových bakteriálních druhů byly zavedeny hodnoty průměrné nukleotidové identity (ANI; average nucleotide identity) genů sdílených mezi dvěma bakteriálními genomy (Zheng et al. 2020).

Rod *Lactobacillus* zahrnoval 261 druhů ještě v březnu 2020. Jednalo se o druhy velmi rozmanité na úrovni fenotypové, genotypové i ekologické. Po zhodnocení fylogeneze jádra genomu, ANI, projevu genů skupiny organismů, o nichž se předpokládá, že se vyvinuly ze společného předka, podle zásad kladistiky, fyziologického kritéria a ekologie organismu byl rod *Lactobacillus* requalifikován do 23 nových rodů s názvy: *Holzappelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioa*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* a *Lentilactobacillus*. Rodový výraz „laktobacily“ zůstává pro označení všech organismů, které byly do roku 2020 klasifikovány jako *Lactobacillaceae*. Tato requalifikace odráží fylogenetickou pozici mikroorganismů a výrazné klady skupinového sdílení ekologických a metabolických vlastností (Zheng et al. 2020).

Laktobacily se řadí mezi bakterie mléčného kvašení (BMK), které jsou hlavně grampozitivní, anaerobní, kataláza negativní, nesporulující bakterie. Mají mnoho asociací s lidmi. Jsou součástí intestinální mikrobioty získané po narození. Jsou součástí široké škály potravin (zelenina, víno, mléko, maso). Jsou také potřebné pro výrobu mnoha potravin nejen v mlékařství a zelinářství, ale též při výrobě vína, kávy a kakaa. Některé z BMK jsou patogenní, nebo jsou schopné produkovat antimikrobiální látky nazývané bakteriociny. BMK jsou převážně mezofilní (některé kmeny jsou termofilní), což znamená, že mohou růst v rozmezí teplot 5-45 °C. Jsou acidotolerantní, proto jsou schopné růst ve velmi nízkých hodnotách pH (až 3,8). Většina BMK je proteolytická s přísnými požadavky na obsah aminokyselin. Jsou to mikroorganismy, které nazýváme BMK, pro jejich vlastnost produkovat kyselinu mléčnou. Produkovaná kyselina mléčná může být ve formě L(+) nebo D(-) izomerů. Nejvíce z nich řadíme do skupiny, která jsou gram pozitivní Firmicutes, zbytek, který je gram negativní patří do skupiny Actinocobacteria (Forsythe 2010).

BMK zahrnuje bakterie s oběma typy metabolismu – homofermentativní i heterofermentativní (viz Obrázek 2). Homofermentativní produkují dvě molekuly kyseliny mléčné při fermentaci molekuly glukózy, naproti tomu heterofermentativní mikroorganismy produkují různé metabolity, mezi které patří také kyselina mléčná, ale spolu s ní i ethanol, kyselina octová, kyselina mravenčí, peroxid vodíku (Forsythe 2010).



Obrázek 2: Schéma homofermentace (a) a heterofermentace (b) glukózy (upraveno podle Ganzle 2015).

3.2.2 Charakterizace vybraných druhů laktobacilů

3.2.2.1 *Limosilactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri nově nese označení *Limosilactobacillus reuteri*. *Limosus* znamená slizký, což odkazuje na vlastnosti většiny kmenů z rodu *Limosilactobacillus*, využívané k výrobě exopolysacharidů ze sacharózy. *Limosilactobacilly* jsou grampozitivní, heterofermentativní anaerobní nebo aerotolerantní tyčinky. Růst je pozorován při 37 °C u většiny druhů (Zheng et al. 2020). *L. reuteri* je anaerobní probiotikum sídlící v lidském gastrointestinálním traktu. Fermentací glycerolu produkuje antimikrobiální sloučeninu reuterin, která inhibuje růst některých grampozitivních a gramnegativních bakterií (Spinler et al. 2017).

L. reuteri se nachází v mikrobiotě obratlovců, ale také ve fermentovaných potravinách (Zheng et al. 2015). Byl izolován z mnoha potravin. Především z mléčných produktů (Dellaglio et al. 1981). Vyskytuje se také při fermentaci obilí, a tudíž se nachází v pekařském kvasu (Gänzle 2015). *L. reuteri* je navrhován jako vhodný pro konzervaci fermentovaných mléčných produktů, který zároveň nemění konzistenci výsledného produktu (Ortiz-Rivra et al. 2017). *Limosilactobacillus* spp., zejména *L. reuteri*, se komerčně vyrábějí pro použití jako startovací kultura a také jako probiotická kultura (Zheng et al. 2020). Jeho hojnost se u různých jedinců liší. U lidí se vyskytuje v různých částech těla, včetně gastrointestinálního traktu, močových cest, kůže a mateřského mléka (Mu et al. 2018). Poprvé byl izolován *L. reuteri* DMS 20016 v roce 1962 ze střeva dospělého člověka (Kandler et al. 1980). *L. reuteri* je schopný se adaptovat na potravní a střevní stanoviště, což naznačuje, že tato dvě stanoviště vyvíjejí odlišný selektivní tlak související s rychlostí růstu a energetickým (sacharidovým) metabolismem (Zheng et al. 2015). Střevní mikroby obratlovců se diverzifikací přizpůsobují hostiteli, což vychází z experimentu, který odhaluje genetickou heterogenitu v populaci *L. reuteri* u různých obratlovců (Oh et al. 2010). Kmeny *L. reuteri* a *Lactobacillus johnsonii* jsou autochtonní pro

hlodavce a střeva prasat, protože byly zjištěny v několika studiích téměř u všech zvířat (Salzman et al. 2002; Leser et al. 2002; Brooks et al. 2003).

3.2.2.2 *Lactobacillus rhamnosus*

L. rhamnosus je grampozitivní bakterie přítomna v mnoha druzích fermentovaných potravin. Je schopna přežít v různých prostředích, včetně střev (Pascual et al. 2008). Má probiotické vlastnosti (Huang et al. 2020). Bylo zjištěno, že *L. rhamnosus* se dokáže navázat na povrch střevní hlenové bariéry a kolonizovat ji, čímž brání patogenním mikroorganismům proniknout do střevní bariéry (Kolinska et al. 2018). *L. rhamnosus* moduluje imunitní odpověď střevních lymfatických buněk prostřednictvím bakteriálních produktů (Yang et al. 2019) a složek buněčné stěny (Claes et al. 2010). *L. rhamnosus* může ovlivnit funkci střevní bariéry sekrecí mucinu, regulací apoptózy epitelálních buněk. Déle *L. rhamnosus* ovlivňuje složení střevní mikrobioty prostřednictvím konkurence o živiny a adheze na sliznici (Gamallat et al. 2016).

3.2.2.3 *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus je homofermentativní, mikroaerofilní grampozitivní mikroorganismus, jehož morfologie je tyčinkovitého tvaru. Bakteriociny, které tvoří, jsou si strukturně podobné, ale liší se jejich spektrum antimikrobiální aktivity. Jsou termostabilní a zachovávají si svou aktivitu v širokém rozmezí pH spolu se silnými inhibičními účinky proti kazícím se potravinám a patogenním bakteriím, což z nich činí důležitou biokonzervační třídu. *L. acidophilus* lze přidávat jako přídatek do mnoha procesů fermentace potravin, což způsobí jedinečnou chuť, vůni a strukturu (Anjum et al. 2014).

L. acidophilus NCFM je probiotický kmen dostupný v běžných potravinách (mléko, jogurt, kojenecká výživa) a doplňcích stravy. Jeho komerční dostupnost je podmíněná jeho bezpečností, snadnou komerční manipulací, biochemickými a fyziologickými vlastnostmi, které jsou podstatné pro probiotickou funkci u člověka. Kmen byl charakterizován *in vitro*, ve studiích na zvířatech a u lidí. Kmen NCFM je předkem kmene, který se používá pro kompletní sekvenování chromozomů, a proto je základním kmenem pro pochopení vztahu mezi genetikou a funkcí probiotik. Adheruje k buněčným systémům vylučující hlen, produkuje antimikrobiální sloučeniny a je vhodný pro genetickou manipulaci a cílené zavádění DNA. V pokusech na myších byl dokázán potenciál snížení rizika rakoviny tlustého střeva. Směs obsahující *L. acidophilus* NCFM snížila výskyt dětských průjmů. Přiměřené podávání může usnadnit trávení laktózy u osob s laktózovou intolerancí (Sanders & Klaenhammer 2001).

3.2.2.4 *Lacticaseibacillus casei*

Kmeny *Lacticaseibacillus* jsou homofermentativní, většina metabolizuje pentózy prostřednictvím fosfoketolázy. Jedná se o nepohyblivé kmeny, oxidáza negativní, často produkují D a L formu kyseliny mléčné z glukózy. Teplotní optimum je proměnlivé, ale nikdy není nižší než 10°C a vyšší než 45°C. Tento rod má značný hospodářský význam, protože zahrnuje několik druhů, které jsou využívány jako startovací kultury při mléčném kvašení a jako probiotika (Zheng et al. 2020).

3.2.3 Laktobacily ve střevní mikrobiotě kojenců

Mezi první bakterie kolonizující lidské tělo patří laktobacily (Rautava et al. 2012). Laktobacily jsou spojovány se zdravě fungujícím střevem, a proto se tato skupina běžně používá jako probiotika (Aakko et al. 2015). Laktobacily zahrnují nejvíce charakterizovaných probiotik, jak můžeme vidět v Tabulce 1, k čemuž přispívá to, že jejich zástupci dokážou využít velké množství sacharidů. Tato skutečnost jim zajišťuje zvládnutí vysoce konkurenčních prostředí jako je gastrointestinální trakt (Zúñiga et al. 2021). Důkazy naznačují, že podávání probiotik v novorozeneckém období může vést k udržení střevní kolonizace 6-12 měsíců po jejich vysazení. Informace o dlouhodobé udržitelnosti kolonizace jsou omezené, proto je v této oblasti potřeba provést více randomizovaných kontrolovaných studií, které budou správně navrženy a budou obsahovat kmenově specifické testy (Srinivasjois et al. 2023). Časná kolonizace laktobacily, konkrétně kmenem *L. casei*, byla spojena se sníženým rizikem vzniku alergie a atopické dermatitidy (Penders et al. 2010). Kromě toho se uvádí, že nízká prevalence laktobacilů, může být rizikovým faktorem nadměrného pláče a neklidu kojenců (Pärtty et al. 2012). Studie porovnávající kojence z oblasti Malawi a z finské kojence prokázala, že malawijští kojenci měli hojnější, bohatší a rozmanitější zastoupení laktobacilů v mikrobiomu. Na základě tohoto poznatku je předpokládáno, že mezi faktory ovlivňující tyto rozdíly může patřit prostředí, strava a hygiena (Aakko et al. 2015).

Tabulka 1: Nejčastější druhy probiotik. (Parvez et al. 2006; Śliżewska et al. 2021)

Laktobacily	<i>Bifidobacterium</i> sp.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. animalis</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>B. longum</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>B. lactis</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	
<i>Levilactobacillus brevis</i>	
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	
<i>Lentilactobacillus kefir</i>	
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
	<i>S. diacetylactis</i>
	<i>S. intermedius</i>

3.2.4 Antimikrobiální aktivita laktobacilů

Mikroorganismy v tenkém a tlustém střevě dokončují proces trávení. Jejich metabolity jsou organické kyseliny s krátkým řetězcem, mezi které se řadí např. kyselina mléčná, octová. Tyto kyseliny snižují střevní pH a tím zhoršují podmínky pro nepřátelské bakterie. Také mohou svou přítomností ovlivnit ochranné funkce střevní sliznice, včetně syntézy a sekrece antibakteriálních peptidů a mucinů (Parvez et al. 2006). Biliony mikroorganismů sídlících v gastrointestinálním traktu zajišťují řadu nezbytných ochranných a metabolických funkcí přispívajících ke zdraví hostitele, které zahrnují zpracování potravin, trávení nestravitelných polysacharidů, ničení patogenů a syntéza vitaminů. Metabolismus sacharidů vede k produkci krátkých řetězců mastných kyselin, jako je butyrát a propionát, které slouží jako důležitý zdroj živin (Clarke et al. 2014).

Propan-1,2,3-triol neboli glycerol běžně najdeme ve střevě. Je k dispozici jako produkt mikrobiální fermentace (trávení tuků, hlenu, buněk epitelu). Zástupci rodů *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, laktobacily a *Eubacterium hallii* jsou schopni redukčně metabolizovat glycerol na 3-hydroxypropionaldehyd (3-HPA) a následně ihned redukovat na 1,3-propandiol (1,3-PDO), což způsobí 1,3-propandioldehydrogenáza během růstu (Engels et al. 2016). Meziprodukt 3-HPA využívá enzymy kódované v jeho propandiol operonu (*pdu*). Přeměna glycerolu na 1,3-PDO a 3-hydroxypropionovou kyselinu (3-HP) je vyvolána dehydratací glycerolu na 3-HPA. Tato reakce je katalyzována enzymem B12 glycoldehydratásou. Následující přeměna 3-HPA na 1,3-PDO je katalyzována 1,3-propandioloxidoreduktásou a alkoholdehydrogenásou. Tato reakce je spojena s regenerací jednoho molu nikotinamidadeninukleotid (NAD⁺) a produkovaného molu 1,3-PDO, což umožňuje, aby glycerol byl nepřetržitě vyživán rostoucími buňkami jako elektronový příjemce pro konverzi nikotinamidadeninukleotid (NADH) generované během metabolismu cukru a růstu buněk. Naproti tomu buňky v klidovém režimu budou v této reakci pokračovat pouze do doby, než budou spotřebovány všechny molekuly NADH dostupné v buňce (Dishisha et al. 2014).

3.2.4.1 3-hydroxypropionová kyselina

Z chemického hlediska je 3-hydroxypropionová kyselina (3-HP) tří uhlíkatá, opticky neaktivní, organická sloučenina. 3-HP je strukturální izomer mléčné kyseliny (2-hydroxypropionové kyseliny) (Datta 1995).

Organické kyseliny mají obecnou strukturu R-COOH. Organické kyseliny s krátkým řetězcem (C1-C7) jsou spojovány s antimikrobiální aktivitou. Patří mezi ně kyseliny s jednou karboxylovou skupinou (mravenčí kyselina, octová kyselina, propionová kyselina, máselná kyselina) nebo karboxylové kyseliny nesoucí navíc další karboxylové skupiny (nejčastěji na alfa uhlíku), jako je mléčná kyselina, jablečná kyselina, vinná kyselina a citrónová kyselina. Organické kyseliny jsou slabé kyseliny a jsou pouze částečně disociované (Dibner & Buttin 2002). Hlavně nedisociovaná forma organických kyselin vstupuje do buňky a okyseluje cytoplazmu mikroorganismů. Pokles pH cytoplazmy mění aktivitu enzymů a poškozuje strukturální proteiny a nukleové kyseliny (Mani-López et al. 2012). Stejně jako jiné kyseliny, je 3-HP toxická pro růst buněk a jejich produkci (Ashok et al. 2013).

Zástupci *Lentilactobacillus* spp. produkují propionovou kyselinu *in situ* při obilných fermentacích (Zhang et al. 2010). Kyselina propionová a její soli se používají jako inhibitory plísní v pekárenských výrobcích a patří tedy mezi povolené konzervační látky (Moresi & Parente 2014). Naproti tomu pouze málo studií zkoumalo konzervační potenciál 3-HP (Chun et al. 2014; Sankaranarayanan et al. 2014).

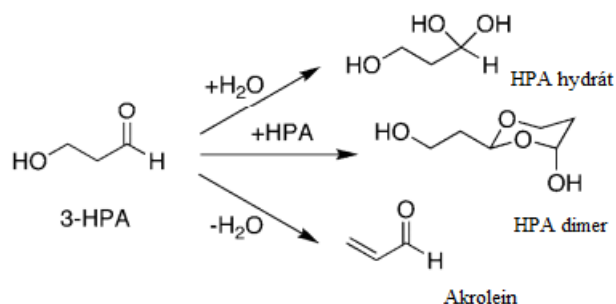
Mnoho mikroorganismů může produkovat 3-HP, buď jako meziproduct, nebo jako konečný produkt metabolismu. 3-HP lze tedy biologicky vyrobit z glukózy nebo glycerolu (Kumar et al. 2013). Existuje i několik chemických metod pro výrobu 3-HP z prekurzorů, jako je akrylová kyselina, lakton kyseliny 3-hydroxypropanové, 3-hydroxypropannitril, 2-propenol, 1-acetoxyethylen a 1,3-dihydroxypropan. Avšak tyto chemické procesy jsou nebezpečné pro životní prostředí, jsou časově náročné a nákladné, proto si získává zájem biologická cesta (Tingirikari et al. 2016). 3-HP se používá při syntéze řady průmyslových látek, jako je akrylová kyselina, 1,3-propandiol, methylakrylát, propionlakton, malonová kyselina a akryl amid. Tyto sloučeniny se používají pro výrobu lepidel, polymerů, vláken, plastových obalů, pryskyřic a čistících prostředků (Datta 1995; Huang et al. 2013; Tingirikari et al. 2016).

3.2.4.2 Reuterin

Reuterin je antimikrobiální látka účinná proti mnoha patogenům, včetně mikroorganismům způsobujícím kažení. Jeho vysoká rozpustnost ve vodě, odolnost vůči teplu, proteolytická a lipolytická aktivita a stabilita v široké škále hodnot pH, činí z reuterinu ideální přírodní ochranu pro potraviny. Reuterin produkovaný *L. reuteri* DPC16 prokázal významné snížení bakteriální populace proti grampozitivním (př. *Staphylococcus aureus*) a gramnegativním (př. *Escherichia coli*) bakteriím (Gyawali & Ibrahim 2014). Reuterin udává konkurenční výhody místu působení, například gastrointestinálnímu traktu (Stevens et al. 2011). Hlavní mechanismus antimikrobiální aktivity reuterinu je předpokládána nerovnováha buněčného redoxního stavu vyplývajícího z reakce 3-HPA s volnými thiolovými skupinami, což způsobuje vyčerpání glutathionu a změnu proteinů, včetně funkce enzymů (Engels et al. 2016).

Produkce reuterinu byla zpočátku pozorována pouze u druhů *L. reuteri*, které můžeme najít jako součást mikrobioty u lidí a zvířat. Nicméně bylo prokázáno, že druhy *L. brevis*, *Lentilactobacillus buchneri* a *Loigolactobacillus coryniformis* jsou také schopné reuterin produkovat (Bianchini & Bullerman 2010). Dále ho můžou syntetizovat zástupci *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter* a *Klebsiella*. Ovšem reuterin jako meziproduct těchto bakterií degraduje na 1,3-propandiol, vodu a oxid uhličitý. Pouze u *L. reuteri* je aktivita oxidoreduktázy, která degraduje reuterin, dostatečně nízká, aby se za anaerobních podmínek nahromadilo dostatečné množství, které je toxické pro jiné bakterie (Begunova et al. 2020).

Na Obrázku 3 je vidět, že reuterin může tvořit dimery HPA, nebo být hydratován na HPA hydrát. Reuterin může být také dehydratován do toxické sloučeniny akroleinu (Vollenweider & Lacroix 2004). Akrolein byl identifikován jako hlavní složka zodpovědná za antimikrobiální aktivitu reuterinu. Kromě prospěšné antimikrobiální funkce je reuterin spojen s procesem konjugace heterocyklických aminů, které jsou potenciální pro biologickou dostupnost toxických látek v lidském střevě (Engels et al. 2016).



Obrázek 3: Reuterin (upraveno podle Schaefer et al. 2010).

Přestože antimikrobiální mechanismus reuterinového systému zůstává nejasný a diskutabilní, byly analyzovány struktury některých antimikrobiálních sloučenin v systému a předběžně navrženy jejich antimikrobiální mechanismy. Dimer 3-HPA může vykazovat antimikrobiální aktivitu prostřednictvím působení jako kompetitivní inhibitor ribonukleotidreduktázy, která je zodpovědná za syntézu DNA buněk (Vollenweider et al. 2003). Antimikrobiální aktivitu 3-HPA lze přičíst aldehydovým skupinám 3-HPA, které mohou vyvolat oxidační poškození bakterií vyčerpáním volných sulfhydrylových skupin v malých proteinech a dalších molekulách, jako je redukovaný glutathion a enzymy (Schaefer et al. 2010). Kromě toho může 3-HPA v koncentracích vyšších než 10 μ M snížit expresi genů virulence u *Helicobacter pylori* (Urrutia-Baca et al. 2018). Pozoruhodné je, že akrolein může vyčerpávat volné sulfhydrylové skupiny redukované na glutathion a dalších enzymů, tím může vyvolat oxidační poškození bakterií a přispět k antimikrobiální aktivitě reuterinového systému. Kromě toho 3-HPA působí synergicky s akroleinem při inhibici mikrobiálního růstu (Engels et al. 2016). Celkově lze říci, že použití reuterinového systému jako konzervačního prostředku v potravinách vyžaduje stále další poznatky o jeho antimikrobiálních mechanismech (Sun et al. 2022).

Stabilita reuterinového systému je ovlivněna teplotou, prostředím pH atd. Kromě toho je 3-HPA dobře rozpustný ve vodě, odolný vůči proteázám, lipázám, nukleázám a podléhá teple (100 °C po dobu 10 min) (Stevens et al. 2011). Ze studie Castellani et al. (2021) vyplývá, že 3-HPA v supernatantu získaném dvoustupňovým procesem byl stabilní při -20 °C po dobu minimálně 35 dnů a poté pomalu stabilita klesá. Opakované cykly zmrazování a rozmrazování navíc způsobily pokles 3-HPA při každém z cyklu. Kromě toho byla degradace 3-HPA na akrolein ve vodném roztoku větší při vysokých teplotách (37 °C a 40 °C), zatímco při 4 °C po dobu 4 týdnů docházelo k velmi malé degradaci (Ju et al. 2021). Analýza provedena Engels et al. (2016) naznačuje, že 3-HPA a akrolein je mnohem stabilnější při nízké teplotě a kyselém pH.

Navzdory nedostatku klinických studií několik studií *in vitro* a *in vivo* ukazuje, že systém reuterinu vykazuje určité zdravotní benefity, pravděpodobně prostřednictvím interakce s hostitelskou mikrobiotou a změnami metabolismu (Sun et al. 2022). Celosvětová analýza mikrobiomu a metabolomiky potvrdila, že aplikace *L. reuteri* spolu s glycerolem bylo účinné proti *Cl. difficile* (Spinler et al. 2017). V modelu tlustého střeva *in vitro*, kde byla imobilní mikrobiota vystavena reuterinu. Přídavek samotného glycerolu či v kombinaci s *L. reuteri*

zvýšil počty bakterií skupiny laktobacilů, enterokoků a snížil počty bakterií *Escherichia coli*. Přídavek reuterinu významně a selektivně snížil počet *E. coli*, aniž by ovlivnil ostatní bakteriální populace. Pozorovaný pokles koncentrace *E. coli* během přidavku glycerolu (v přítomnosti nebo nepřítomnosti *L. reuteri*) mohl být způsoben produkcí reuterinu *in situ*, protože během přidavku glycerolu byl zjištěn 1,3-propandiol, typický produkt glycerolové fermentace (Cleusix et al. 2008). V současné době neexistují žádné zprávy o rezistenci patogenních mikroorganismů vůči systému reuterin. Předpokládá se, že reuterin má baktericidní účinek na *S. aureus*, který je rezistentní vůči meticilinu (Yehia et al. 2022).

3.3 Klostridie

Klostridie jsou významným rodem/skupinou grampozitivních, obligátně anaerobních, tyčinkovitých bakterií tvořících spory, které fylogeneticky patří do říše Firmicutes. Tento rod zahrnuje významné lidské a zvířecí patogeny, které způsobují potenciálně smrtelná onemocnění jako je tetanus a botulismus. O významu rodu svědčí více než 42000 záznamů v databázi PubMed a přibližně 1700 genomových sekvencí z této skupiny uložených v databázi GenBank. Mezi klinicky významné klostridie se řadí *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridioides difficile*, *Clostridium tetanum*. Avšak pouze *C. botulinum* a *C. perfringens* způsobují otravy z jídla (Forsythe 2010). Patogenní klostridie produkují největší počet život ohrožujících toxinů ze všech rodů (Cruz-Moreles et al. 2019).

Nicméně klostridie jsou běžnými komenzály lidského střeva (Monteiro et al. 2019) a mají svou nezastupitelnou roli jakožto producenti butyrátu ve střevě. Butyrát je kyselinou s krátkým řetězcem (SCFA; short-chain fatty acid), která má větší fyziologický význam než ostatní SCFA (acetát a propionát). Většina producentů butyrátu patří mezi klostridie, jedná se o zástupce rodů *Feacalibacterium*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Anaerostipes*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum* a *Anaerobutyricum*. Většina butyrátu v tlustém střevě vzniká metabolizací vlákniny. Avšak v menším množství může vznikat z aminokyselin. Butyrát je využíván kolonocyty k tvorbě energie, stabilizuje hypoxii k udržení anaerobního prostředí ve střevě, udržuje integritu střevní bariéry, omezuje prozánětlivé cytokiny a inhibuje onkogenní dráhy. Producenti butyrátu v tlustém střevě formují střevní mikrobiální společenstvo vylučováním různých antimikrobiálních látek, jako jsou například katelicidiny a reuterin. Udržují střevní homeostázu uvolňováním protizánětlivých molekul, jako jsou například imunoglobulin A a vitamin B (Singh et al. 2023).

Quorum sensing (QS) je mechanismus komunikace mezi buňkami, který zahrnuje produkci, detekci a reakci na extracelulární signální molekuly zvané autoinduktory. Autoinduktory se v prostředí hromadí s rostoucí hustotou bakteriální populace a bakterie detekují prahovou koncentraci těchto molekul, což vede ke změně genové exprese. QS se podílí na bioluminiscenci, sporulaci, kompetici, produkci antibiotik, tvorbě biofilmu a sekreci faktorů virulence (Rutherford & Bassler 2012). Mnoho patogenů, mezi které se řadí, *C. perfringens* a *Cl. difficile*, syntetizuje extracelulární signál označovaný jako LuxS nebo autoinduktor-2 (AI-2) (Ohtani et al. 2002; Lee & Song 2005).

3.3.1 *Clostridium perfringens*

C. perfringens je anaerobní, Gram-pozitivní, sporotvorná bakterie. Tento druh byl jako první spojen s průjmovým onemocněním v roce 1895, ale popsán byl až v roce 1943. Je hojně zastoupen v prostředí a často se vyskytuje ve střevě člověka a zvířat. Spory přežívají v půdě, sedimentech a oblastech vystavených lidskému či zvířecímu fekálnímu znečištění.

C. perfringens způsobuje dva velmi odlišné typy onemocnění způsobené produkcí jednoho nebo více toxinů. Tento mikroorganismus je schopný produkovat přes 13 různých toxinů, ale každý kmen pouze některé z nich. Existuje pět typů (A-E), které jsou děleny podle přítomnosti hlavního toxinu, které jsou letální. Typy A, C a D se řadí mezi lidské patogeny.

Akutní průjem způsobuje *C. perfringens* produkující α -toxin. Závažnější ale vzácnější onemocnění je způsobeno kontaminací jídla typem C. Charakteristické pro otravy *C. perfringens* je bolest břicha až křeče a akutní průjem, který se projeví 8-12 hodin po konzumaci kontaminované potraviny. Tyto příznaky většinou po 24 hodinách ustoupí, nicméně v některých případech mohou přetrvávat i jeden až dva týdny. Ve spojitosti s nákazou *C. perfringens* existují záznamy o smrti, což byl následek dehydratace a dalších komplikací s tím spojených. Ve většině případů otrav *C. perfringens* hraje roli teplota dosažená při přípravě pokrmu. Maso a výrobky z něj patří v tomto ohledu mezi nekomplikovanější. Malé množství spor je vždy přítomno po tepelném zpracování. Následně spory klíčí a násobí se riziko otravy, které vzniká při chlazení a skladování potraviny. Při procesu přípravy pokrmu dochází k odvedení kyslíku, a tím dojde k vytvoření anaerobních podmínek, které jsou příznivé pro další růst klostridií. Po požití kontaminované potraviny, která prošla žaludkem, jsou enterotoxiny produkované ve střevě. Klostridie jsou nucené tvořit spory, aby se ochránily před kyselým prostředím žaludku. Enterotoxiny jsou proteiny citlivé na teplo o velikosti 36000 Da (Forsythe 2010).

3.3.2 *Clostridiodes difficile*

Cl. difficile je grampozitivní anaerobní tyčinka, která tvoří spory a produkuje 2 enterotoxiny (toxin A a toxin B). Tato tyčinka je nejčastěji příčinou infekčních průjmů (McDonald et al. 2005). *Cl. difficile* je dnes považováno za jednu z nejvážnějších příčin infekcí ve spojitosti se zdravotní péčí. Od roku 2001 se prevalence a závažnost infekcí vyvolaných touto klostridií výrazně zvýšila, proto se jí dostává zvýšeného zájmu o výzkum, objevování nových faktorů virulence a vývoj nových léčebných a preventivních režimů (Rupnik et al. 2009). Největší riziko infekce *Cl. difficile* představuje předchozí léčba antibiotiky. Antibiotika způsobují náchylnost hostitele tím, že změní ekologii mikrobioty. Novorozenci a kojenci mohou být nositeli *Cl. difficile*. U 53 % zdravé dospělé populace lze nalézt *Cl. difficile* a můžeme ji tedy považovat za součást mikrobiomu člověka. Dormující endospory vznikají v reakci na stres (např. omezení živin). Pro *Cl. difficile* je tato forma nezbytná pro přenos z hostitele na hostitele, protože je obligátně anaerobní. U vnímavých hostitelů musí spory vyklíčit do aktivní formy, aby se dále mohly množit a v důsledku toho způsobit onemocnění. Jejich klíčení spouští určité žlučové kyseliny a aminokyseliny s klíčovými receptory (Aguiee & Sorg 2022).

3.3.3 *Clostridium butyricum*

Clostridium butyricum, anaerobní sporotvorná bakterie, je běžnou komenzální bakterií ve střevech lidí a zvířat a často se vyskytuje také v životním prostředí (Cassir et al. 2016). *C. butyricum* je grampozitivní bakterie. Jedná se o bakterii, která je zjištěna v 10-20 % střev dospělých lidí, ale též i u střev kojenců (Stoeva et al. 2021). Rozdělují se na toxigenní a netoxigenní kmeny např. (Pourshaban et al. 2002; Cassir et al. 2016). Toxigenní kmen *C. butyricum* tvoří botulotoxin typu E, který byl recentně zjištěn v Číně a Itálii a je tvořen v potravinách (Meng et al. 1997; Pourshaban et al. 2002). Netoxigenní kmeny *C. butyricum* se používají jako probiotické doplňky stravy, zejména v Asii (Kong et al. 2011; Stoeva et al.

2021). Řada studií potvrdila i několik pozitivních reakcí na onemocnění trávicího a vylučovacího traktu: gastrointestinálních infekcí, syndromu dráždivého tračníku, zánětlivých střevních onemocnění, kolorektálního karcinomu, metabolických poruch, roztroušené sklerózy, systémového lupus erythematoses, a neurodegenerativních onemocnění (Chen et al. 2019; Sun et al. 2021; Lee et al. 2022; Zhou et al. 2022). Obecná reakce *C. butyricum* ve střevech zvyšuje hladiny kyseliny máselné, propionové, octové a je sledována zlepšená funkce střev a zvýšená imunitní odpověď (Fu et al. 2021)

3.3.4 *Eubacterium hallii*

Eubacterium hallii je běžným členem střevní mikrobioty dospělých, který může z laktátu a acetátu produkovat butyrát a přeměňovat 1,2-propandiol na propionát. *E. hallii* je jeden z prvních producentů butyrátu ve střevě kojenců (Schwab et al. 2017). Avšak *E. hallii* není schopna využívat komplexní oligosacharidy a polysacharidy ze stravy (Scott et al. 2014), a proto je odkázána na počáteční degradaci substrátu (Schwab et al. 2017). Bunešová et al. (2018), zjistila, že interakce bifidobakterií a *E. hallii* vedou k tvorbě acetátu, butyrátu, propionátu a formiátu, což potenciálně přispívá k tvorbě SCFA ve střevě, které s sebou nesou potenciální výhody pro střevní mikrobiotu kojence.

3.3.5 Další klostridie navázané na mikrobiotu kojence

Clostridium botulinum produkuje botulotoxin, který se řadí mezi nejsilnější bakteriální toxin a pravděpodobně i nejsilnější známý jed (Chen et al. 2022). Kojenecký botulismus vzniká po požití spor *C. botulinum*, které následně kolonizují GIT hostitele a produkují toxin *in vivo*. Kojenecký botulismus postihuje jedince v rozmezí věku od dvou týdnů života do jednoho roku, avšak nejvíce těchto pacientů je ve věku více než 6 měsíců (Panditrao et al. 2020). Například v roce 2020 byl zachycen v Japonsku případ kojeneckého botulismu neznámého původu, který byl spojen s konzumací medu. Ze vzorku pacienta byl izolován kmen *C. botulinum* typu B (Umeda et al. 2022).

Nekrotizující enterokolitida (NEC) je nejničivější gastrointestinální příhoda u předčasně narozených novorozenců. Dlouhodobé poznatky ukázaly, že na druhy *Clostridium neonatale* a *C. perfringens* jako na potenciální biomarkery pro prediktivní časnou diagnostiku (Tarrachini et al. 2021).

3.4 Interakce laktobacilů s klostridii

Probiotické kmeny aktivují slizniční imunitu a stimulují produkci cytokinů, sekreci IgA, fagocytózu a produkci antimikrobiálních látek (např. organických kyselin, peroxidu vodíku a bakteriocinů), které jsou inhibiční vůči patogenům. Soupeří o živiny s patogenními bakteriemi a inhibují uchycení patogenu a působení jejich toxinů (Singhi & Kumar 2016).

Studie u hospitalizovaných pacientů v kombinaci s experimenty na myších zjistily, že laktobacily jsou klíčové, i když ne dostačující, pro omezení kolonizace střeva multirezistentními enterobakteriemi. *L. rhamnosus* zvyšuje hladinu Clostridiales, což vyvolává nepřátelské prostředí pro růst multirezistentních enterobakterií prostřednictvím zvýšené hladiny butyrátu a snížením dostupnosti zdrojů živin (Djukovic et al. 2022).

V pokusech na potkanech bylo dokázáno, že kombinace *L. reuteri* a *C. butyricum* potlačuje produkci urenických toxinů a zvyšuje produkci butyrátu. Kromě toho byl zaznamenán jejich renoprotektivní¹ účinek částečně zprostředkovaný vyšším protizánětlivým účinkem a udržením integrity střevní bariéry (Hsiao et al. 2021).

Ve studii Monteiro et al. (2019) se *L. plantarum* ATCC 8014 jeví jako neslibnější kmen, který inhibuje *Clostridium* spp. Tento kmen také splňoval kritéria, aby mohl být považován za probiotikum (díky jeho schopnosti koagregace, adhezivním vlastnostem, toleranci nepříznivého pH a solím žlučových kyselin). Tudíž by tento studovaný kmen mohl představovat probiotický potenciál pro tlumení infekcí vyvolaných klostridii. Nicméně je potřeba toto tvrzení podložit dalšími testy na zvířecích modelech *in vivo*.

¹ směřuje ke zpomalení nebo zábraně progresu chronických onemocnění ledvin až do ledvinné nedostatečnosti a selhání

4 Metodika

Experimentální část práce se zaměřuje na screening antimikrobiální interakce mezi laktobacily a vybranými zástupci třídy Clostridia. Vlastní testování bylo provedeno pomocí diskové difúzní metody, kde byly testovány samotné supernatanty vybraných laktobacilů a vybrané kyseliny (mléčná kyselina, octová kyselina, propionová kyselina a 3-hydroxypropionová kyselina), u kterých bylo předpokládáno, že stojí za antimikrobiální aktivitou probiotik a jsou navázány na jejich metabolismus. U supernatantů testovaných kmenů laktobacilů byla stanovena koncentrace laktátu a acetátu v supernatantu testovaných probiotik pomocí iontové chromatografie, aby zde mohla být hledána korelace s antimikrobiálními účinky výše popsaných metod. Další použitou metodou byl SPOT test pro testování antimikrobiální aktivity přímo narostlé kultury. Schopnost probiotik inhibovat růst s ním související produkci plynů klostridií byla hodnocena také na základě testu potlačení produkce plynů.

4.1 Materiály a metody

K testování byly použity bakteriální kmeny ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze, z Německé sbírky pro mikroorganismy a buněčné kultury (DSM), a z České sbírky mikroorganismů (CCM, Masarykova univerzita Brno). Byla testována antimikrobiální aktivita celkem 36 druhů laktobacilů (*L.*) s různým původem (dospělý člověk, kojeneček, vaginální probiotické tampony s probiotiky, probiotické doplňky) proti 16 klostridiím (*C.* – *Clostridium*, *Cl.* – *Clostridioides*), z nichž převážná většina byly izolovány ze stolice kojenců. Pro přehlednost výsledků byly přiděleny jednotlivé kódy laktobacilům a klostridiím. Také byly ve výsledcích použity zkratky jednotlivých druhů. Podrobný seznam testovaných kmenů a jejich původ je uveden v Tabulce 2 a Tabulce 3.

Tabulka 2: Testované klostridie.

druhová identita	kmen	kód	původ
<i>Clostridium butyricum</i> (CBUT)	A64	C1	kojenec
	CP_NII8	C2	kojenec
	CP_NII1	C3	kojenec
	DSM 10720	C4	střevo prasete (typový kmen)
<i>Clostridioides difficile</i> (CLDIF)	CP_NI30	C5	kojenec
	DSM 12056	C6	bachor jehněte
	CCM 3595	C7	neznámý (typový kmen)
<i>Clostridium neonatale</i> (CNEO)	L1	C8	kojenec
<i>Clostridium perfringens</i> (CPER)	C68	C9	kojenec
	Pb/40dM	C10	kojenec
	CP_NII4	C11	kojenec
	CP_NII7	C12	kojenec
	CCM 4435	C13	neznámý (typový kmen)
	A1/11778B	C14	mleté maso - hamburger
<i>Clostridium tertium</i> (CTER)	A33	C15	kojenec
	CP_NI27	C16	kojenec

Tabulka 3: Testované laktobacily

druhová identita	kmen	kód	původ
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	L1/4	L1	dospělý člověk
	L6/6	L2	dospělý člověk
	MB 2/10	L3	dospělý člověk
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	L2/4	L4	dospělý člověk
	3/8a LBC 11	L5	dospělý člověk
	B/1 gynocaps	L6	vaginální kapsle
	THT NUTRA BONA	L7	probiotický doplněk
	1/4 ellen tampony	L8	vaginální tampony s probiotiky
	ML 2	L9	dospělý člověk
	70/5b	L10	kojenec
J13	L11	kojenec	
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	ML 8/4	L12	dospělý člověk
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ML 7/8	L13	dospělý člověk
	L6/1	L14	dospělý člověk
	X1	L15	dospělý člověk
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NUTRA BONA	L16	probiotický doplněk
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	L6/11	L17	dospělý člověk
	L1/1	L18	dospělý člověk
	L9/12	L19	dospělý člověk
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ML 7/7	L20	dospělý člověk
	1/1 ellen tampony	L21	vaginální tampony s probiotiky
	J33	L22	kojenec
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	LBC 77/2A	L23	kojenec
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	NUTRA BONA	L24	probiotický doplněk
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	ML7/6	L25	dospělý člověk
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	L6/3	L26	dospělý člověk
	L6/4	L27	dospělý člověk
	2/1 ellen tampony	L28	vaginální tampony s probiotiky
	L943/a	L29	dospělý člověk
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	3/10a WSP 17	L30	kojenec
	1/6b LBC 6	L31	kojenec
	DSM 20016	L32	dospělý člověk - střevo (typový kmen)
	LBC 78/2A	L33	kojenec
	J37	L34	kojenec
<i>Limosilactobacillus vaginalis</i>	L4/3b	L35	dospělý člověk
<i>Lactobacillus faecium</i>	ML 6/5	L36	dospělý člověk

4.1.1 Příprava bakteriálních kultur k testování

Den před samotným testováním byly kultury laktobacilů a klostridií přeočkovány do modifikovaného Wilkins-Chalgrenova bujónu, který byl připraven dle Tabulky 4 v uzavřené anaerobně připravené zkumavce. Inokulované zkumavky byly uchovány v inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Následující den byla zkontrolována čistota narostlé kultury ve světelném fázovém mikroskopu při zvětšení 400×. Sterilní injekční stříkačkou byla přenesena kapka kultury na podložní sklíčko, které bylo překryto krycím sklíčkem a poté mohlo být vloženo do mikroskopu. Po kontrole byla kultura připravena k testování.

Tabulka 4: Ingredience potřebné pro modifikovaný Wilkins-chalgren bujón.

Modifikovaný Wilkins-chalgren bujón					
složka	Wilkins-Chalgren bujón	sójový pepton	cystein	tween	destilovaná voda
množství	33 g	5 g	0,5 g	1 ml	1000 ml

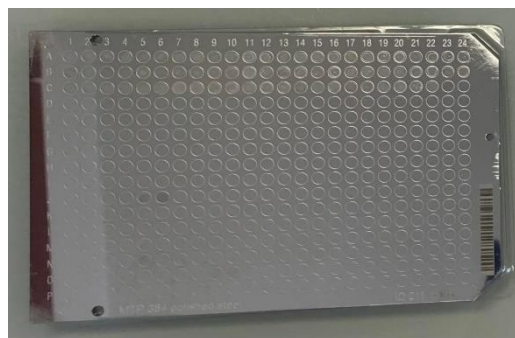
4.1.1.1 Měření pH

Z čerstvě narostlé kultury byl odebrán 1 ml do zkumavky Eppendorf. Do každé zkumavky byl pomořen indikační papírek pro měření pH. Tyto papírky obsahují indikátorovou látku, která změnila barvu v závislosti na pH dané kultury. Poté byl papírek porovnán s barevnou škálou uvedenou na obalu podle které bylo určeno pH.

4.1.2 Ověření identity testovaných kultur pomocí MALDI TOF MS

MALDI TOF MS je hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpceí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem. Použitím MALDI TOF MS jsou získána hmotnostní spektra částí látek, která jsou obsažena v buňce. Dochází k identifikaci ribosomálních bílkovin, které jsou rozdílné na úrovni rodu či druhu.

Příprava vzorku k analýze vyžaduje čerstvě narostlý kmen. Pracovní postup je následující. Do zkumavky Eppendorf byl injekční stříkačkou přenesen 1 ml narostlé kultury. Zkumavky byly centrifugovány při maximálních otáčkách (14500 rpm) po dobu 2 min. Poté byl vyjmut supernatant a přidáno pipetou 500 µl 70% ethanolu. Znovu při stejných otáčkách a stejném čase se odstředí tekutina v centrifuze. Tekutina nad peletou byla dokonale odpipetovaná. Otevřené zkumavky byly nechány 10 min stát, aby došlo k vytěkání zbytku ethanolu. Po uplynulé době bylo přidáno 15 µl 70% kyseliny mravenčí (Sigma Aldrich) a 15 µl 100% acetonitrilu (Sigma Aldrich). Následovalo důkladné promíchání za použití vortexu. Opět zkumavky byly stočeny v centrifuze při maximálních otáčkách (1450 rpm) po dobu 2 min. 1 µl připraveného supernatantu byl



Obrázek 4: MALDI destička.

pipetováno na MALDI destičku (Bruker Daltonik GmbH, Německo) a nechal se zaschnout (viz Obrázek 4). Uschlý supernatant byl překryt 1 μ l roztoku MALDI matrice (Bruker Daltonik GmbH, Německo), tato vrstva se také nechala uschnout. Připravená destička byla vložena do přístroje MALDI TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Německo) a proběhla analýza.

4.1.3 Příprava a složení kultivačních médií pro testování

Bylo připraveno celkem 5 médií dle pokynů výrobce (Oxoid, Česká republika), případně byla obohacena o některé další ingredience, které jsou uvedeny níže. Pro agar SPOT test bylo potřeba připravit WSP médium (Wilkins-Chalgren anaerobe agar doplněný o sojový pepton, cystein a tween, Oxoid) a ABA médium (Anaerobe basal broth, Oxoid), do kterého byl přidán technický agar (Oxoid), abychom získaly tuhé médium. Pro diskovou difúzní metodu byl použito ABA tuhé médium. K testování produkce plynů byl připraven CdA (*Clostridium difficile* agar base, Oxoid), MRS (De man, rogosa, sharpe, Oxoid) a M17 (Oxoid) pro kontrolu. Na analytických váhách bylo přesně naváženo příslušné množství práškové formy média, které bylo smícháno s přesným množstvím destilované vody, popřípadě doplněno o další uvedené komponenty. Přehled jednotlivých médií je uveden v Tabulce 5. Po promíchání obsahu v uzavřené Erlmeyerové baňce následovala sterilace v tlakovém hrnci po dobu 60 min. Po uplynulé době byla média přemístěna do vodní lázně, kde je udržovaná teplota 50 °C. Vytemperovaná media byla připravena k testování.

Tabulka 5: Přehled jednotlivých médií na 1000 ml.

Modifikovaný Wilkins-chalgren agar (WSP)					
složka	Wilkins-Chalgren	sójový pepton	cystein	tween	destilovaná voda
množství	43 g	5 g	0,5 g	1 ml	1000 ml

Anaerobní bazální bujón s technickým agarem (ABA)			
složka	Anaerobní bazální bujón	technický agar	destilovaná voda
množství	35,4 g	10 g	1000 ml

Základní <i>Clostridium difficile</i> agar (CdA)		
složka	<i>Clostridium difficile</i> agar	destilovaná voda
množství	69 g	1000 ml

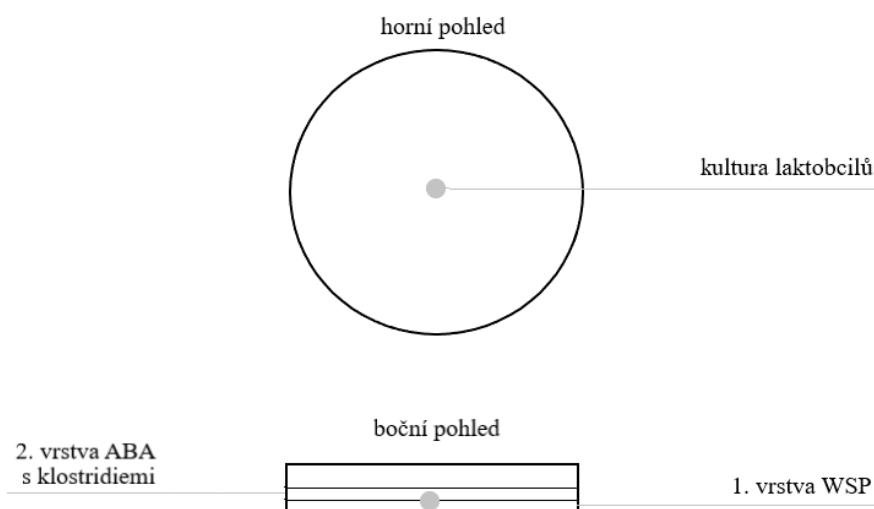
De man, rogosa, sharpe (MRS)		
složka	MRS	destilovaná voda
množství	66,7 g	1000 ml

M17		
složka	M17	destilovaná voda
množství	50,8 g	1000 ml

4.1.4 Spotová metoda (Agar SPOT test)

Spotová metoda (Agar Spot Test) byla provedena na základě Monteiro et. al. (2019) s menšími modifikacemi. Pro danou metodu se nám nepodařilo najít vhodné označení v českém jazyce, tudíž používáme „spotová metoda“.

Před začátkem testu byly připraveny malé Petriho misky. Každá Petriho miska byla nadepsána zvolenými čísly pro testovaná probiotika a patogeny. U zapáleného kahanu bylo asepticky nanášeno do Petriho misky 5 ml WSP agaru. Tato vrstva média byla nechána při pokojové teplotě, aby ztuhla. Poté byl do středu misky aplikován pipetou 1 μ l čerstvě narostlé zkontrolované kultury příslušného laktobacilu. Takto připravená miska byla kultivována při 37 °C po dobu 48 hodin v anaerobních podmínkách, kterých bylo dosaženo pomocí anaerobního vyvíječe (AnaeroGen, Oxoid). Po 48 hodinách bylo smícháno ABA médium s kulturou patogenu v poměru 5 ml agaru: 20 μ l kultury patogenů. Médium bylo zhomogenizováno a „5 ml“ připraveného média bylo přeneseno na první vrstvu WSP agaru s narostlými probiotiky viz Obrázek 5. Následovala kultivace v anaerobních podmínkách, které byly zajištěny použitím anaerobního vyvíječe (AnaeroGen, Oxoid), při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynulé době proběhlo vyhodnocení, zda vznikly inhibiční zóny či nikoliv.

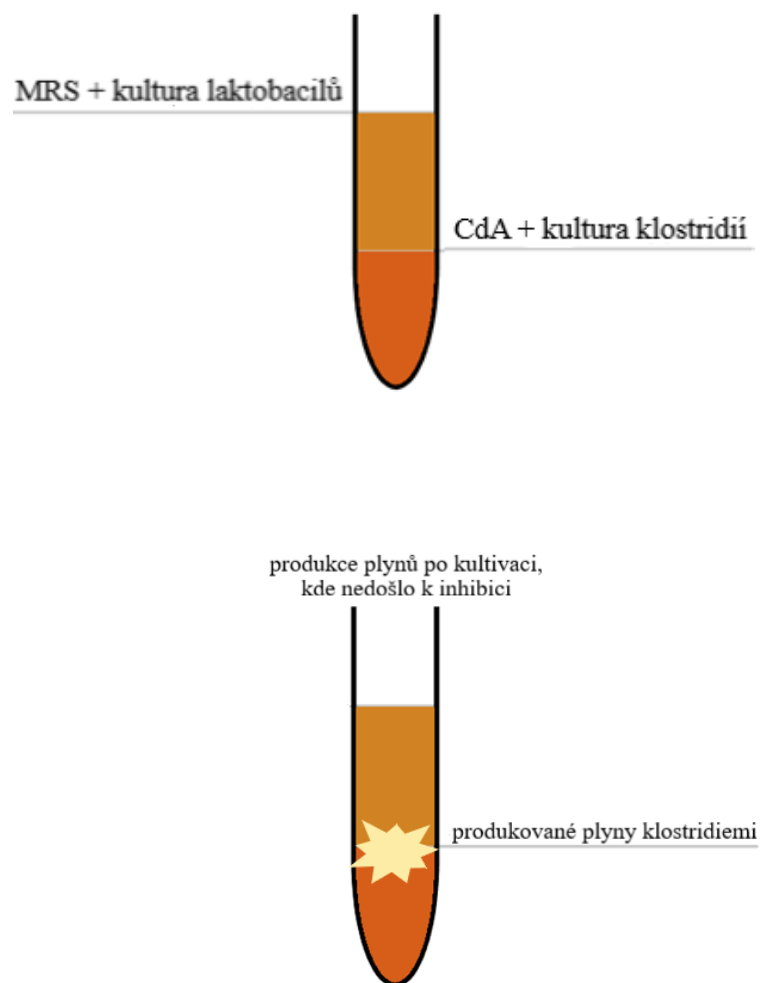


Obrázek 5: Spotová metoda - znázornění Petriho misky.

4.1.5 Test produkce plynů

Uvedená metodika je podle Monteiro et al. (2019) opět upraveno v podmínky testování zavedené na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky.

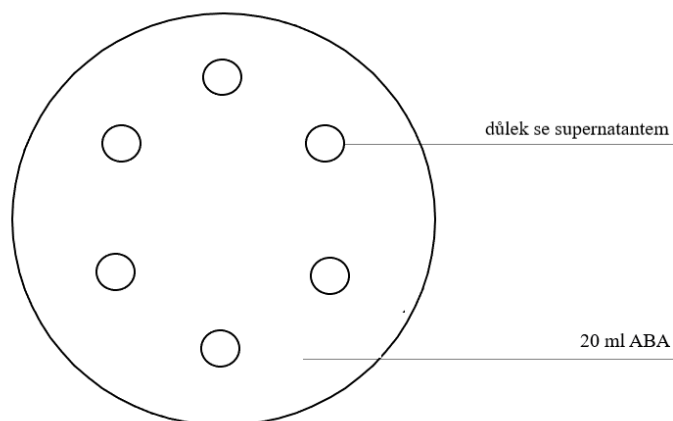
Do připravených sterilních plastových zkumavek o objemu 10 ml bylo přeneseno sterilní jednorázovou pipetou 3 ml CdA média. Na tuto vrstvu média bylo napipetováno 600 μ l narostlé kultury potenciálního patogenu. Po ztuhnutí při pokojové teplotě bylo přidáno 3 ml MRS a 120 μ l kultury konkrétních laktobacilů „probiotik“, druhá vrstva byla na rozdíl od první promíchána (viz Obrázek 6). Jako negativní kontrola by použit kmen *Staphylococcus thermophilus*, pro který bylo použito médium M17a byl testován se všemi klostrdiemi. Každý patogen byl testován se všemi laktobacily. Následovala kultivace za anaerobních podmínek při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynulé době proběhlo vyhodnocení.



Obrázek 6: Znázornění zkumavky s agarem při testu produkce plynu.

4.1.6 Disková difúzní metoda

Prvním krokem diskové difúzní metody bylo připravit si velké Petriho misky, které byly označeny příslušnými čísly laktobacilů a klostridií. Na jedné destičce bylo možné otestovat až 6 laktobaciálních supernatantů (viz Obrázek 7). Do Petriho misky bylo přeneseno sterilní stříkačkou 1 ml kultury testovaného patogenu, která byla překryta 20 ml ABA média (pomocí sterilního dávkovače). Petriho miskou bylo



Obrázek 7: Znárodnění Petriho misky pro difúzní metodu.

krouženo třikrát doprava a třikrát doleva, aby došlo k promíchání média s patogeny. Poté se médium nechalo ztuhnout při pokojové teplotě. Do tuhého média byly udělány důlky korkovrtem, který byl namočen do 70% ethanolu a vložen plamenu, abychom dosáhli sterilace. Z důlků byl vyjmut agar sterilní jehlou. Do takto připravených důlků bylo nanášeno 50 μ l supernatantu příslušných supernatantů laktobacilů. Supernatant byl získán z 1 ml probiotické kultury přenesené sterilní stříkačkou do zkumavky Eppendorf, která byla vložena do centrifugy při nejvyšším zrychlení (14500 rpm) na dobu 2 min, kdy dojde tak k oddělení tekutiny (supernatantu), která obsahuje metabolity bakterií, od pelety mikroorganismů. Takto připravené vzorky byly kultivovány v anaerobních podmínkách pomocí vyvíječe anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid) po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po této době byly měřeny inhibiční zóny.

4.1.6.1 Disková difúzní metoda pro kyseliny

Postup byl stejný, jak je popsáno výše s rozdílem toho, že místo supernatantu bylo pipetováno do důlků 50 μ l naředěné kyseliny o různých koncentracích. Byla testována mléčná kyselina (5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%), octová kyselina (5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%), propionová kyselina (5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,44%, 0,2%, 0,1%) a 3-hydroxy propionová kyselina (5%, 2,5%, 1%, 0,5%, 0,1%).

4.1.7 Stanovení metabolitů v supernatantu laktobacilů pomocí iontové chromatografie

Iontová chromatografie je metoda kapalinové chromatografie, kde stacionární fáze je měnič iontů. Každá funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Ten je vyměňován iontem obsaženém v mobilní fázi.

Stejně supernatanty jako byly testovány v diskové difúzní metody byly uchovány ve sterilních zkumavkách Eppendorf v mrazáku pro pozdější analýzu jejich složení pomocí iontové chromatografie.

Postup pro přípravy analyzované vzorku je následující. Nejprve byly vzorky ponechány při pokojové teplotě roztát. Tekuté vzorky byly zvortexovány a mohlo z nich být odebráno 200 μ l do sterilní zkumavky Eppendorf, která byla centrifugována po dobu 5 min při zrychlení 14500 rpm. Do speciální plastové vialky s uzávěrem (viz Obrázek 8) bylo napipetováno 990 μ l destilované vody a 10 μ l připraveného supernatantu. Připravené vzorky mohly být analyzovány podle metodiky uvedené Liang et al. (2021) na Katedře pedologie a ochrany půd (FAPPZ, ČZU) RNDr. Václavem Tejneckým, Ph.D. Ředění vzorku bylo poté zohledněno při zpracování naměřených dat.



Obrázek 8: Vialka použitá pro iontovou chromatografii.

Pro porovnání rozdílů mezi skupinami homofermentativních a heterofermentativních kmenů, byla použita neparametrická analýza variace Kruskal-Wallis test. Ověřená byla normalita dat pomocí Shapiro-Wilks testu a homogenita variace Bartlett test podle Lepš a Šmilauer (2016). Analýzy a grafy byly vytvořeny v programu Statistika 13.

5 Výsledky

Celkem bylo testováno 36 kmenů laktobacilů, jednalo se jak o lidské izoláty s potenciálem probiotika, tak o probiotické kmeny se statutem probiotika izolované z doplňků stravy a dalších produktů. Tyto laktobacily byly testovány proti 16 kmenům endospory tvořícím klostridiím, kdy některé mohou působit jako patogenní. K testování byly využity tři různé metody s cílem charakterizovat a najít druhy či kmeny laktobacilů, popřípadě látky s antimikrobiálním účinkem proti klostridiím, které mohou působit jako patogeny ve střevní mikrobiotě kojence.

5.1 Výsledky testování spotovou metodou

Antimikrobiální účinky přímo narostlé kultury laktobacilů, byla stanovena pomocí spotové metody. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 6. Kmeny *C. tertium* byly inhibovány nejvíce, kdy 50 % z testovaných laktobacilů působilo inhibičně, podobně tomu bylo u *Cl. difficile*, které dokázalo inhibovat až 47 % testovaných kmenů laktobacilů. Nižší účinnost vykazovaly laktobacily vůči *C. neonatale*, které bylo inhibováno maximálně z 19 %. Nejnižší účinnost byla zaznamenána u *C. butyricum*, u kterého docházelo k inhibici velmi málo, konkrétně pouze z 1 %. Tímto experimentem bylo zjištěno, že tato metoda vykazuje velmi mnoho pozitivních výsledků s žádným společným trendem. Nelze poukázat na druhově či kmenově specifické interakce mezi testovanými laktobacily a klostridiemi. Navíc se výsledky této metody špatně odečítají a interpretují. Tudíž byla použita jen u některých z testovaných klostridií.



Obrázek 9: Příklad inhibice klostridií u spotové metody. *Cl. difficile* CP_NI30 a *L. delbruckii* L9/12

Tabulka 6: Výsledky spotové metody.

druhová identita	kód	CBUT			CLDIF	CNEO	CPER				CTER	
		C1	C2	C3	C5	C8	C9	C10	C11	C12	C15	C16
<i>L. paracasei</i>	L1	-	+	*	+	-	-	-	-	-	-	-
	L2	+	-	*	-	-	-	-	-	-	-	+
	L3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. rhamnosus</i>	L4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	L5	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
	L6	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
	L7	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
	L8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L9	-	-	*	+	-	-	-	-	-	-	-
	L10	-	-	*	+	+	-	+	-	-	-	+
	L11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. paraplantarum</i>	L12	-	-	*	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	L13	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-
	L14	-	-	*	+	+	-	-	-	-	+	-
	L15	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>L. acidophilus</i>	L16	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>L. delbrueckii</i>	L17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	L18	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	L19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i>	L20	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
	L21	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	L22	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>L. ultunensis</i>	L23	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>L. casei</i>	L24	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>L. salivarius</i>	L25	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. fermentum</i>	L26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	L29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. reuteri</i>	L30	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	L31	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	L32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	L33	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	L34	*	*	*	-	*	*	-	-	-	*	+
<i>L. vaginalis</i>	L35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. faecium</i>	L36	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Vysvětlivky:

- nedošlo k inhibici

+ inhibice

* nenarostla kultura

CBUT = *C. butyricum*

CNEO = *C. neonatale*

CPER = *C. perfringens*

CTER = *C. tertium*

5.2 Test produkce plynů

Schopnost laktobacilů inhibovat růst kmenů klostridií byla rovněž hodnocena na základě inhibice produkce plynu produkovaného metabolismem klostridií. Tento test vykazoval převážně negativní výsledky viz Tabulka 7, či dokonce klostridie vůbec nenarostly, protože bylo velmi obtížné zajistit správné podmínky při práci. Přesto byla pozorována inhibice plynu u *C. tertium* A33 pěti různými zástupci homofermentativních kmenů laktobacilů a u dalších osmnácti laktobacilů byla alespoň částečná inhibice plynu. Částečná inhibice plynu byla u *C. perfringens* C68, kterou způsobily čtyři kmeny laktobacilů, mezi které patří *L. rhamnosus* 70/5b, kmeny *L. gasseri* ML7/7 a 1/1 ellen tampony a *L. ultunensis* LBC 77/2A. Kmen *C. neonatale* L1 dokázal inhibovat *L. paracasei* MB 2/10 a částečně inhibovat *L. paracasei* L6/6. *C. butyricum* bylo částečně inhibováno pouhým jedním kmenem *L. salivarius* ML 7/6. Z výsledků lze usuzovat na možné interakce v redukci plynů mezi testovanými laktobacily a klostridiami. Pro validní interpretaci dat by bylo potřeba udělat více nezávislých opakování.

Tabulka 7: Výsledky testu produkce plynů.

		<i>CBUT</i>	<i>CNEO</i>	<i>CPER</i>	<i>CTER</i>
druhá identita	kód	C1	C8	C9	C15
<i>L. paracasei</i>	L1	-	-	-	+
	L2	-	+ ^a	-	+ ^a
	L3	-	+	-	+ ^a
<i>L. rhamnosus</i>	L4	-	-	-	+ ^a
	L5	-	-	-	+
	L6	-	-	-	-
	L7	-	-	-	-
	L8	-	-	-	+ ^a
	L9	-	-	-	+ ^a
	L10	-	-	+ ^a	-
L11	-	-	-	+ ^a	
<i>L. paraplantarum</i>	L12	-	-	-	+ ^a
<i>L. plantarum</i>	L13	-	-	-	-
	L14	-	-	-	+ ^a
	L15	-	*	*	+
<i>L. acidophilus</i>	L16	-	*	*	-
<i>L. delbrueckii</i>	L17	-	-	-	-
	L18	-	*	*	+
	L19	-	*	-	+ ^a
<i>L. gasseri</i>	L20	-	*	+ ^a	+ ^a
	L21	-	*	+ ^a	+ ^a
	L22	-	*	-	+ ^a
<i>L. ultunensis</i>	L23	-	*	+ ^a	+ ^a
<i>L. casei</i>	L24	-	*	-	+ ^a
<i>L. salivarius</i>	L25	+ ^a	-	-	+
<i>L. fermentum</i>	L26	-	-	-	+ ^a
	L27	-	-	-	-
	L28	-	*	-	-
	L29	-	*	-	+ ^a
<i>L. reuteri</i>	L30	-	*	-	+ ^a
	L31	-	*	-	-
	L32	-	*	-	+ ^a
	L33	-	*	-	-
	L34	-	*	-	-
<i>L. vaginalis</i>	L35	-	*	-	-
<i>L. faecium</i>	L36	-	*	-	-

Vysvětlivky:

- + došlo k inhibici
- nedošlo k inhibici
- +^a částečná inhibice
- * nenarostla kultura

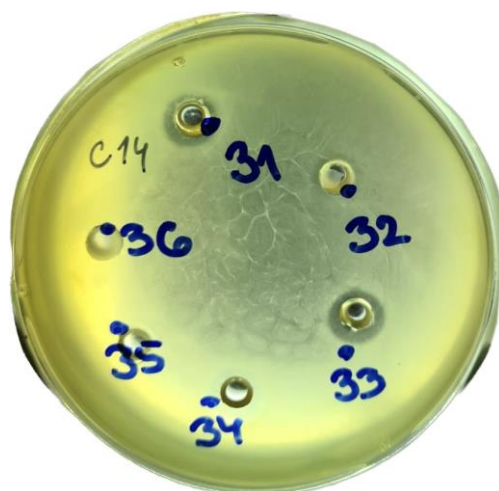
- CBUT* = *C. butyricum*
- CNEO* = *C. neonatale*
- CPER* = *C. perfringens*
- CTER* = *C. tertiu*

5.3 Difúzní metoda

Antimikrobiální aktivita látek produkovaných laktobacily byla testována především pomocí difúzní metody. Kompletní výsledky se nachází v Tabulce 8. V tomto experimentu byla zaznamenána antimikrobiální aktivita u menšího množství testovaných kmenů laktobacilů. Byl zaznamenáván průměr inhibičních zón a hodnota tedy zahrnuje i průměr důlku, který je 6 mm.

Z výsledků vyplývá, že existuje druhová i kmenová variabilita klostridií v citlivosti vůči laktobacilům. *C. tertium* nedokázal potlačit žádný z laktobacilů. U *C. perfringens* byla pozorována pouze malá inhibice některými z laktobacilů. *C. neonatale* a *C. butyricum* dokázalo inhibovat pouze málo laktobacilů, z nichž nejlépe působil druh *L. reuteri*. Největší potenciál všech testovaných rodů laktobacilů inhibovat růst byl zjištěn proti rodu *Cl. difficile*, který byl inhibován homofermentativními i heterofermentativními laktobacily. Na základě tohoto poznatku byly přidány další dostupné kmeny *Cl. difficile* pro potvrzení účinku. Konkrétně byly testovány tři kmeny: *Cl. difficile* CP_NI30, *Cl. difficile* 1205 a *Cl. difficile* CCM 3595. Největší inhibiční schopnost vykazovaly heterofermentativní kmeny, především druh *L. reuteri*. Konkrétně *L. reuteri* LBC 78/2A potlačil růst *Cl. difficile* CP_NI30 s inhibiční zónou 15 mm, což je vidět na Obrázku 10. Celkově bylo nejvíce pozitivních výsledků inhibice růstu klostridií při difúzní metodě zaznamenáno u kmenů *L. reuteri*, ale je třeba podotknout, že rozmezí velikosti zón bylo 7-15 mm, což ukazuje, že je zde kmenová variabilita. Dokonce *L. reuteri* 3/10A WSP 17 nedokázal inhibovat růst *Cl. difficile* 1205 vůbec, nebyla naměřena žádná inhibiční zóna.

Z výše popsanych výsledků vyplývá, že největší antimikrobiální potenciál má pravděpodobně druh *L. reuteri*, protože dokáže inhibovat nejvíce klostridií v porovnání s ostatními testovanými laktobacily. Také byly zaznamenány největší inhibiční zóny. Především kmeny *L. reuteri* 1/6b LBC 6, LBC 8/2A a J37, které spojuje stejný původ (kojenec). Což poukazuje na kmenovou variabilitu, protože například sbírkový typový kmen *L. reuteri* DSM 20016 izolovaný ze střeva člověka, tvořil oproti ostatním kmenům *L. reuteri* pouze malé inhibiční zóny v rozmezí 7-8 mm nebo růst klostridií nepotlačil vůbec. Spolu s ním horší výsledky vykazoval i *L. reuteri* 3/10a WSP 17, který je původem z kojenice.



Obrázek 10: Petriho miska, kde je narostlá *Cl. difficile* CP_NI30. Číslo 33 představuje *L. reuteri* LBC 78/2A.

Tabulka 8: Výsledky difúzní metody (velikosti tedy průměry inhibičních zón v mm), pH použitých supernatantů.

druhá identita	kód	CBUT				CLDIF			CNEO	CPER						CTER		pH
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	
<i>L. paracasei</i>	L1	6	6	6	6	7	8	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,7
	L2	6	6	6	6	7	7	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,4
	L3	6	6	6	6	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,7
<i>L. rhamnosus</i>	L4	6	6	6	6	7	7	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,4
	L5	6	6	6	6	7	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,7
	L6	6	6	6	6	7	7	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,4
	L7	6	7	6	6	8	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,1
	L8	7	7	6	6	8	6	7	8	6	6	6	6	6	6	6	6	5
	L9	6	7	6	6	7	6	8	6	6	6	6	6	7	6	6	6	4,4
	L10	6	6	6	6	7	6	7	6	6	6	6	6	7	6	6	6	4,4
	L11	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6	7	6	6	6	5,3
	<i>L. paraplantarum</i>	L12	6	6	6	6	7	6	7	6	6	6	6	7	7	6	6	4,4
<i>L. plantarum</i>	L13	6	6	6	6	6	8	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
	L14	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,4
	L15	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6	7	6	6	6	5,6
<i>L. acidophilus</i>	L16	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,1
<i>L. delbrueckii</i>	L17	6	6	6	6	6	7	7	6	6	6	6	6	7	6	6	6	5,3
	L18	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,4
	L19	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
<i>L. gasseri</i>	L20	6	6	6	6	8	6	8	6	6	6	6	6	7	6	6	6	4,4
	L21	6	6	6	6	8	6	7	6	6	6	6	6	7	6	6	6	4,4
	L22	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4,4
<i>L. ultunensis</i>	L23	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8	6	6	6	4,4
<i>L. casei</i>	L24	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	4,4
<i>L. salivarius</i>	L25	6	6	6	6	10	6	8	8	6	6	6	6	7	6	6	6	4,1
<i>L. fermentum</i>	L26	6	6	6	6	7	6	8	6	6	6	6	6	7	6	6	6	4,7
	L27	6	6	6	6	10	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
	L28	6	6	6	6	10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
	L29	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
<i>L. reuteri</i>	L30	6	6	6	6	11	6	7	6	6	6	6	6	7	7	6	6	5
	L31	10	10	12	6	13	12	10	8	6	6	6	6	10	6	6	6	4,7
	L32	6	7	6	6	8	7	7	7	6	6	6	6	6	7	6	6	4,7
	L33	13	9	13	7	15	10	10	12	6	6	6	6	7	7	6	6	4,7
	L34	11	8	12	6	12	10	10	9	6	6	6	6	7	6	6	6	4,7
<i>L. vaginalis</i>	L35	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5,3
<i>L. faecium</i>	L36	6	6	6	6	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5

Vysvětlivky: CBUT = *C. butyricum*, CLDIF = *Cl. difficile*, CNEO = *C. neonatale*,
CPER = *C. perfringens*, CTER = *C. tertium*

5.3.1 Působení kyselin v diskové difúzní metodě

Disková difúzní metoda byla také použita pro testování kyselin, u který se předpokládá, že se významně podílí neodpovídají za antimikrobiální aktivitě laktobacilů. Bylo zjištěno, že nejvyšší účinnost vykazuje octová kyselina viz Tabulka 9. Ta dokázala inhibovat růst *C. butyricum* A64 i při koncentraci 0,2 %. Ve většině případů dokázala klostridie inhibovat při koncentraci 0,5 %. Největší inhibiční zóny vykazovala v koncentraci 5 % proti *C. tertium* A33 (26 mm) a *C. tertium* CP_NI27 (24 mm). V porovnání s ostatními byla menší účinnost octové kyseliny vůči *C. perfringens*, kde inhibiční zóny nebyly větší než 14 mm při koncentraci 5 %.

Mléčná kyselina dokázala velmi dobře inhibovat růst všech klostridií při koncentraci 5 % a 2 %. Tak při koncentraci 1 % dokázala inhibovat jen *C. butyricum*, *Cl. difficile*, *C. neonatale* a *C. tertium* s inhibičními zónami 18 – 7 mm. Avšak *C. perfringens* inhibovala pouze částečně. Mléčná kyselina v koncentraci 0,5% dokázala inhibovat 3 kmeny a to *C. butyricum* CP_NI18, *C. butyricum* CP_NI11 a *C. perfringens* CMM 4435.

3-hydroxypropionová kyselina o koncentraci 5 % inhibovala všechny klostridie s inhibičními zónami v rozmezí 8-12 mm, kromě *C. butyricum* CP_NI18. Inhibiční schopnost se ztrácela při koncentraci 2,5 % a inhibovala pouze polovinu klostridií. U nižších koncentrací nebyl pozorován žádný účinek.

Propionová kyselina (použito jako kontrola k 3-HP) inhibovala všechny testované klostridie při koncentraci 5 % a to inhibičními zónami 11 – 23 mm. Inhibiční účinek na spodní hranici, a to 11 – 13 mm, byl inhibován kmen *C. perfringens*. Největší inhibiční zóna vznikla proti *C. tertium* A33 (23 mm). Při koncentraci 2 % nebyly potlačen růst všech klostridií. Přesto koncentrace 0,5 % inhibovala růst *C. tertium*.

Tabulka 9: Naměřené inhibiční zóny (mm) použitých kyselin při difúzní metodě.

		%	c (mM)	CBUT				CLDIF			CNEO	CPER						CTER	
				C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16
3-HP	5,00	300	11	6	11	11	11	10	9	11	9	8	10	9	9	9	12	11	
	2,50	150	6	6	9	8	10	6	9	6	7	6	8	7	6	6	6	7	
	1,00	60	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	0,50	30	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	0,10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
propionová kyselina	5,00	670	15	14	16	17	20	12	19	17	11	12	13	12	12	12	23	20	
	2,00	268	11	10	11	10	15	9	13	11	10	9	10	8	6	7	12	12	
	1,00	134	10	8	9	7	10	7	10	9	8	7	8	7	6	6	9	8	
	0,50	67	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	
	0,44	60	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	
	0,20	26,8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	0,10	13,4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
mléčná kyselina	5,00	670	30	15	18	17	17	15	16	23	17	17	13	16	13	15	21	21	
	2,00	268	21	11	12	12	13	10	10	15	13	11	10	13	10	11	15	13	
	1,00	134	18	9	9	9	11	7	9	10	10	6	9	6	7	6	7	8	
	0,50	67	6	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	
	0,20	26,8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	0,10	13,4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
octová kyselina	5,00	873,4	21	16	19	18	20	15	20	18	14	14	14	13	14	12	26	24	
	2,00	339,4	18	11	12	12	16	11	14	12	9	10	11	8	8	8	16	15	
	1,00	174,7	9	9	10	10	12	8	12	8	8	6	9	7	6	6	9	10	
	0,50	87,3	15	7	8	6	10	6	7	7	6	6	7	6	6	6	8	7	
	0,20	34,9	10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	0,10	17,5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

Vysvětlivky:

3-HP = 3-hydroxypropionová kyselina

c = molární koncentrace použitých kyselin v mM

% = procentuální koncentrace použitých kyselin

CBUT = *C. butyricum*

CLDIF = *Cl. difficile*

CNEO = *C. neonatale*

CPER = *C. perfringens*

CTER = *C. tertium*

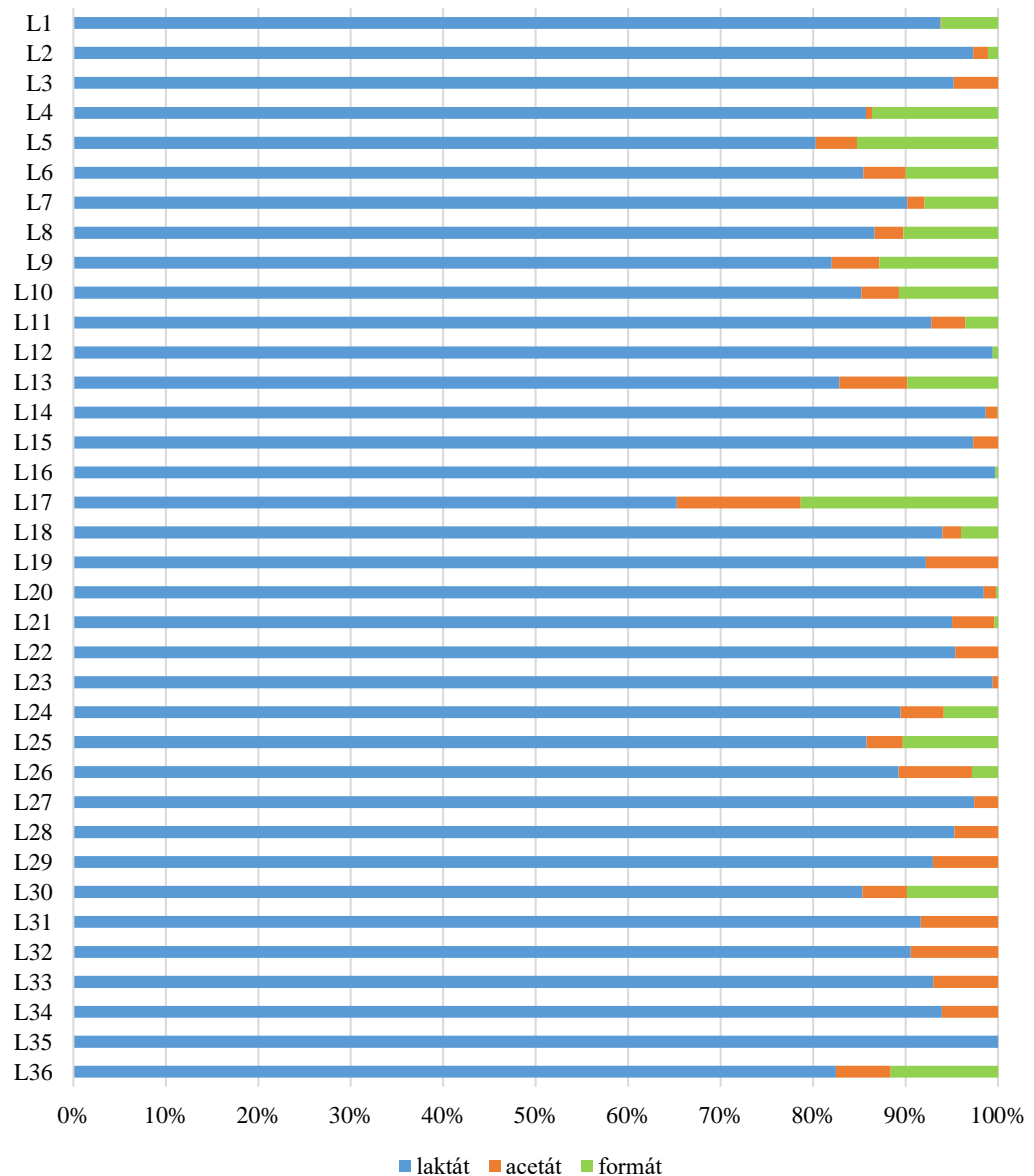
5.4 Porovnání spotové metody a difúzní metody

Při porovnání spotové a difúzní metody můžeme vidět, že jsou výsledky naprosto rozdílné. Porovnání těchto metod se nachází v příloze III. Pouze u *Cl. difficile* CP_NI30, která pochází z kojence, lze pozorovat shodu pozitivních záznamů spotové metody a alespoň malé inhibiční zóny u diskové difúzní metody u homofermentativních kmenů laktobacilů, což by mohlo značit, že za antimikrobiální aktivitu je odpovědná především mléčná kyselina. Dále byla pozorována antimikrobiální aktivita laktobacilů proti klostridiím u spotové metody, které nebyly inhibovány při diskové difúzní metodě, což vidíme na příkladu *C. tertium*. Na základě čehož lze předpokládat, že za antimikrobiální aktivitu můžou jiné mechanismy než metabolity laktobacilů jako například produkce exopolysacharidů a jiné. Celkově lze říci, že skupina homofermentativních laktobacilů fungovala lépe při spotové metodě, kde byla testována přímo čerstvě narostlá kultura.

5.5 Stanovení metabolitů v supernatantu laktobacilů

Pomocí iontové chromatografie byla stanovena koncentrace laktátu, acetátu a formátu v supernatantu testovaných laktobacilů. Výsledky byly přepočítány na mM koncentrace a koncentrace stanovených kyselin jsou uvedeny v příloze I. Obrázek 11 znázorňuje zastoupení laktátu, acetátu a formátu. Pro porovnání byly přepočítané hodnoty vztaženy ke 100 % a koncentrace je uvedena poměrově. Ani zde nelze jasně stanovit, zda detekované zastoupení či naměřené množství má vztah k detekovaným výsledkům antimikrobiálního působení. Koncentrace laktátu mezi skupinami homofermentativní a heterofermentativní nevykazuje žádný statisticky významný rozdíl, na rozdíl od formátu. Na hranici významnosti se pohyboval acetát (viz příloha II).

Zastoupení laktátu, acetátu a formátu v supernatantu laktobacilů



Obrázek 11: Zastoupení laktátu, acetátu a formátu v %.

6 Diskuze

Laktobacily se řadí mezi bakterie mléčného kvašení (BMK). Název BMK pramení z jejich schopnosti přeměňovat sacharidy na mléčnou kyselinu. Vzhledem k tomu, že mezi jejich hlavní metabolity patří kyseliny, jsou acidotolerantní a dokáží tak růst při velmi nízkých hodnotách pH (Forsythe 2010). Patří mezi první bakterie kolonizující lidské tělo (Rautava et al. 2012). Laktobacily jsou spojovány se zdravě fungujícím střevem, a proto se tato skupina běžně používá jako probiotika (Aakko et al. 2015). Jsou součástí široké škály potravin (zelenina, víno, mléko, maso) a také se využívají pro výrobu mnoha potravin (Forsythe 2010). Kdežto klostridie zahrnují významné lidské a zvířecí patogeny, které způsobují potenciálně smrtelná onemocnění. Patogenní klostridie produkují největší počet život ohrožujících toxinů ze všech rodů (Cruz-Moreles et al. 2019). Nicméně klostridie jsou běžnými komenzály lidského střeva (Lopetuso et al. 2013; Monteiro et al. 2019) a mají svou nezastupitelnou roli jakožto producenti butyrátu ve střevě, což je důležitý zdroj energie pro střevní buňky, ale také pro laktobacily (Singh et al. 2023). Probiotické kmeny aktivují slizniční imunitu a stimulují produkci cytokinů, sekreci IgA, fagocytózu a produkci antimikrobiálních látek (např. organických kyselin, peroxidu vodíku a bakteriocinů), které působí inhibičně vůči patogenům (Singhi & Kumar 2016).

Některé druhy a kmeny laktobacilů jsou schopny produkovat sloučeniny s antimikrobiálními účinky, včetně výše zmiňovaných organických kyselin, nízkomolekulárních sloučenin a antimikrobiálních peptidů (Carmo et al. 2018). V této práci bylo potvrzeno, že kmeny laktobacilů vykazují různé úrovně antimikrobiální účinnosti vůči *Cl. difficile*, *C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. neonatale* a *C. tertium*. Jednalo se o působení proti klostridiím jak na úrovni druhu, tak kmene. Což platí i pro citlivost testovaných klostridií. Nejčastěji byl zaznamenán antimikrobiální účinek u kmenů *L. reuteri*. Studie zkoumající různé izoláty a metabolity laktobacilů získaných z vaginálních střerů zjistila, že laktobacily vykazují *in vitro* bakteriostatické účinky proti *C. perfringens*, které jsou spojovány s produkcí bakteriocinů (Amin et al. 2017). Bakteriociny mohou zvyšovat propustnost vnitřní membrány bakterií, čímž přispívají k jejich protržení a narušují tak syntézu buněčné stěny, což vede k tvorbě pórů vazbou na lipidový prekurzor peptidoglykanu. Například bakteriocin lakticin 3147 produkovaný bakterií *Lactococcus lactis* vytváří selektivní póry v buněčných stěnách některých patogenních grampozitivních bakterií, včetně *Cl. difficile*, což vede k její smrti (Rea et al. 2007). Kromě toho je třeba zmínit, že klostridie jsou grampozitivní bakterie a bakteriociny mají cílenější inhibiční účinek proti tomuto typu mikroorganismu než proti gramnegativním bakteriím (Coman et al. 2014). Tím, že v rámci našeho testování docházelo k pozitivním výsledkům především u některých kmenů *L. reuteri*, lze i zde usuzovat na možnou produkci bakteriocinu. Je známo, že druh *L. reuteri* je zodpovědný za produkci reuterinu, navíc i další meziprodukty vznikající při jeho metabolismu mohou působit antimikrobiálně (Bianchini & Bullerman 2010). Což potvrzují i výsledky testování difúzní metodou, kdy 3-HP působila antimikrobiálně v koncentraci 300 mM proti 15 z 16 testovým klostridiím, zhruba vůči polovině testovaných kmenů v koncentraci 150 mM. Mnoho mikroorganismů může produkovat 3-HP buď jako meziprodukt nebo jako konečný produkt metabolismu (Kumar et al. 2013). V SPOT testu bylo zjištěno, že velké množství čerstvě narostlých kultur laktobacilů dokáže inhibovat růst klostridií. Na základě tohoto důkazu lze předpokládat, že se na inhibičním

působení podílí spojení více mechanismů a molekul produkovaných metabolismem testovaných kmenů laktobacilů. Exopolysacharidy jsou extracelulární makromolekuly vylučované mikroorganismy v podobě pevně vázaných kapsul nebo volně připojené slizové vrstvy. Hrají významnou roli proti vysychání, fagocytóze, rozpoznávání buněk, útoků fágů, antibiotik nebo toxických sloučenin a osmotickému stresu (Angelin & Kavitha 2020). Některé exopolysacharidy fungují tak, že vyvolávají imunitní toleranci, jiné se dokáží vyhýbat imunitním reakcím. Interakce mezi exopolysachridy a imunitním systémem pomáhá chránit bakterie před útokem imunitního systému hostitele. Jsou také spojovány s antibakteriální aktivitou (Bhandary et al. 2023).

Testování samotných metabolitů difúzní metodou umožnilo nalézt větší rozdíly v antimikrobiální aktivitě oproti SPOT testu. Studie sledující antimikrobiální aktivitu laktobacilů vůči klostridiím zjistila, že *L. plantarum* ATCC 8014 má probiotický potenciál s antimikrobiální aktivitou proti *C. buryicum* ATCC 860, *Cl. difficile* ATCC 9689 a *C. perfringens* ATCC 12924 (Montiero et al. 2019), což je v rozporu s našimi výsledky. V této práci byl pozorován pouze malý účinek inhibice kmenů *L. rhamnosus* proti *Cl. difficile* a *C. perfringens*. Námi testované kmeny tvořily pouze malé inhibiční zóny, a to pouze vůči *Cl. difficile*. Nicméně, zde se může jednat právě o kmenově specifické účinky a v našem testování nebyl zahrnut kmen *L. plantarum* ATCC 8014. Montiero et al. 2019, netestovali vůbec druh *L. reuteri*, který v experimentech zahrnutých v této diplomové práci měl největší antimikrobiální potenciál z testovaného výběru laktobacilů, tudíž také nelze výsledky porovnávat. Analýzy mikrobiomu a metabolomik studie potvrdila, že aplikace *L. reuteri* spolu s glycerolem byla účinná proti *Cl. difficile* (Spinler et al. 2017). Je však třeba zmínit, že glycerol nebyl součástí kultivačních médií a primárně nebylo cíleno na produkci reuterinu testovanými kmeny. Nicméně i tak *L. reuteri* neinhiboval *C. difficile* pouze ve dvou případech z dvaceti.

Organické kyseliny snižují střevní pH a tím zhoršují podmínky pro nepřátelské bakterie. Také mohou svou přítomností ovlivnit ochranné funkce střevní sliznice, včetně syntézy a sekrece antibakteriálních peptidů a mucinů (Parvez et al. 2006). Bakterie si vyvinuly několik systémů pro přežití v různých kyselých prostředích, aby zachránily poškození buněk v důsledku tohoto kyselého stresu, jako je na povrchu žaludku, nebo třeba v živných médiích. Mezi mechanismy odolnosti bakterií vůči kyselinám patří protonová pumpa, glutamát dekarboxylový systém, tvorba ochranného oblaku amoniaku či tvorba biofilmu (Liu et al. 2015). Pro vytvoření selektivních podmínek jsou do kultivačních médií běžně přidávány kyseliny. Používá se chlorovodíková kyselina, citrónová kyselina, mléčná kyselina nebo octová kyselina (Atlas 2010), proto jsme testovali i samotné kyseliny, u kterých předpokládáme, že jsou odpovědné za antimikrobiální aktivitu. Z našich výsledků vyplývá, že největší účinnost má octová kyselina, která velkou většinu klostridií inhibovala při koncentraci 0,5 % při difúzní metodě. Také studie, která stanovila antimikrobiální aktivitu octové kyseliny, citrónové kyseliny a mléčné kyseliny proti druhu *Shigella*, zjistila, že octová kyselina vykazovala největší antimikrobiální aktivitu v difúzní metodě (In et al. 2013).

Mléčná kyselina dokázala potlačovat růst velmi dobře při koncentraci 1 %. S tím korelují výsledky hodnot metabolitů naměřené v supernatantu, kdy mléčná kyselina převládá u všech námi testovaných laktobacilů. Nicméně námi naměřené hodnoty ukazují obsah laktátu a pravděpodobně se v supernatantu vyskytují další deriváty mléčné kyseliny, které jsme neanalyzovali a tudíž nedetekovali. Například některé druhy *Bifidobacterium* dokáží přeměnit

aromatické aminokyseliny z mateřského mléka (tryptofan, fenylalanin a tyrosin) na příslušné aromatické deriváty mléčné kyseliny (indol-mléčná kyselina, fenyl-mléčná a 4-hydroxyfenyl-mléčnou kyselinu). Dlouhodobé sledování složení fekální mikrobioty kojenců (od narození do 6. měsíce věku) ukázalo, že koncentrace aromatických mléčných kyselin pozitivně koreluje s množstvím bifidobakterií (Laursen et al. 2021). Nedávné studie ukazují, metabolity aromatických aminokyselin, včetně indolů odvozených od tryptofanu mohou prostřednictvím aktivace receptoru posilovat střevní bariéru a chránit před patogeny (Zelante et al. 2013; Roager & Licht 2018; Krautkramer et al. 2021). Meng et al. (2020) pozorovali a identifikovali protizánětlivou molekulu indol-3-mléčnou kyselinu, kterou odbouráváním tryptofanu z mateřského mléka metabolizuje *Bifidobacterium infantis*, tato molekula by mohla mít velmi pozitivní účinek v kojeneckém střevě. Laktobacily také produkují indol-3-mléčnou kyselinu. Konkrétně *L. plantarum* ZJ316 se řadí mezi laktobacily s vysokou produkcí této kyseliny. Do budoucna je třeba důkladně porozumět tomuto vztahu mezi metabolity tryptofanu a střevní mikrobiotou (Zhou et al. 2022).

7 Závěr

V této práci bylo potvrzeno, že různé druhy a kmeny laktobacilů vykazují různé úrovně antimikrobiální účinnosti vůči *Cl. difficile*, *C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. neonatale* a *C. tertium*, jak jsme předpokládali. Za použití spotové metody bylo zjištěno, že čerstvě narostlá kultura laktobacilů dokáže potlačit růst klostridií, což znamená, že pravděpodobně dochází nejen k působení antimikrobiálních metabolitů jako jsou organické kyseliny, ale i dalších obranných mechanismů jako je například tvorba exopolysacharidů a bakteriocinů. Tato metoda přinesla spoustu pozitivních výsledků, ale neumožnila nalézt společný trend v antimikrobiální aktivitě laktobacilů, například odlišit druhově či kmenově specifické působení. Taktéž proveditelnost metody inhibice tvorby plynů byla shledána jako laboratorně náročná a pro validní interpretaci výsledků by bylo třeba více opakování. Nicméně, z provedených testů je patrný pozitivní výsledek, například u *C. tertium* docházelo k redukci tvorby plynu s většinou testovaných laktobacilů. Díky uvedeným zjištěním byla metodická část práce více zaměřena na difúzní metodu. Difúzní metoda potvrdila druhovou a kmenovou specifickou antimikrobiální aktivitu testovaných supernatantů laktobacilů. Celkem bylo otestováno 13 druhů laktobacilů (*L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. paraplantarum*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. ultunensis*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. vaginalis*, *L. faecium*) zastoupených 36 kmeny. Největší antimikrobiální potenciál měly kmeny *L. reuteri*, za jehož antimikrobiální aktivitě se pravděpodobně podílí reuterin či další meziprodukty jeho metabolismu jako je 3-hydroxypropionová kyselina (3-HP). To potvrzují i výsledky testování difúzní metodou, kdy 3-HP působila antimikrobiálně v koncentraci 300 mM proti 15 z 16 testovým klostridiím, zhruba vůči polovině testovaných kmenů v koncentraci 150 mM. Taktéž testování kyseliny octové, mléčné a propionové přineslo pozitivní antimikrobiální účinky proti testovaným klostridiím.

Nejlepší výsledky vykazovaly celkově laktobacily vůči *C. difficile*. *C. difficile* patří mezi nejčastější patogeny způsobující střevní infekce kojenců, proto se laktobacily jeví jako velmi vhodná probiotika pro kojence.

8 Literatura

- AAKKO, Juhani, Akihito ENDO, Charles MANGANI, Kenneth MALETA, Per ASHORN, Erika ISOLAURI a Seppo SALMINEN. *Distinctive Intestinal Lactobacillus Communities in 6-Month-Old Infants From Rural Malawi and Southwestern Finland* [online]. 2015, **61**(6), 641-648 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0000000000000878
- AHMAD, Hafiz H., Blake PECK a Daniel TERRY. The influence of probiotics on gastrointestinal tract infections among children attending childcare: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2022, **132**(3), 1636-1651 [cit. 2023-02-18]. ISSN 1365-2672. Dostupné z: doi:10.1111/jam.15374
- AMIN, Mansour, Parastoo Moradi CHOGHAKABODI, Mohammad Alhassan HAMIDI, Mahin NAJAFIAN a Ahmad Farajzadeh SHEIKH. In vitro antimicrobial activities of metabolites from vaginal Lactobacillus strains against Clostridium perfringens isolated from a woman's vagina. *Journal of the Chinese Medical Association* [online]. 2017, **80**(1), 29-33 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1726-4901. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcma.2016.04.009
- ANGELIN, J. a M. KAVITHA. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **162**, 853-865 [cit. 2023-04-09]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190
- ANJUM, Nazia, Shabana MAQSOOD, Tariq MASUD, Asif AHMAD, Asma SOHAIL a Abdul MOMIN. Lactobacillus acidophilus: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2014, **54**(9), 1241-1251 [cit. 2022-12-21]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2011.621169
- AYIVI, Raphael D. a Salam A. IBRAHIM. *Lactic acid bacteria: an essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt* [online]. 2022, **57**(11), 7008-7025 [cit. 2023-02-18]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.16076
- ASHOK, Somasundar, Subramanian MOHAN RAJ, Yeunjoo KO, Mugesh SANKARANARAYANAN, Shengfang ZHOU, Vinod KUMAR a Sunghoon PARK. Effect of puuC overexpression and nitrate addition on glycerol metabolism and anaerobic 3-hydroxypropionic acid production in recombinant Klebsiella pneumoniae ΔglpKΔdhaT. *Metabolic Engineering* [online]. 2013, **15**(1), 10-24 [cit. 2020-12-28]. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2012.09.004
- ATLAS, Ronald M. *Handbook of Microbiological Media* [online]. 2010-3-17 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: doi:10.1201/EBK1439804063
- BEGUNOVA, A. V., I. V. ROZHKOVA, T. I. SHIRSHOVA, O. A. GLAZUNOVA a T. V. FEDOROVA. Optimization of Cultivation Conditions for the Lactobacillus reuteri LR1 Strain to Improve the Biosynthesis of Bacteriocin-Like Substances. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2020, **56**(9), 920-929 [cit. 2020-12-26]. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:10.1134/S0003683820090033

- BHANDARY, Thejaswi, Christine KURIAN, Magesh MUTHU, Asha ANAND, Thirunavukarasou ANAND a Kuppusamy Alagesan PAARI. Exopolysaccharides Derived from Probiotic Bacteria and their Health Benefits. *Journal of Pure and Applied Microbiology* [online]. 2023, **17**(1), 35-50 [cit. 2023-04-07]. ISSN 09737510. Dostupné z: doi:10.22207/JPAM.17.1.40
- BIANCHINI, Andreia a Lloyd B. BULLERMAN. Biological Control of Molds and Mycotoxins in Foods. *Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture* [online]. Washington DC: American Chemical Society, 2010, 2010-02-26, 1-16 [cit. 2020-12-26]. ACS Symposium Series. ISBN 0-8412-6990-4. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2009-1031.ch001
- BROOKS, S P.J, M MCALLISTER, M SANDOZ a M L KALMOKOFF. Culture-independent phylogenetic analysis of the faecal flora of the rat. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 2003, **49**(10), 589-601 [cit. 2021-02-04]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/w03-075
- BROWNE, Hilary P, Yan SHAO a Trevor D LAWLEY. Mother–infant transmission of human microbiota. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2022, **69** [cit. 2022-10-17]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2022.102173
- BUNESOVA, Vera, Christophe LACROIX a Clarissa SCHWAB. Mucin Cross-Feeding of Infant Bifidobacteria and Eubacterium hallii. *Microbial Ecology* [online]. 2018, **75**(1), 228-238 [cit. 2023-02-19]. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-017-1037-4
- CASSIR, N., S. BENAMAR a B. LA SCOLA. Clostridium butyricum: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2016, **22**(1), 37-45 [cit. 2023-04-14]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmi.2015.10.
- CLAES, I J J, Sarah LEBEER, C SHEN, et al. Impact of lipoteichoic acid modification on the performance of the probiotic Lactobacillus rhamnosus GG in experimental colitis. *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 2010, **162**(2), 306-314 [cit. 2023-04-12]. ISSN 1365-2249. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04228.x
- CLARKE, Gerard, Roman M. STILLING, Paul J. KENNEDY, Catherine STANTON, John F. CRYAN a Timothy G. DINAN. Minireview: Gut Microbiota. *Molecular Endocrinology* [online]. 2014, **28**(8), 1221-1238 [cit. 2020-12-02]. ISSN 0888-8809. Dostupné z: doi:10.1210/me.2014-1108
- CLEUSIX, Valentine, Christophe LACROIX, Sabine VOLLENWEIDER a GwenaÏlle LE BLAY. Glycerol induces reuterin production and decreases Escherichia coli population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2008, **63**(1), 56-64 [cit. 2023-02-28]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00412.x
- COMAN, M.M., M.C. VERDENELLI, C. CECCHINI, S. SILVI, C. ORPIANESI, N. BOYKO a A. CRESCI. In vitro evaluation of antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus IMC 501 ® , Lactobacillus paracasei IMC 502 ® and SYN BIO ® against

- pathogens. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2014, **117**(2), 518-527 [cit. 2023-04-03]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.12544
- CRUZ-MORALES, Pablo, Camila A ORELLANA, George MOUTAFIS, Glenn MOONEN, Gonzalo RINCON, Lars K NIELSEN, Esteban MARCELLIN a Eric BAPTESTE. Revisiting the Evolution and Taxonomy of Clostridia, a Phylogenomic Update. *Genome Biology and Evolution* [online]. 2019, **11**(7), 2035-2044 [cit. 2022-11-27]. ISSN 1759-6653. Dostupné z: doi:10.1093/gbe/evz096
- DATTA, R. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 1995, **16**(2-3), 221-231 [cit. 2020-12-28]. ISSN 01686445. Dostupné z: doi:10.1016/0168-6445(94)00055-4
- DELLAGLIO, Franco, Severino ARRIZZA a Antonio LEDDA. Classification of Citrate Fermenting Lactobacilli Isolated from Lamb Stomach, Sheep Milk and Pecorino Romano Cheese. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* [online]. 1981, **2**(4), 349-356 [cit. 2021-02-05]. ISSN 07219571. Dostupné z: doi:10.1016/S0721-9571(81)80028-2
- DI PROFIO, Elisabetta, Vittoria Carlotta MAGENES, Giulia FIORE, et al. Special Diets in Infants and Children and Impact on Gut Microbioma. *Nutrients* [online]. 2022, **14**(15) [cit. 2022-10-23]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu14153198
- DIAS, Jorge Amil, Edmundo SANTOS, Inês, Sylvia JACOB a Carmen Ribes KONINCKX. The Role of Infant Formulas in the Primary Prevention of Allergies in Non-Breastfed Infants at Risk of Developing Allergies—Recommendations from a Multidisciplinary Group of Experts. *Nutrients* [online]. 2022, **14**(19) [cit. 2022-12-05]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu14194016
- DIBNER, J.J. a P. BUTTIN. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. *Journal of Applied Poultry Research* [online]. 2002, **11**(4), 453-463 [cit. 2021-03-06]. ISSN 10566171. Dostupné z: doi:10.1093/japr/11.4.453
- DISHISHA, Tarek, Luciana P PEREYRA, Sang-Hyun PYO, Robert A BRITTON a Rajni HATTI-KAUL. Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, **13**(1) [cit. 2020-11-27]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-13-76
- DJUKOVIC, Ana, María José GARZÓN, Cécile CANLET, et al. *Lactobacillus* supports Clostridiales to restrict gut colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Nature Communications* [online]. 2022, **13**(1) [cit. 2022-12-20]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-33313-w
- DO CARMO, Monique Santos, Camilla itapary dos SANTOS, Mizaél Calácio ARAÚJO, Jorge Alberto GIRÓN, Elizabeth Soares FERNANDES a Valério MONTEIRO-NETO. *Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea*

- management in children* [online]. 2018, **9**(10), 5074-5095 [cit. 2023-03-31]. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/C8FO00376A
- eLOPETUSO, Loris R, Franco SCALDAFERRI, Valentina PETITO a Antonio GASBARRINI. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens* [online]. 2013, **5**(1) [cit. 2023-02-12]. ISSN 1757-4749. Dostupné z: doi:10.1186/1757-4749-5-23
- ENGELS, Christina, Clarissa SCHWAB, Jianbo ZHANG, et al. Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2020-11-18]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep36246
- FORSYTHE, S. J. *The microbiology of safe food*. 2nd ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-1-4051-4005-8.
- FU, Jie, Tenghao WANG, Xiao XIAO, Yuanzhi CHENG, Fengqin WANG, Mingliang JIN, Yizhen WANG a Xin ZONG. Clostridium Butyricum ZJU-F1 Benefits the Intestinal Barrier Function and Immune Response Associated with Its Modulation of Gut Microbiota in Weaned Piglets. *Cells* [online]. 2021, **10**(3) [cit. 2023-04-14]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10030527
- GAMALLAT, Yaser, Abdo MEYIAH, Eugene D. KUUGBEE, et al. *Lactobacillus rhamnosus* induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model [online]. 2016, **83**, 536-541 [cit. 2023-04-12]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2016.07.001
- GÄNZLE MG. 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* 2:106-117
- GEVERS, Dirk, Subra KUGATHASAN, Lee A. DENSON, et al. *The Treatment-Naive Microbiome in New-Onset Crohn's Disease* [online]. 2014, **15**(3) [cit. 2022-11-29]. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2014.02.005
- GIBSON, Glenn R., Robert HUTKINS, Mary Ellen SANDERS, et al. *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics* [online]. 2017, **14**(8) [cit. 2022-12-05]. ISSN 1759-5045. Dostupné z: doi:10.1038/nrgastro.2017.75
- GUARNER, F., KHAN, A. G., GARISCH, J., ELIAKIM, R., GANGL, A., THOMSON, A, KRABSHUIS, J, LEMAIR, T. (2011). Probiotics and prebiotics. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*, 1-28
- GYAWALI, Rabin a Salam A. IBRAHIM. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* [online]. 2014, **46**, 412-429 [cit. 2020-12-22]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.047
- HE, Qiuwen, Lai-Yu KWOK, Xiaoxia XI, et al. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. *Gut Microbes* [online]. 2020, **12**(1) [cit. 2022-10-17]. ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2020.1794266

- HELANDER, Herbert F a Lars FÄNDRIKS. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **49**(6), 681-689 [cit. 2022-11-17]. ISSN 0036-5521. Dostupné z: doi:10.3109/00365521.2014.898326
- HSIAO, Yu-Ping, Hsiao-Ling CHEN, Jen-Ning TSAI, Meei-Yn LIN, Jiunn-Wang LIAO, Meng-Syuan WEI, Jiunn-Liang KO a Chu-Chyn OU. Administration of *Lactobacillus reuteri* Combined with *Clostridium butyricum* Attenuates Cisplatin-Induced Renal Damage by Gut Microbiota Reconstitution, Increasing Butyric Acid Production, and Suppressing Renal Inflammation. *Nutrients* [online]. 2021, **13**(8) [cit. 2023-02-20]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13082792
- HUANG, Dan, Bo YANG, Yang CHEN, Catherine STANTON, R. Paul ROSS, Jianxin ZHAO, Hao ZHANG a Wei CHEN. Comparative genomic analyses of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from Chinese subjects. *Food Bioscience* [online]. 2020, **36** [cit. 2023-04-12]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2020.100659
- HUANG, Yanna, Zhimin LI, Kazuyuki SHIMIZU a Qin YE. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* expressing aldH under microaerobic conditions. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **128**, 505-512 [cit. 2020-12-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2012.10.143
- CHEN, Bao-Chung, Yao-Ching HUANG, Shi-Hao HUANG, et al. Epidemiology and risk factors for notifiable *Clostridium botulinum* infections in Taiwan from 2003 to 2020. *Medicine* [online]. 2022, **101**(42) [cit. 2023-03-27]. ISSN 1536-5964. Dostupné z: doi:10.1097/MD.00000000000031198
- CHEN, Hao, Xiaomeng MA, Yingying LIU, et al. Gut Microbiota Interventions With *Clostridium butyricum* and Norfloxacin Modulate Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10** [cit. 2023-04-14]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.01662
- CHUN, Ah Yeong, Liang YUNXIAO, Somasundar ASHOK, Eunhee SEOL a Sunghoon PARK. Elucidation of toxicity of organic acids inhibiting growth of *Escherichia coli* W. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [online]. 2014, **19**(5), 858-865 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1226-8372. Dostupné z: doi:10.1007/s12257-014-0420-y
- JU, Jung-Hyun, Sang-Gyu JEON, Kyung Min LEE, Sun-Yeon HEO, Min-Soo KIM, Chul-Ho KIM a Baek-Rock OH. The Biocatalytic Production of 3-Hydroxypropionaldehyde and Evaluation of Its Stability. *Catalysts* [online]. 2021, **11**(10) [cit. 2023-02-28]. ISSN 2073-4344. Dostupné z: doi:10.3390/catal11101139
- KANDLER, Otto, Karl-Otto STETTER a Ruth KÖHL. *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a New Species of Heterofermentative Lactobacilli. *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* [online]. 1980, **1**(3), 264-269 [cit. 2021-02-22]. ISSN 01725564. Dostupné z: doi:10.1016/S0172-5564(80)80007-8
- KOLINSKA, J., M. ZAKOSTELECKA, Z. ZEMANOVA, V. LISA, J. GOLIAS, H. KOZAKOVA a B. DVORAK. Cellular Differentiation of Non-Transformed Intestinal

- Epithelial Cells Is Regulated by *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* Strains. *Physiological Research* [online]. 2018, 261-273 [cit. 2023-04-12]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.933643
- KONG, Qing, Guo-Qing HE, Ji-Lei JIA, Qi-Long ZHU a Hui RUAN. Oral Administration of *Clostridium butyricum* for Modulating Gastrointestinal Microflora in Mice. *Current Microbiology* [online]. 2011, **62**(2), 512-517 [cit. 2023-04-14]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-010-9737-8
- KORPELA, Katri, Anne SALONEN, Lauri J. VIRTA, Minna KUMPU, Riina A. KEKKONEN, Willem M. DE VOS a Nerges MISTRY. *Lactobacillus rhamnosus* GG Intake Modifies Preschool Children's Intestinal Microbiota, Alleviates Penicillin-Associated Changes, and Reduces Antibiotic Use. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(4) [cit. 2023-03-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0154012
- KOSTIC, Aleksandar D., Dirk GEVERS, Heli SILJANDER, et al. *The Dynamics of the Human Infant Gut Microbiome in Development and in Progression toward Type 1 Diabetes* [online]. 2015, **17**(2), 260-273 [cit. 2022-11-29]. ISSN 19313128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2015.01.001
- KRAUTKRAMER, Kimberly A., Jing FAN a Fredrik BÄCKHED. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, **19**(2), 77-94 [cit. 2023-04-09]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-0438-4
- KUMAR, Vinod, Somasundar ASHOK a Sunghoon PARK. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnology Advances* [online]. 2013, **31**(6), 945-961 [cit. 2021-02-14]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2013.02.008
- LAURSEN, Martin F., Mikiyasu SAKANAKA, Nicole VON BURG, et al. Bifidobacterium species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut. *Nature Microbiology* [online]. 2021, **6**(11), 1367-1382 [cit. 2023-04-09]. ISSN 2058-5276. Dostupné z: doi:10.1038/s41564-021-00970-4
- LEE, Jin, Su Bum PARK, Hyung Wook KIM, Hong Sub LEE, Sam Ryong JEE, Jong Hun LEE, Tae Oh KIM a Chiara RICCI. Clinical Efficacy of Probiotic Therapy on Bowel-Related Symptoms in Patients with Ulcerative Colitis during Endoscopic Remission: An Observational Study. *Gastroenterology Research and Practice* [online]. 2022, **2022**, 1-5 [cit. 2023-04-14]. ISSN 1687-630X. Dostupné z: doi:10.1155/2022/9872230
- LEPŠ, Jan a Petr ŠMILAUER. *Biostatistika*. České Budějovice: Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2016. ISBN 978-80-7394-587-9.
- LESER, Thomas D., Joanna Z. AMENUVOR, Tim K. JENSEN, Rikke H. LINDECORONA, Mette BOYE a Kristian MÅLLER. Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria: the Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2002, **68**(2), 673-690 [cit. 2021-02-04]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.2.673-690.2002

- LIANG, Nuanyi, Věra NEUŽIL-BUNEŠOVÁ, Václav TEJNECKÝ, Michael GÄNZLE a Clarissa SCHWAB. 3-Hydroxypropionic acid contributes to the antibacterial activity of glycerol metabolism by the food microbe *Limosilactobacillus reuteri*. *Food Microbiology* [online]. 2021, **98** [cit. 2021-04-30]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2020.103720
- LIU, Yuping, Hongzhi TANG, Zhanglin LIN a Ping XU. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(7), 1484-1492 [cit. 2023-04-09]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.06.001
- MANI-LÓPEZ, E., H.S. GARCÍA a A. LÓPEZ-MALO. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International* [online]. 2012, **45**(2), 713-721 [cit. 2021-03-06]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2011.04.043
- MARTINO, Cameron, Amanda Hazel DILMORE, Zachary M. BURCHAM, Jessica L. METCALF, Dilip JESTE a Rob KNIGHT. Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2022 [cit. 2022-10-17]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-022-00768-z
- MCDONALD, L. Clifford, George E. KILLGORE, Angela THOMPSON, Robert C. OWENS, Sophia V. KAZAKOVA, Susan P. SAMBOL, Stuart JOHNSON a Dale N. GERDING. An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine* [online]. 2005, **353**(23), 2433-2441 [cit. 2023-02-20]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa051590
- MENG, X, T KARASAWA, K ZOU, et al. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1997, **35**(8) [cit. 2023-04-14]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/jcm.35.8.2160-2162.1997
- MONTEIRO, Cinara, Monique DO CARMO, Bruna MELO, et al. In Vitro Antimicrobial Activity and Probiotic Potential of Bifidobacterium and Lactobacillus against Species of Clostridium. *Nutrients* [online]. 2019, **11**(2) [cit. 2023-04-13]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11020448
- MORESI, M. a E. PARENTE. FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Production of Some Organic Acids (Citric, Gluconic, Lactic, and Propionic). *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, 804-815 [cit. 2021-03-06]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00111-7
- OH, Phaik Lyn, Andrew K BENSON, Daniel A PETERSON, Prabhu B PATIL, Etsuko N MORIYAMA, Stefan ROOS a Jens WALTER. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. *The ISME Journal* [online]. 2010, **4**(3), 377-387 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2009.123
- OHTANI, Kaori, Hideo HAYASHI a Tohru SHIMIZU. The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Molecular*

- Microbiology* [online]. 2002, **44**(1), 171-179 [cit. 2023-02-20]. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02863.x
- ORTIZ-RIVERA, Y., R. SÁNCHEZ-VEGA, N. GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, J. LEÓN-FÉLIX, C. ACOSTA-MUÑIZ a D.R. SEPULVEDA. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* [online]. 2017, **100**(6), 4258-4268 [cit. 2021-02-27]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2016-11534
- PANDITRAO, Mayuri V., Haydee A. DABRITZ, N. Neely KAZEROUNI, Karla H. DAMUS, Joyce K. MEISSINGER a Stephen S. ARNON. Descriptive Epidemiology of Infant Botulism in California: The First 40 Years. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2020, **227**, 247-257.e3 [cit. 2023-03-27]. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2020.08.013
- PÄRTTY, Anna, Marko KALLIOMÄKI, Akihito ENDO, Seppo SALMINEN, Erika ISOLAURI a Niyaz AHMED. Compositional Development of Bifidobacterium and Lactobacillus Microbiota Is Linked with Crying and Fussing in Early Infancy. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(3) [cit. 2023-03-29]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0032495
- PARVEZ, S., K.A. MALIK, S. AH KANG a H.-Y. KIM. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2006, **100**(6), 1171-1185 [cit. 2020-11-30]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x
- PASCUAL, Liliana M., María B. DANIELE, Francisco RUIZ, Walter GIORDANO, Cristina PÁJARO a Lucila BARBERIS. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology* [online]. 2008, **54**(3), 141-148 [cit. 2023-04-12]. ISSN 1349-8037. Dostupné z: doi:10.2323/jgam.54.141
- PENDERS, John, Carel THIJS, Monique MOMMERS, et al. Intestinal lactobacilli and the DC-SIGN gene for their recognition by dendritic cells play a role in the aetiology of allergic manifestations. *Microbiology* [online]. 2010, **156**(11), 3298-3305 [cit. 2023-03-29]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.042069-0
- PERÉZ-LOPEZ, Araceli, Judith BEHNSEN, Sean-Paul NUCCIO a Manuela RAFFATELLU. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2016, **16**(3), 135-148 [cit. 2022-10-17]. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri.2015.17
- POURSHABAN, Manoocheher, Giovanna FRANCIOSA, Lucia FENICIA a Paolo AURELI. Taxonomic identity of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains by sequencing of a short 16S rDNA region. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2002, **214**(1), 119-125 [cit. 2023-04-14]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11334.x

- RAUTAVA, Samuli, Maria Carmen COLLADO, Seppo SALMINEN a Erika ISOLAURI. Probiotics Modulate Host-Microbe Interaction in the Placenta and Fetal Gut: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Neonatology* [online]. 2012, **102**(3), 178-184 [cit. 2023-03-29]. ISSN 1661-7800. Dostupné z: doi:10.1159/000339182
- REA, Mary C., Evelyn CLAYTON, Paula M. O'CONNOR, Fergus SHANAHAN, Barry KIELY, R. Paul ROSS a Colin HILL. Antimicrobial activity of lacticin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2007, **56**(7), 940-946 [cit. 2023-04-01]. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.47085-0
- ROAGER, Henrik M. a Tine R. LICHT. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature Communications* [online]. 2018, **9**(1) [cit. 2023-04-09]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-05470-4
- RUPNIK, Maja, Mark H. WILCOX a Dale N. GERDING. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2009, **7**(7), 526-536 [cit. 2022-11-27]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2164
- RUTHERFORD, S. T. a B. L. BASSLER. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2012, **2**(11), a012427-a012427 [cit. 2023-02-20]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012427
- SALZMAN, Nita H., Hendrik DE JONG, Yvonne PATERSON, Hermie J. M. HARMSEN, Gjalte W. WELLING a Nicolaas A. BOS. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria b bThe GenBank accession numbers for the clone sequences reported in this paper can be found in Table 1 T1 ; the accession number for isolate MIB-CB3 is AJ418059. *Microbiology* [online]. 2002, **148**(11), 3651-3660 [cit. 2021-02-04]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-148-11-3651
- SANDERS, M.E. a T.R. *Journal of Dairy Science* [online]. 2001, **84**(2) [cit. 2022-12-21]. Dostupné z: doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74481-5
- SANKARANARAYANAN, Mugesh, Somasundar ASHOK a Park SUNGHOON. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by acid tolerant *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **41**(7), 1039-1050 [cit. 2021-03-07]. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-014-1451-2
- SAVINO, Francesco, Lisa CORDISCO, Valentina TARASCO, Elisabetta PALUMERI, Roberto CALABRESE, Roberto OGGERO, Stefan ROOS a Diego MATTEUZZI. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Pediatrics* [online]. 2010, **126**(3), e526-e533 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2010-0433

- SCOTT, Karen P., Jennifer C. MARTIN, Sylvia H. DUNCAN a Harry J. FLINT. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2014, **87**(1), 30-40 [cit. 2023-02-19]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/1574-6941.12186
- SCHAEFER, Laura, Thomas A. AUCHTUNG, Karley E. HERMANS, Daniel WHITEHEAD, Babak BORHAN a Robert A. BRITTON. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* [online]. 2010, **156**(6), 1589-1599 [cit. 2023-02-28]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.035642-0
- SCHWAB, Clarissa, Hans-Joachim RUSCHEWEYH, Vera BUNESOVA, Van Thanh PHAM, Niko BEERENWINKEL a Christophe LACROIX. Trophic Interactions of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii* during L-Fucose and Fucosyllactose Degradation. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8** [cit. 2023-02-19]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.00095
- SINGH, Vineet, GyuDae LEE, HyunWoo SON, Hong KOH, Eun Soo KIM, Tatsuya UNNO a Jae-Ho SHIN. Butyrate producers, “The Sentinel of Gut”: Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2023, **13** [cit. 2023-02-12]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.1103836
- SINGHI, Sunit C. a Suresh KUMAR. Probiotics in critically ill children. *F1000Research* [online]. 2016, **5** [cit. 2023-03-31]. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.7630.1
- ŚLIŻEWSKA, Katarzyna, Paulina MARKOWIAK-KOPEĆ a Weronika ŚLIŻEWSKA. The Role of Probiotics in Cancer Prevention. *Cancers* [online]. 2021, **13**(1) [cit. 2021-02-03]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13010020
- SPINLER, Jennifer K., Jennifer AUCHTUNG, Aaron BROWN, et al. Next-Generation Probiotics Targeting *Clostridium difficile* through Precursor-Directed Antimicrobial Biosynthesis. *Infection and Immunity* [online]. 2017, **85**(10), e00303-17 [cit. 2023-02-28]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00303-17
- SRINIVASJOIS, Ravisha, Amanuel GEBREMEDHIN, Desiree SILVA, Shripada RAO a Gavin PEREIRA. Probiotic supplementation in neonates and long-term gut colonisation: A systematic review of randomised controlled trials. *Journal of Paediatrics and Child Health* [online]. 2023, **59**(2), 212-217 [cit. 2023-03-29]. ISSN 1034-4810. Dostupné z: doi:10.1111/jpc.16318
- STEVENS, M., S. VOLLENWEIDER, C. LACROIX a E.T.H. ZURICH. The potential of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* as a broad spectrum preservative in food. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* [online]. Elsevier, 2011, 2011, 129-160 [cit. 2023-02-28]. ISBN 9781845696696. Dostupné z: doi:10.1533/9780857090522.1.129

- STEWART, Christopher J., Nadim J. AJAMI, Jacqueline L. O'BRIEN, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* [online]. 2018, **562**(7728) [cit. 2022-10-17]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-018-0617-x
- STOEVA, Magdalena K., Jeewon GARCIA-SO, Nicholas JUSTICE, et al. Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease. *Gut Microbes* [online]. 2021, **13**(1) [cit. 2023-04-14]. ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2021.1907272
- SUN, Jing, Haijun LI, Yangjie JIN, Jiaheng YU, Shiyin MAO, Kuan-Pin SU, Zongxin LING a Jiaming LIU. Probiotic *Clostridium butyricum* ameliorated motor deficits in a mouse model of Parkinson's disease via gut microbiota-GLP-1 pathway. *Brain, Behavior, and Immunity* [online]. 2021, **91**, 703-715 [cit. 2023-04-14]. ISSN 08891591. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbi.2020.10.014
- SUN, Mao-Cheng, Zi-Yi HU, Dian-Dian LI, Yu-Xin CHEN, Jing-Hui XI a Chang-Hui ZHAO. Application of the Reuterin System as Food Preservative or Health-Promoting Agent: A Critical Review. *Foods* [online]. 2022, **11**(24) [cit. 2023-02-28]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11244000
- SUN, Ye, Yanqing TANG, Xufeng HOU, et al. Novel *Lactobacillus reuteri* HI120 Affects Lipid Metabolism in C57BL/6 Obese Mice. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2020, **7** [cit. 2020-11-17]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2020.560241
- TAMBURINI, Sabrina, Nan SHEN, Han Chih WU a Jose C CLEMENTE. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature Medicine* [online]. 2016, **22**(7), 713-722 [cit. 2022-11-29]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/nm.4142
- TARRACCHINI, Chiara, Christian MILANI, Giulia LONGHI, et al. Unraveling the Microbiome of Necrotizing Enterocolitis: Insights in Novel Microbial and Metabolomic Biomarkers. *Microbiology Spectrum* [online]. 2021, **9**(2), e01176-21 [cit. 2023-03-27]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/Spectrum.01176-21
- TARRACCHINI, Chiara, Christian MILANI, Giulia LONGHI, et al. Unraveling the Microbiome of Necrotizing Enterocolitis: Insights in Novel Microbial and Metabolomic Biomarkers. *Microbiology Spectrum* [online]. 2021, **9**(2), e01176-21 [cit. 2023-03-27]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/Spectrum.01176-21
- THORBURN, Alison N., Craig I. MCKENZIE, Sij SHEN, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nature Communications* [online]. 2015, **6**(1) [cit. 2022-10-17]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms8320
- TINGIRIKARI, J.M.R., S. AHMED a V.K. YATA. 3-Hydroxy-propionic Acid. *Platform Chemical Biorefinery* [online]. Elsevier, 2016, 2016, 101-117 [cit. 2021-02-15]. ISBN 9780128029800. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802980-0.00006-7
- TURNBAUGH, Peter J., Ruth E. LEY, Michael A. MAHOWALD, Vincent MAGRINI, Elaine R. MARDIS a Jeffrey I. GORDON. An obesity-associated gut microbiome with increased

- capacity for energy harvest. *Nature* [online]. 2006, **444**(7122), 1027-1031 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature05414
- TURRONI, Francesca, Christian MILANI, Marco VENTURA a Douwe VAN SINDEREN. The human gut microbiota during the initial stages of life: insights from bifidobacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2022, **73**, 81-87 [cit. 2022-10-17]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2021.07.012
- UMEDA, Kaoru, Yuji HIRAI, Hiromi NAKAMURA a Kiyoko AMO. Comparative whole-genome sequence analysis of a BoNT/B5-producing *Clostridium botulinum* isolate from an infant botulism case of unknown source in Osaka, Japan. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2022, **369**(1) [cit. 2023-03-27]. ISSN 1574-6968. Dostupné z: doi:10.1093/femsle/fnac069
- URRUTIA-BACA, Víctor Hugo, Erandi ESCAMILLA-GARCÍA, Myriam Angélica DE LA GARZA-RAMOS, Patricia TAMEZ-GUERRA, Ricardo GOMEZ-FLORES a Cynthia Sofia URBINA-RÍOS. In Vitro Antimicrobial Activity and Downregulation of Virulence Gene Expression on *Helicobacter pylori* by Reuterin. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* [online]. 2018, **10**(2), 168-175 [cit. 2023-02-28]. ISSN 1867-1306. Dostupné z: doi:10.1007/s12602-017-9342-2
- VANDENPLAS, Yvan, V.P. CARNIELLI, J. KSIAZYK, et al. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition* [online]. 2020, **78** [cit. 2022-10-17]. ISSN 08999007. Dostupné z: doi:10.1016/j.nut.2020.110812
- VOLLENWEIDER, S. a C. LACROIX. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, **64**(1), 16-27 [cit. 2020-12-27]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-003-1497-y
- VOLLENWEIDER, Sabine, Guido GRASSI, Iwo KÖNIG a Zdenko PUHAN. Purification and Structural Characterization of 3-Hydroxypropionaldehyde and Its Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(11), 3287-3293 [cit. 2020-12-27]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf021086d
- YANG, Luyao, James N. HIGGINBOTHAM, Liping LIU, et al. Production of a Functional Factor, p40, by *Lactobacillus rhamnosus* GG Is Promoted by Intestinal Epithelial Cell-Secreted Extracellular Vesicles. *Infection and Immunity* [online]. 2019, **87**(7), e00113-19 [cit. 2023-04-12]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.00113-19
- YEHIA, Hany Mohamed, Afrah Fahad ALKHURJI, Ioannis SAVVAIDIS a Abdulrahman Hamad AL-MASOUD. Bactericidal effect of nisin and reuterin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *S. aureus* ATCC 25937. *Food Science and Technology* [online]. 2022, **42** [cit. 2023-02-28]. ISSN 1678-457X. Dostupné z: doi:10.1590/fst.105321
- ZELANTE, Teresa, Rossana G. IANNITTI, Cristina CUNHA, et al. Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via

- Interleukin-22. *Immunity* [online]. 2013, **39**(2), 372-385 [cit. 2023-04-09]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003
- ZHANG, Chonggang, Markus J. BRANDT, Clarissa SCHWAB a Michael G. GÄNZLE. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiology* [online]. 2010, **27**(3), 390-395 [cit. 2021-03-07]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2009.11.019
- ZHENG, Jinshui, Stijn WITTOUCK, Elisa SALVETTI, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2020, **70**(4), 2782-2858 [cit. 2023-04-13]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.
- ZHENG, Jinshui, Xin ZHAO, Xiaoxi B. LIN a Michael GÄNZLE. Comparative genomics *Lactobacillus reuteri* from sourdough reveals adaptation of an intestinal symbiont to food fermentations. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1) [cit. 2021-02-25]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep18234
- ZHOU, Mingyao, Wei YUAN, Bing YANG, Wei PEI, Jie MA a Qiang FENG. *Clostridium butyricum* inhibits the progression of colorectal cancer and alleviates intestinal inflammation via the myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2022, **10**(8), 478-478 [cit. 2023-04-14]. ISSN 23055839. Dostupné z: doi:10.21037/atm-22-1670
- ZHOU, Qingqing, Zuorui XIE, Danli WU, Lingli LIU, Yongqing SHI, Ping LI a Qing GU. The Effect of Indole-3-Lactic Acid from *Lactiplantibacillus plantarum* ZJ316 on Human Intestinal Microbiota In Vitro. *Foods* [online]. 2022, **11**(20) [cit. 2023-04-13]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11203302
- ZÚÑIGA, Manuel, María Jesús YEBRA a Vicente MONEDERO. Complex Oligosaccharide Utilization Pathways in *Lactobacillus*. *Current Issues in Molecular Biology* [online]. 2021, **40**, 49-80 [cit. 2020-11-15]. ISSN 14673037. Dostupné z: doi:10.21775/cimb.040.049

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Nejčastější druhy probiotik. (Parvez et al. 2006; Śliżewska et al. 2021)	19
Tabulka 2: Testované klostridie.....	28
Tabulka 3: Testované laktobacily	29
Tabulka 4: Ingredience potřebné pro modifikovaný Wilkins-chalgren bujón.....	30
Tabulka 5: Přehled jednotlivých médií na 1000 ml.....	31
Tabulka 6: Výsledky spotové metody.	37
Tabulka 7: Výsledky testu produkce plynů.	39
Tabulka 8: Výsledky difúzní metody (velikosti tedy průměry inhibičních zón v mm), pH použitých supernatantů.	41
Tabulka 9: Naměřené inhibiční zóny (mm) při použití kyselin při difúzní metodě.	43

10 Seznam obrázků

Obrázek 1: Vývoj mikrobioty dětí. Vysvětlivka: AMR patogeny = rezistentní patogeny (upraveno podle Browne et al. 2022).	14
Obrázek 2: Obrázek 2: Schéma homofermentace (a) a heterofermentace (b) glukózy (upraveno podle Ganzle 2015).....	17
Obrázek 3: Reuterin (upraveno podle Schaefer et al. 2010).....	22
Obrázek 4: MALDI destička.	30
Obrázek 5: Spotová metoda - znázornění Petriho misky.....	32
Obrázek 6: Znázornění zkumavky s agarem při testu produkce plynu.	33
Obrázek 7: Znázornění Petriho misky pro difúzní metodu.	34
Obrázek 8: Vialka použitá pro iontovou chromatografii.	35
Obrázek 9: Příklad inhibice klostridií u spotové metody. <i>Cl. difficile</i> CP_NI30 a <i>L. delbrückii</i> L9/12.....	36
Obrázek 10: Petriho miska, kde je narostlá <i>Cl. difficile</i> CP_NI30. Číslo 33 představuje <i>L. reuteri</i> LBC 78/2A.	40
Obrázek 11: Zastoupení laktátu, acetátu a formátu v %.	45

11 Seznam použitých zkratek a symbolů

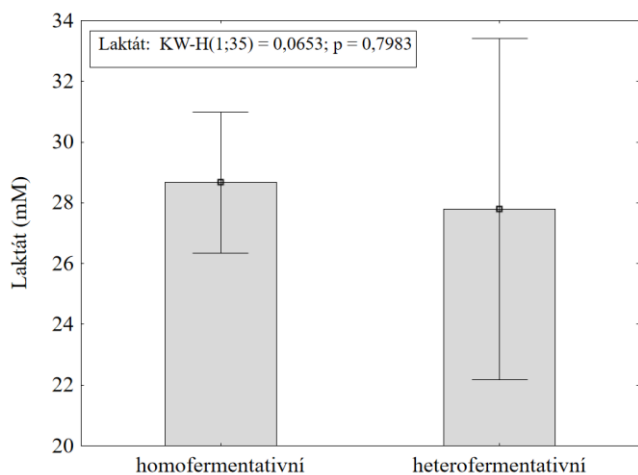
1,3-PDO -1,3-propandiol
3-HP - 3-hydroxypropionová kyselina
3-HPA -3-hydroxypropionaldehyd
ABA - Anaerobní bazální bujón
ADP - adenosindifosfát
ANI – průměrná nukleotidová identita (Average Nucleotide Identity)
ATP – adenosintrifosfát
BMK - bakterie mléčného kvašení
CCM - České sbírky mikroorganismů
CdA - *Clostridium difficile* agar
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DSM – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
FAO -Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture organization of the United Nations)
FOS - fruktooligosacharidy
G+C – guanin a cytosin
GIT - gastrointestinální trakt
GOS – galaktooligosacharidy
IgA –imunoglobulin A
MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)
MRS - De man, rogosa, sharpe
NAD⁺ - nikotinamidadeninukleotid
NADH - nikotinamidadeninukleotid
NEC - Nekrotizující enterokolitida
pH – potenciál vodíku (potential of hydrogen)
QS - Quorum sensing
Rpm – otáčky za minutu (revolutions per minute)
rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina
SCFA - kyselinou s krátkým řetězcem (short-chain fatty acid)
WHO - Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
WSP - Wilkins-chalgren agar

12 Samostatné přílohy

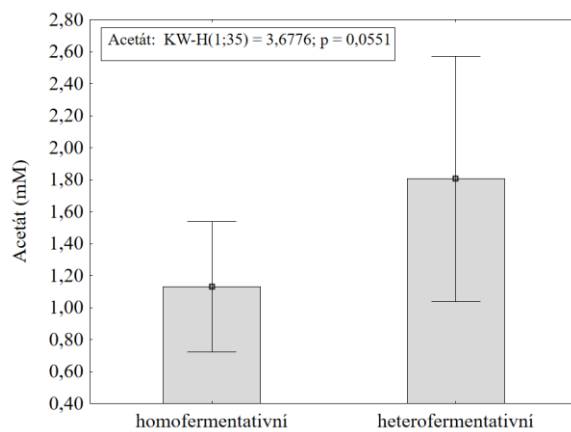
Tabulka 1: Naměřený laktát, acetát a formát v supernatantu laktobacilů.

druhová identita	kmen	ferementativní	Laktát	Acetát	Formát
			mM	mM	mM
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	L1/4	homo	26,93	0,02	1,77
	L6/6	homo	27,56	0,45	0,31
	MB 2/10	homo	23,89	1,21	0,00
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	L2/4	homo	24,11	0,18	3,84
	3/8a LBC 11	homo	20,85	1,16	3,96
	B/1 gynocaps	homo	21,26	1,14	2,48
	THT NUTRA BONA	homo	33,36	0,69	2,94
	1/4 ellen tampony	homo	27,22	0,97	3,21
	ML 2	homo	20,58	1,29	3,22
	70/5b	homo	26,77	1,28	3,36
	J13	homo	28,18	1,12	1,08
	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	ML 8/4	homo	33,40	nd
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ML 7/8	homo	28,44	2,53	3,37
	L6/1	homo	27,38	0,35	0,02
	X1	homo	30,35	0,83	nd
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NUTRA BONA	homo	22,04	nd	0,07
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	L6/11	homo	21,11	4,33	6,91
	L1/1	homo	29,14	0,62	1,24
	L9/12	homo	31,10	2,64	nd
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ML 7/7	homo	42,85	0,57	0,10
	1/1 ellen tampony	homo	35,80	1,72	0,16
	J33	homo	34,76	1,69	nd
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	LBC 77/2A	homo	32,61	0,19	nd
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	NUTRA BONA	homo	36,31	1,89	2,38
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	ML7/6	homo	30,81	1,41	3,70
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	L6/3	hetero	36,34	3,23	1,15
	L6/4	hetero	17,83	0,47	nd
	2/1 ellen tampony	hetero	28,47	1,41	nd
	L943/a	hetero	28,17	2,13	nd
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	3/10a WSP 17	hetero	41,81	2,35	4,83
	1/6b LBC 6	hetero	21,33	1,95	nd
	DSM 20016	hetero	32,10	3,35	nd
	LBC 78/2A	hetero	16,81	1,27	nd
	J37	hetero	29,17	1,88	nd
<i>Limosilactobacillus vaginalis</i>	L4/3b	hetero	25,87	nd	nd
<i>Lactobacillus faecium</i>	ML 6/5		39,11	2,82	5,50

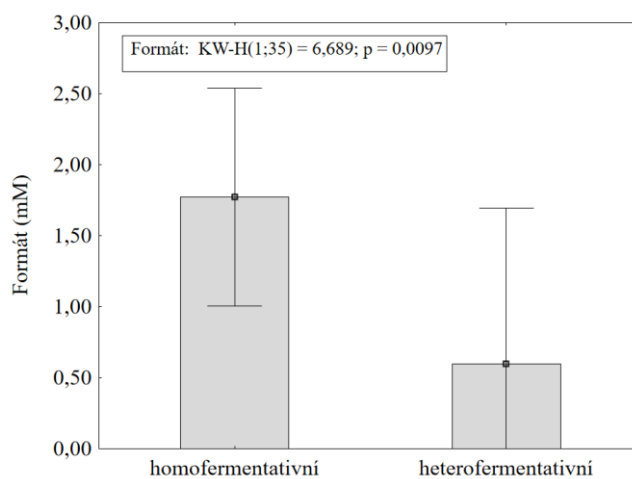
nd = nedetokováno



Obrázek 1: Hodnota laktátu. Bod na sloupci znázorňuje průměr s chybovými úsečkami (95 % konfidenční interval).



Obrázek 2: Hodnota acetátu. Bod na sloupci znázorňuje průměr s chybovými úsečkami (95 % konfidenční interval).



Obrázek 3: Hodnota formátu. Bod na sloupci znázorňuje průměr s chybovými úsečkami (95 % konfidenční interval).

Tabulka 2: Porovnání difúzní metody (vždy první sloupec, hodnoty uvedeny v mm) a SPOT testu (vždy druhý sloupec).

druhá identita	kód	CBUT					CLDIF				CNEO		CPER						CTER						
		C1	C2	C2	C3	C3	C5	C5	C6	C7	C8	C8	C9	C9	C10	C10	C11	C11	C12	C12	C15	C15	C16	C16	
<i>L. paracasei</i>	L1	6	-	6	+	6	*	7	+	8	7	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
	L2	6	+	6	-	6	*	9	-	7	8	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+
	L3	6	-	6	+	6	-	9	+	7	7	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+
<i>L. rhamnosus</i>	L4	6	-	6	-	6	+	9	+	7	8	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+	6	+
	L5	6	-	6	-	6	-	7	+	6	7	6	+	6	-	6	+	6	-	6	-	6	+	6	+
	L6	6	-	6	-	6	-	6	+	7	8	6	-	6	-	6	+	6	-	6	-	6	+	6	+
	L7	6	-	7	-	6	-	8	+	7	7	6	+	6	-	6	+	6	-	6	-	6	+	6	+
	L8	7	-	7	-	6	-	10	-	6	7	8	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
	L9	6	-	7	-	6	*	10	+	6	8	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
	L10	6	-	6	-	6	*	7	+	6	7	6	+	6	-	6	+	6	-	6	-	6	-	6	+
	L11	6	-	6	-	6	-	6	-	6	7	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
<i>L. paraplantarum</i>	L12	6	-	6	-	6	*	7	+	6	7	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
<i>L. plantarum</i>	L13	6	-	6	-	6	*	6	-	8	7	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
	L14	6	-	6	-	6	*	7	+	6	6	6	+	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+	6	-
<i>L. acidophilus</i>	L15	6	-	6	-	6	-	6	+	6	7	6	+	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+	6	+
	L16	6	-	6	-	6	+	6	+	6	6	6	-	6	+	6	-	6	-	6	-	6	+	6	+
<i>L. delbrueckii</i>	L17	6	-	6	-	6	-	6	-	7	7	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+
	L18	6	-	6	-	6	+	6	+	6	6	6	-	6	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6	+
	L19	6	-	6	-	6	-	6	-	6	7	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
<i>L. gasseri</i>	L20	6	-	6	-	6	-	8	+	6	8	6	-	6	-	6	+	6	+	6	+	6	+	6	+
	L21	6	-	6	+	6	-	8	+	6	7	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+
	L22	6	-	6	+	6	-	6	+	6	7	6	-	6	-	6	-	6	+	6	+	6	+	6	+
<i>L. ultunensis</i>	L23	6	-	6	-	6	-	6	-	6	6	6	-	6	-	6	-	6	+	6	-	6	+	6	+
<i>L. casei</i>	L24	6	-	6	-	6	-	6	+	6	6	6	+	6	-	6	+	6	-	6	-	6	-	6	+
<i>L. salivarius</i>	L25	6	-	6	-	6	-	10	-	6	8	8	+	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+	6	-
<i>L. fermentum</i>	L26	6	-	6	-	6	-	7	-	6	8	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
	L27	6	-	6	-	6	-	10	-	8	8	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
	L28	6	-	6	-	6	-	10	-	6	6	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+
	L29	6	-	6	-	6	-	6	-	6	6	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
<i>L. reuteri</i>	L30	6	-	6	-	6	-	11	-	6	7	6	-	6	-	6	-	6	+	6	-	6	-	6	-
	L31	10	*	10	*	12	*	13	*	12	10	8	*	6	*	6	*	6	*	6	*	6	*	6	*
	L32	6	-	7	-	6	-	8	-	7	7	7	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	+	6	-
	L33	13	*	9	*	13	*	15	*	10	10	12	*	6	*	6	*	6	*	6	*	6	*	6	*
	L34	11	*	8	*	12	*	12	-	10	10	8	*	6	*	6	-	6	-	6	-	6	*	6	+
<i>L. vaginalis</i>	L35	6	-	6	-	6	-	6	-	6	6	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-
<i>L. faecium</i>	L36	6	-	6	-	6	-	7	-	7	7	6	-	6	-	6	-	6	+	6	-	6	-	6	-