

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky (FAPPZ)



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Testování antimikrobiální aktivity vybraných zástupců
rodu *Bifidobacterium* proti patogenním streptokokům
a laktokokům**

Bakalářská práce

Linda Roudenská

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Testování antimikrobiální aktivity vybraných zástupců rodu *Bifidobacterium* proti patogenním streptokokům a laktokokům" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Věry Neužil Bunešové, Ph.D., s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů. Zdroje jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za čas a trpělivost, kterou mi věnovala, za poskytnutí potřebné literatury, cenných rad a celkové vedení mé práce. Díky ní jsem se obohatila o nové zkušenosti a více poznala práci v laboratořích. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali v laboratoři s mou experimentální prací, zejména pak Ing. Nikol Modráčkové a Ing. Kristýně Horváthové.

Testování antimikrobiální aktivity vybraných zástupců rodu *Bifidobacterium* proti patogenním streptokokům a laktokokům

Souhrn

Je známo, že bifidobakterie dokáží produkovat antimikrobiální látky, které mají schopnost inhibovat nebo zpomalovat růst patogenních mikroorganismů. Bakalářská práce byla zaměřena na testování antimikrobiální aktivity, dále na rod *Bifidobacterium* a jeho antimikrobiální potenciál a na patogenitu vybraných laktokoků a streptokoků. Cílem experimentální části bylo nalézt bifidobakteriální kmeny, které by působily proti potenciálně patogenním kmenům laktokoků a streptokoků a potvrdit tak předpoklad, že bifidobakterie mohou regulovat patogenní účinek zmíněných koků. Celkem bylo otestováno 77 bifidobakteriálních kmenů, z nichž bylo 71 původně izolovaných z fekálních vzorků tamarinů, přesněji lvíčků zlatých (*Leontopithecus rosalia*) ze ZOO Olomouc. Tato skupina primátů z čeledi kosmanovitých (*Callithrichidae*) však neměla žádné zjevné zdravotní obtíže, i když u nich byla detekována také přítomnost laktokoků produkujících pigment granadaene. Zbývajících 6 izolátů pocházelo ze stolice lidských hostitelů nebo probiotických potravin. Dále byly použity jako kontrola i jiné látky, u kterých se předpokládala antimikrobiální aktivita. Jednalo se například o vzorek mateřského mléka a mleziva, lysozymu a antibiotikum mupirocin. K testování antimikrobiální aktivity vybraných bifidobakterií vůči laktokokům ($n=10$; například *Lactococcus garvieae*, *L. formosensis*, *L. petauri*) a streptokokům ($n=3$; *Streptococcus agalactiae*) bylo použito testování *in vitro*, kde byla aplikována difúzní desková metoda a dále různé modifikace spotové metody.

Překvapivě časté pozitivní výsledky byly zaznamenány u spotové metody a jejích modifikací. Prostřednictvím spotové metody bifidobakterie inhibovaly růst laktokoků i streptokoků, navíc nedocházelo k produkci pigmentu granadaene. V případě difúzní metody se výsledek nepotvrdil. Čerstvá kultura, supernatant ani další testované látky nevytvořily inhibiční zónu. Jako kontrola byl použit mupirocin, kde byl zaznamenán pozitivní výsledek.

Lze tedy konstatovat, že bifidobakterie vykazují za určitých podmínek antimikrobiální aktivitu vůči potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům. Nové trendy v potravinářství související s konzumací hmyzu, mohou nést i některá rizika infekcí. Antimikrobiální aktivita bifidobakterií a aplikace probiotik by mohla vést k regulaci potenciálně patogenních koků. Uvedené metody testování je třeba více optimalizovat a zjistit princip detekovaného účinku.

Klíčová slova: Antimikrobiální aktivita, probiotikum, bifidobakterie, *Streptococcus agalactiae*, granadaene, *Lactococcus* spp., patogen.

Testing the antimicrobial activity of selected representatives of the genus *Bifidobacterium* against pathogenic streptococci and lactococci

Summary

It is known that bifidobacteria can produce antimicrobial substances that have the ability to inhibit or slow the growth of pathogenic microorganisms. The bachelor thesis was focused on testing the antimicrobial activity in bifidobacteria to find bifidobacterial strains that would act against potentially pathogenic strains of lactococci and streptococci. A total of 77 bifidobacterial strains were tested, 71 of which were originally isolated from faecal samples of tamarins, more precisely golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*) from Olomouc Zoo. However, this group of *Callithrichidae* primates had no apparent health problems, although the presence of granadaene pigment-producing lactococci was also detected. The remaining 6 isolates were from the faeces of human hosts or probiotic foods. In addition, other substances with an expected antimicrobial activity were used as controls. These included a sample of breast milk, colostrum, lysozyme and antibiotic mupirocin. To test the antimicrobial activity of the selected bifidobacteria against lactococci (n=10; e.g. *Lactococcus garvieae*, *L. formosensis*, *L. petauri*) and streptococci (n=3; *Streptococcus agalactiae*), *in vitro* testing using the diffusion plate method, as well as various modifications of the spot method were used.

Surprisingly frequent positive results were recorded for the spot method and its modifications. Through the spot method, bifidobacteria inhibited the growth of both lactococci and streptococci, and there was no production of the pigment granadaene. In the case of the diffusion method, the result was not confirmed. The fresh culture, the supernatant, and the other substances tested did not form an inhibition zone. Mupirocin was used as a control, and a positive result was recorded.

Bifidobacteria show antimicrobial activity against potentially pathogenic lactococci and streptococci under certain conditions. New food trends with insect consumption may also carry some risks of infections. The antimicrobial activity of bifidobacteria and the application of probiotics could lead to the regulation of potentially pathogenic cocci. These used methods need to be further optimised, and the principle of the detected effect needs to be established.

Keywords: Antimicrobial activity, probiotic, bifidobacteria, *Streptococcus agalactiae*, granadaene, *Lactococcus* spp., pathogen.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce	9
3	Hypotéza.....	10
4	Literární rešerše	11
4.1	Antimikrobiální aktivita bakterií.....	11
4.2	Možnosti testování antimikrobiální aktivity	12
4.2.1	Difúzní deskové metody	12
4.2.2	Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) – bioautografie	14
4.2.3	Diluční metody	15
4.2.4	Time-kill test (time-kill křivka)	16
4.2.5	Bioluminiscenční test.....	17
4.3	Prospěšné vs patogenní bakterie	18
4.4	Rod <i>Bifidobacterium</i>	20
4.4.1	Taxonomická klasifikace	20
4.4.2	Morfologie a fyziologie	21
4.4.3	Metabolismus.....	21
4.4.4	Výskyt a druhové zastoupení.....	21
4.4.5	Antimikrobiální aktivita bifidobakterií.....	21
4.5	Rod <i>Lactococcus</i>	23
4.5.1	Taxonomická klasifikace	23
4.5.2	<i>Lactococcus garvieae</i>	24
4.5.3	<i>Lactococcus petauri</i>	24
4.5.4	<i>Lactococcus formosensis</i>	24
4.5.5	<i>Lactococcus lactis</i>	24
4.6	Rod <i>Streptococcus</i>	25
4.6.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	25
5	Metodika	26
5.1	Pracovní postup	30
5.1.1	Příprava kultivačních médií	30
5.1.2	Příprava kmenů pro testování	31
5.1.3	Kontrola čistoty kultur	31
5.1.4	Příprava supernatantů bifidobakterií pro difúzní metodu.....	33
5.2	Testování pomocí deskové difúzní metody.....	33
5.3	Testování pomocí spotové metody	34
6	Výsledky	38
6.1	Difúzní desková metoda.....	38

6.2	Spotová metoda a její modifikace	39
7	Diskuze	42
8	Závěr.....	44
9	Seznam použité literatury	45

1 Úvod

Bifidobakterie patří mezi komenzální bakterie vyskytující se především v trávicím traktu lidí a zvířat, kde napomáhají udržovat rovnováhu střevní mikrobioty a příznivě tak ovlivňují zdraví svého hostitele. Jsou to anaerobní bakterie, poprvé byly izolovány v roce 1900 a specifickou vlastností jejich metabolismu je tvorba acetátu a laktátu v poměru 2:1 (Servin 2004). Mimoto u nich byla popsána také tvorba dalších kyselin a antimikrobiálních látek, jako jsou například bakteriociny. Díky jejich antimikrobiálním vlastnostem dokáží v těle vytvořit rovnováhu a bránit tělo proti patogenním bakteriím. Řadíme je mezi probiotické taxony bakterií. Můžeme je přijímat potravou, například fermentovanými mléčnými výrobky nebo výživovými doplňky. Obecně se doporučuje užívat probiotika při a po léčbě antibiotiky (Abrahamsson et al. 2015).

Mezi zástupce rodů *Streptococcus* a *Lactococcus* patří také druhy či kmeny s prokázanou patogenní aktivitou, jako jsou například zástupci druhů *Streptococcus agalactiae* a *Lactococcus garvieae*. Jejich výskyt je velmi variabilní a jsou součástí mikrobioty trávicího traktu člověka či vaginálního ústrojí žen. Tyto rody byly detekované u hospodářských zvířat a živočišných produktů či v akvakulturách (Robinson et al. 1999).

Rod *Lactococcus* se řadí do skupiny bakterií mléčného kvašení, jejich hlavním produktem je tedy kyselina mléčná. Patří sem *Lactococcus lactis*, který je hojně využíván při výrobě sýrů (Song et al. 2017). Jsou zde však i potenciálně patogenní druhy *Lactococcus petauri*, *Lactococcus formosensis* a *Lactococcus garvieae*. Tyto druhy napadají zejména žábry ryb, jsou součástí mastitid nebo onemocnění primátů (Chao et al. 2013).

Rod *Streptococcus* je také částečně patogenní. Přestože se jedná o bakterie běžně se vyskytující v lidském těle, zejména v gastrointestinálním a urogenitálním traktu, mohou některé z nich způsobovat řadu krevních onemocnění, meningitidy a bakteriální pneumonie. Například *Streptococcus agalactiae* patří do skupiny grampozitivních, β – hemolytických koků třídy B (GBS) (Krzyściak et al. 2013).

V rámci této bakalářské práce byly vybrané kmeny laktokoků a streptokoků použity jako potenciální patogeny a vůči nim byla testována antimikrobiální aktivita bifidobakterií s cílem najít bifidobakterie inhibující růst těchto potenciálních patogenů. V průběhu experimentální práce byly navíc metody testování antimikrobiální aktivity optimalizovány.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo zpracovat přehled, týkající se problematiky antimikrobiální aktivity a charakteristiky testovaných bifidobakterií vůči potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům. V experimentální části poté ověřit antimikrobiální aktivitu vybraných izolátů bifidobakterií pomocí difúzní a spotové metody a vyzkoušet různé modifikace metod tak, aby vedly k optimalizaci celé experimentální části.

3 Hypotéza

Pro splnění cíle bakalářské práce byla stanovena hypotéza, která předpokládala, že se u testovaných zástupců rodu *Bifidobacterium* vůči patogenním kmenům *Lactococcus* spp. a *Streptococcus agalactiae* projeví antimikrobiální aktivita inhibující růst těchto patogenů.

4 Literární rešerše

4.1 Antimikrobiální aktivita bakterií

Antimikrobiální působení je součástí metabolismu některých druhů bakterií. Antimikrobiální aktivitou získáváme nové poznatky pro epidemiologické a terapeutické výsledky. Jedná se například o oblast farmacie (Balouiri et al. 2016).

Pojem antimikrobiální znamená působení proti mikroorganismům, tedy proti bakteriím, houbám a virům. Bakteriostatický je takový účinek, který působí na množení bakterií či jiných mikroorganismů a inhibuje jejich růst. Oproti tomu účinek baktericidní je účinek, který jednotlivé buňky zabíjí. Takového účinku dosahují antibiotika či jiné chemické látky.

O přežití v daném prostředí musí mikroorganismy soutěžit, což vede k interakcím, které definují jejich vzájemné vztahy. Pokud mezi sebou mikroorganismy soupeří, jedná se antagonismus. Mezi nejčastější vztah dvou druhů mikroorganismů patří symbióza. Dle výskytu se jedná o ektosymbiózu (mikroorganismy se nacházejí na povrchu) anebo endosymbiózu (jeden mikroorganismus žije v druhém). Dalším druhem symbiózy může být komenzalismus, kdy jeden mikroorganismus je prospěšný pro druhý, druhému nic nepřináší, ale zároveň mu neškodí. Vztah, který je prospěšný pro oba mikroorganismy, se nazývá mutualismus. Naopak parazitismus je vztah, kdy jeden organismus poškozuje druhý organismus, například pro svou obživu. Můžeme tedy říci, že se jedná o patogenitu. Patogenitu určují vlastnosti a druh hostitele. Míra patogenity daného mikroorganismu se nazývá virulence (Göpfertová 1999).

Mikroorganismy jsou schopné produkovat sekundární nebo primární metabolity, které dokáží pozastavit rozmnožování či přímo inhibovat jiný druh mikroorganismů. Metabolity jsou produkovány metabolismem, což je komplex složitých biochemických dějů. Katabolismus je děj, při kterém se energie produkuje rozkládáním složitějších živin na látky jednodušší. Antimikrobiální látky, které vzniknou díky katabolismu, se nazývají primární metabolity a mohou vznikat v průběhu celého života mikroorganismu. Anabolismus je děj, při kterém se energie spotřebovává syntézou složitějších látek. Při anabolismu vznikají sekundární antimikrobiální látky, ale pouze při nějakém podnětu či ve specifickém období života, například pokud je mikroorganismus vystaven stresu. Každá látka vyprodukovaná mikroorganismy má specifické složení a jinak reaguje na své konkurenty. Většinou se jedná o organické kyseliny nebo bakteriociny (Luckner 1984).

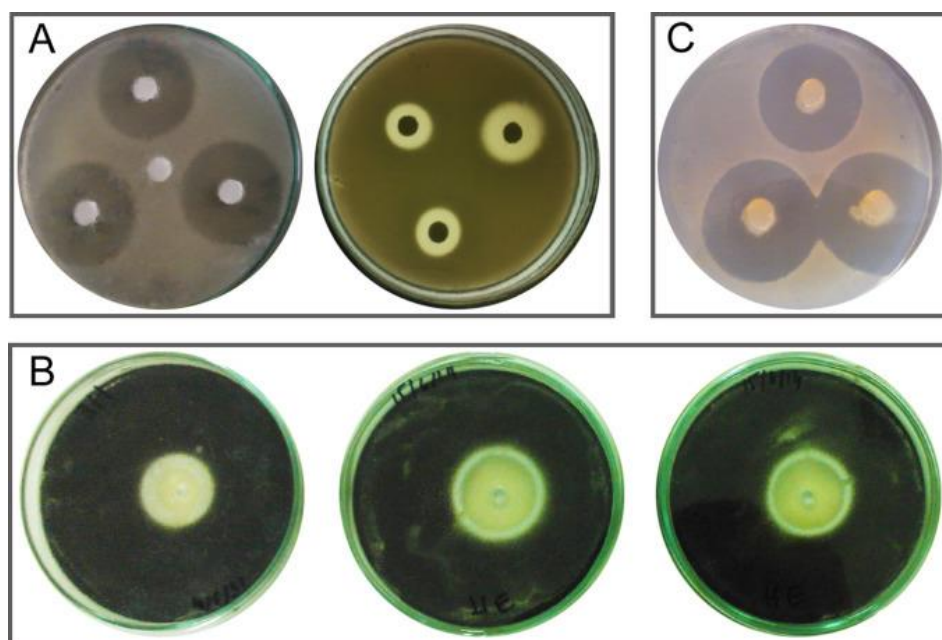
V současné době je známo přes 5000 peptidů s antimikrobiální aktivitou, které byly izolovány z různých biologických druhů. Mají podobnou cyklickou strukturu molekul a jsou dlouhé do 100 aminokyselin (AMK). Specifický receptor je vázán na antimikrobiální aktivitu nebo je tato aktivita zprostředkována elektrostatickou interakcí mezi peptidem a buněčnou stěnou (Snyder & Worobo 2014).

4.2 Možnosti testování antimikrobiální aktivity

V klinické praxi či na experimentální úrovni je testování antimikrobiální aktivity a analyzování nových antimikrobiálních látek velmi časté. Pro testování lze volit z více metod, které jsou níže popsány.

4.2.1 Difúzní deskové metody

Agarová difúzní disková metoda je nejčastěji používanou metodou v mnoha laboratořích pro testování antimikrobiální citlivosti. Pomocí antibiogramu lze získat kvalitativní výsledky. Antibiogram rozděluje bakterie do různých kategorií, nejčastěji jako citlivé, středně citlivé nebo rezistentní. Výsledky vedou lékaře k vhodnému výběru antibiotik při počáteční léčbě u jednotlivých pacientů.



Obrázek č. 1 Metody agarové difúze: (A) disková difúzní metoda mikrobiálního extraktu s použitím *Candida albicans* jako testovacího mikroorganismu, (B) metoda agarové jamkové difúze esenciálního oleje s použitím *Aspergillus niger* jako testovacího mikroorganismu a (C) agarová zátková difúze (testován *Bacillus sp.* proti *C. albicans*) (Balouiri et al. 2016).

Antimikrobiální gradientová metoda (E – test)

Je metoda, která kombinuje princip dilučních metod s difúzními. Na agar s předem kultivovanou bakterií, která má potenciálně antimikrobiální vlastnosti, se naočkuje patogenní bakterie. E – test (Obrázek č. 2) je pruh speciálního papíru napuštěného antibiotikem, který se aplikuje na kultivovaný agar. E – testem se stanoví minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik, antimykotik a antimykobakterií, které je možné odečíst z inhibičních zón kolem E–testu (Balouiri et al. 2016).



Obrázek č. 2 Antimikrobiální gradientová metoda E – test (Jorgensen & Ferraro 2009).

Agarová jamková difúzní metoda

Má časté využití k analyzování antimikrobiální aktivity ze vzorků rostlin či mikroorganismů. Antimikrobiální činidlo prostupuje do agarového média a inhibuje růst testovaného mikrobiálního kmene. Důležité je zvolit správné živné médium, čas a teplotu inkubace. Pokud je pokus úspěšný, lze odečíst inhibiční zóny, tedy místa, kde došlo k potlačení růstu bakterií dalšími testovanými bakteriemi s antimikrobiální aktivitou (Kumar et al. 2010).

Metoda agarové zátky

Často používaná metoda ke zvýraznění interakcí mezi mikroorganismy. V průběhu svého růstu produkují mikrobiální buňky molekuly, které prostupují do agaru. Po inkubaci se agar nařízne a vloží se na povrch agaru v jiné misce, který je předem naočkován testovaným mikroorganismem. Antimikrobiální aktivita se poté stanoví dle inhibičních zón, které se nacházejí v oblasti agarové zátky – kolem vloženého agaru (Bezoušková 2019).

Spotová metoda

Další velmi využívanou metodou je spotová metoda. Principem této metody je nanesení určitého množství inokula – spotu čerstvě kultivovaného mikroorganismu (s potenciálem inhibiční aktivity) na agar a následně probíhá kultivace. Dále je narostlý mikroorganismus převrstven agarem, ve kterém je zaočkovaný patogen. Po inkubaci se hodnotí případný vznik inhibiční zóny (Monteiro et al. 2019).

Metoda Cross streak

Metodou se analyzují interakce mezi dvěma neslučitelnými mikroorganismy. Zkoušený mikroorganismus je očkovan pruhem do středu agarové plotny. Následně se provede inkubace a poté se naočkuje další testovaný mikroorganismus. Očkuje se dalším pruhem, který je kolmý na první pruh ve středu misky. Provede se další inkubace a vyhodnotí se antimikrobiální interakce dle inhibičních zón (Kyselá 2019).

Metoda otráveného jídla

Pomocí této metody se hodnotí účinek proti plísním a houbám. Antifungální činidlo se aplikuje do rozpuštěného agaru v dané koncentraci a vše se smíchá. Očkování lze provést po inkubaci myceliovým diskem o průměru 2 až 5 mm (Kyselá 2019). Disk se aplikuje do středu destičky. Následuje další inkubace za vhodných podmínek a poté se měří průměry růstu plísní na kontrolních a vzorkových miskách (Krishnan et al. 2019).

4.2.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) – bioautografie

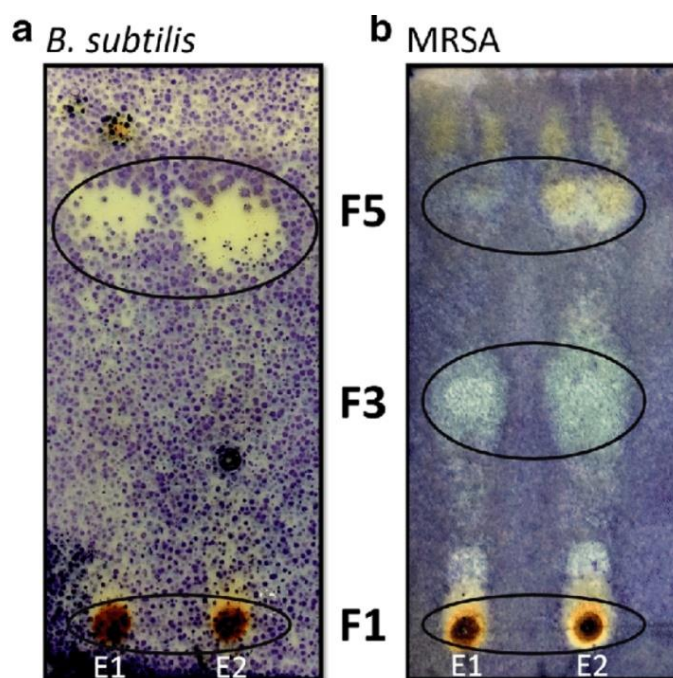
Tato metoda využívá kombinace papírové chromatografie (PC) s kontaktní bioautografií k detekci různých penicilinů. Kombinuje se tedy TLC s biologickými a chemickými detekčními metodami (Obrázek č. 3). Velkou výhodou je možnost rychlého testování velkého množství vzorků. Uvedenou metodou lze zjišťovat přítomnost antimikrobiálních látek ve vzorcích potravin, případně také v enviromentálních vzorcích. Další výhodou je účinnost a levná technika, kterou lze využít i v malých laboratořích s minimem potřebného vybavení. Metoda je rovněž vhodná pro vyhledávání nových antimikrobiálních léků.

Byly popsány tři bioautografické techniky – agarová difúze, přímá bioautografie a agar overaly test.

Agarová difúze – známá též jako agarová kontaktní metoda, nejméně používaná technika.

Přímá bioautografie – nejpoužívanější metoda z uvedených tří metod bioautografie. Na TLC vrstvu je aplikován vzorek analyzovaného mikroorganismu a následně proběhne inkubace s teplotou a časem vhodným pro daný mikroorganismus. Pro lepší zvýraznění růstu se používají tetrazoliové soli.

Agar overlay test (test přelévání agarem) – jedná se o kombinaci dvou výše uvedených metod, někdy je tato metoda označována jako imerzní bioautografie. Poskytuje dobře definované zóny inhibice růstu (Balouiri et al. 2016).



Obrázek č. 3 Bioautografický test se dvěma extrakty (E1 a E2) z bujónu různých kultur *Vibrio* sp. tečkovaný na každé TLC destičce a) proti *Bacillus subtilis*, b) proti *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Conde-Martínez et al. 2017).

4.2.3 Diluční metody

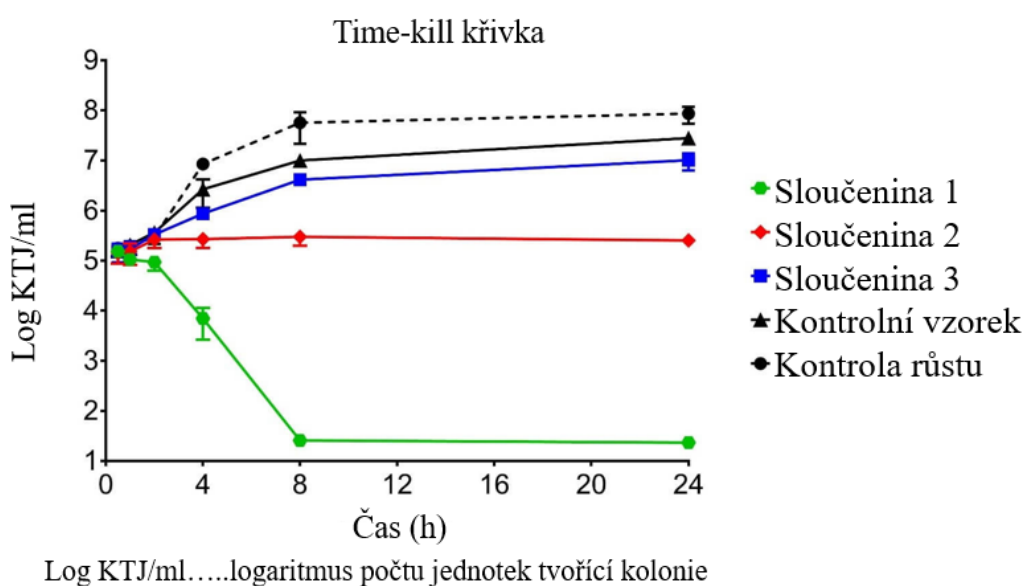
Těmito metodami se stanovují hodnoty MIC. Pomocí nich lze odhadnout koncentraci testovaného antimikrobiálního činidla v agaru nebo bujónu. Koncovým bodem MIC se zaznamená nejnižší koncentrace antimikrobiálního činidla (Vrbová 2020). Metodou ředění bujónu či agaru lze kvantitativně měřit *in vitro* antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím i plísním. Naměřená hodnota MIC udává nejnižší koncentraci testovaného antimikrobiálního činidla, které inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu. Nejčastěji se vyjadřuje v mg/ml nebo mg/l (Kyselá 2019).

Metoda ředění bujónu – jedná se o základní metodu testování antimikrobiální citlivosti. Nejprve se připraví sériová ředění antimikrobiálního činidla. Ta se následně naočkují do sterilních zkumavek, kde se nacházejí testované bakterie nebo plísně o známém počtu. Následně se zkumavky inkubují při určité teplotě a poté se vyhodnotí.

Metoda ředění agaru – je vhodná pro testování citlivosti na antibakteriální i antifungální látky. Tato metoda se provádí v Petriho miskách s možností testování několika mikroorganismů na každé misce, po inkubaci se test vyhodnotí a stanoví se MIC (Lee et al. 2017).

4.2.4 Time-kill test (time-kill křivka)

Time-kill test se používá jako jedna z metod určování antimikrobiální aktivity a též k určení dezinfekčního účinku. Time-kill testem lze stanovit také baktericidní nebo fungicidní účinek. Tím se vyhodnotí redukce mikrobiálních kmenů za určitý čas a při určité koncentraci (například dezinfekční látky) (Bezoušková 2019). Jako výsledek se považuje informace o interakcích mezi antimikrobiální látkou a mikrobiálním kmenem. Ke srovnání výsledků se použije nulový (kontrolní) vzorek bez přidání dezinfekční látky a kontrola růstu. Po určitém čase a koncentraci se spočítají kolonie. Následně se vypočítá procentuální nebo logaritmická redukce (Balouiri et al. 2016).



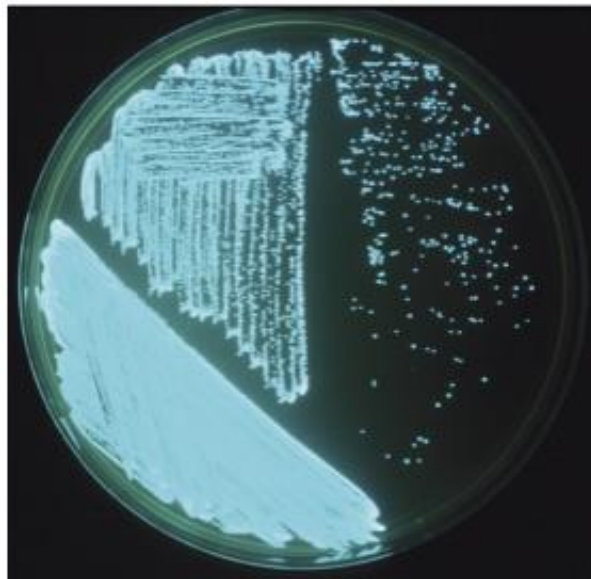
Obrázek č. 4 Ukázka Time-kill křivky – závislost koncentrace na čase, upraveno dle Clinical & Laboratory Standards Institute CLSI (1999).

Tři různé testované sloučeniny jsou přidány do média obsahujícího výchozí testovanou kulturu bakterií (Obrázek č. 4). Log KTJ/ml se pro všechny skupiny stanoví v čase 0 a v následujících časových bodech až do 24 hodin v závislosti na kmeni bakterií a použitém médiu. V tomto případě vykazovala sloučenina 1 baktericidní účinek a snížila počáteční log KTJ/ml o více než 3 log.

Sloučenina 2 vykazovala bakteriostatický účinek, protože logaritmus KTJ/ml v průběhu času zůstal přibližně podobný jako logaritmus v počátku KTJ/ml. Třetí sloučenina vykazovala antimikrobiální účinek menší. Bakterie v této sloučenině rostly v úrovni, která byla podobná kontrolnímu vzorku.

4.2.5 Bioluminiscenční test

Principem bioluminiscenčního testu je měření kapacity adenosintrifosfátu (ATP) produkovaného bakteriemi nebo houbami (Obrázek č. 5). ATP je energetická forma všech živých buněk, která je přítomna víceméně ve stálém množství. Pomocí určeného množství ATP můžeme odhadnout mikrobiální kmen ve vzorcích. Využívá se i pro antibakteriální a antimykobakteriální testování (Kyselá 2019). Bioluminiscence se využívá v mnoha odvětvích lékařství, v biologickém a také v kosmickém výzkumu. Principem je bioluminiscence, kterou vyvolává oxidace luciferinů za přítomnosti kyslíku. Aby tento proces mohl proběhnout, je zapotřebí přítomnost luciferinu, luciferázy, ATP a hořčnatých iontů. Bioluminiscenční test je spolehlivý (Balouiri et al. 2016).

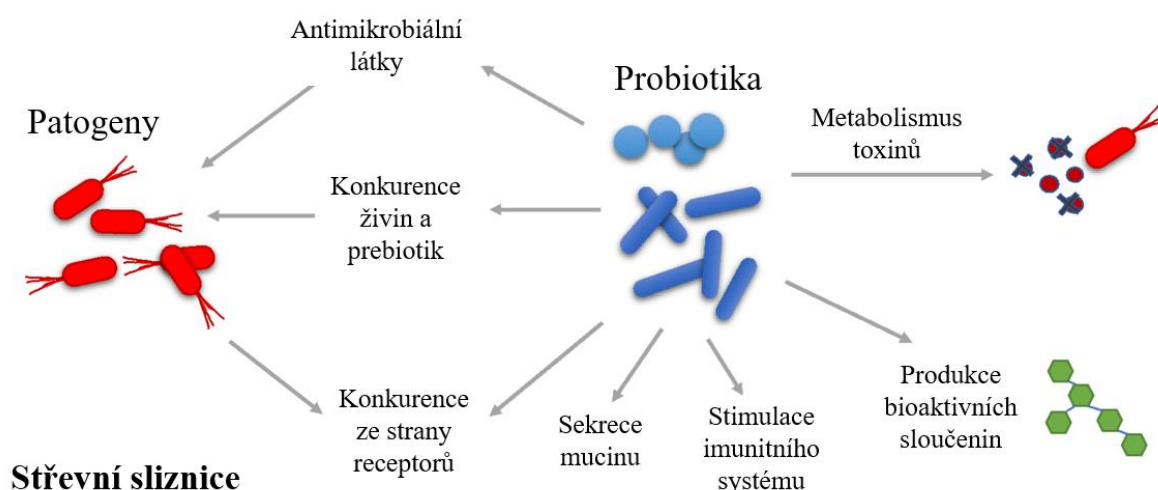


Obrázek č. 5 Bioluminiscenční test *Photobacterium leiognathi* (Urbanczyk et al. 2010).

4.3 Prospěšné vs patogenní bakterie

Bakterie rozlišujeme podle vztahu s jejich hostitelem na patogenní (nepříznivé pro hostitele), symbiotické (navzájem jsou si prospěšné) a navzájem se neovlivňující. Nevhodným prostředím je kůže, kde dochází k vysychání, zde se tedy bakterie špatně množí.

Gastrointestinální trakt (GIT) je dynamický mikroekosystém. Hojně osídleným prostředím jsou ústa a nosohltan, kde se vyskytují jak nepatogenní, tak patogenní bakterie jako stafylokoky, mikrokoky a streptokoky. Počty bakterií stoupají kaudálním směrem v gastrointestinálním traktu. V každé jeho části mají vliv na počet bakterií procesy, které zde probíhají. V žaludku je pH kolem 1,5-3,5, ale i přesto zde žijí acidofilní streptokoky a laktobacily. Musíme vzít v úvahu, že žaludek není téměř nikdy prázdný a s příjmem potravy se zvyšuje pH žaludku zhruba na 5. Dále se bakterie vyskytují hlavně ve střevech, kde pomáhají s trávením (Kittnar 2011). Nejvíce bakterií se nachází v tenkém střevě. Ačkoliv je mikrobiota člověka stabilní, má na ni vliv například léčba antibiotiky nebo užívání léků. Střevní mikrobiota je charakteristická svojí bohatostí, dle nových studií se uvádí, že se v GIT nachází kolem 4930 mikrobiálních druhů, což odpovídá více než 100 bilionům mikrobiálních buněk (Almeida et al. 2021).



Obrázek č. 6 Mechanismy účinku probiotik ve střevní sliznici, upraveno dle Coelho et al. (2022).

Významnými zástupci symbiontů střevní mikroflóry jsou probiotické bakterie, které příznivě působí na trávení, ale podle nových studií rovněž na chování člověka.

Slovo probiotikum je běžně užívané a zároveň se jedná o uznávaný termín, který je jasně definován. Světová zdravotnická organizace (WHO) a Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) používají definici „živé mikroorganismy, které jsou podávány v přiměřeném množství a prospívají hostiteli“ (Hill et al. 2014).

Příznivé působení probiotik na imunitní systém ovlivňuje celá řada prvků. Působí na ně i prebiotika neboli nestravitelné části potravy. Většinou se jedná o oligosacharidy.

Poprvé byla prebiotika lépe specifikována Glennem Gibsonem a Marcelem Roberfroidem v roce 1995. Střevní bakterie fermentují tyto nestravitelné látky a tím získávají energii pro přežití (Gibson et al. 2004).

Střevní bariéra pomáhá chránit integritu střevního epitelu hostitele. Navíc probiotické bakterie působí na imunitní systém (Obrázek č. 6). Probiotika vyvolávají interakce mezi lymfocyty a makrofágy (Bermudez-Brito et al. 2012). Probiotika také zlepšují průběh u syndromu dráždivého tračníku při orálním podání kmene *Bacillus coagulans*. Zlepšení se také zaznamenalo u pacientů s laktózovou intolerancí při zvýšené konzumaci probiotického přípravku obsahujícího *Lactobacillus casei* Shirota a *Bifidobacterium breve* Yakult. Tyto pozitivní výsledky by mohly souviset s β -galaktosidázovou aktivitou a změnami ve střevní mikroflóře (Almeida et al. 2021).

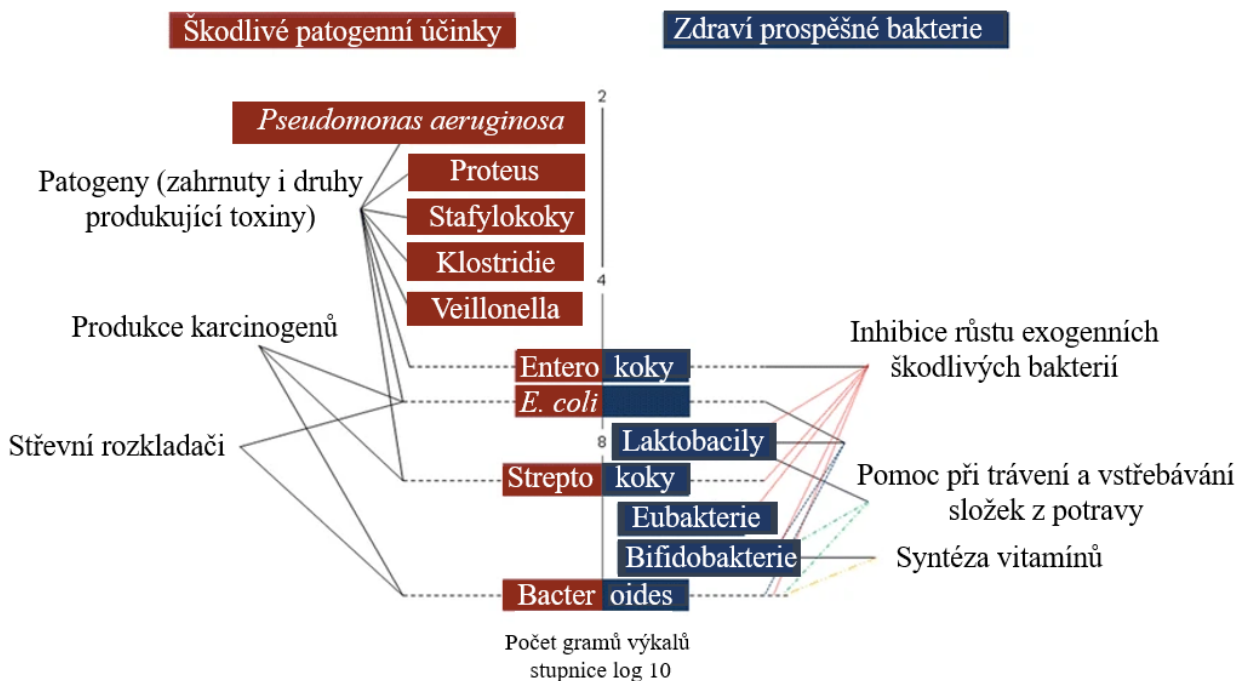
Některé probiotické kmeny mají schopnost tvořit konjugované žlučové kyseliny a díky tomu vytvářejí silnou antimikrobiální aktivitu. Tímto dokáží inhibovat některé druhy plísní a gramnegativních bakterií (Bermudez-Brito et al. 2012).

Složení mikrobioty se liší na základě přijímané stravy a expozice prostředí působící na jedince. Svou roli mají i genetické předpoklady a složení mikrobioty matky. Vývoj dětské mikrobioty střeva je ovlivněn mateřským mlékem, které obsahuje laktoferin. Laktoferin je glykoprotein, složený z aminokyselin a z cukerné složky. Má antimikrobiální antioxidantní účinky, takže upravuje složení mikrobioty v dětském střevě. Navíc má příznivé účinky na růst bifidobakterií. Střevo je osidlováno bakteriemi již před narozením jedince. Dle nových výzkumů se uvádí, že i v plodové vodě se nacházejí bakterie zejména čeledi *Enterobacteriaceae*. Samotný porod má vliv na osídlení střev novorozence. Pokud je porod císařským řezem, je větší předpoklad vzniku autoimunitních onemocnění, například astmatu. Také bylo zjištěno, že probiotické bakterie mají vliv i na vznik alergií (Abrahamsson et al. 2015).

Escherichia coli, jakožto taxon čeledi *Enterobacteriaceae*, se nachází v tlustém střevě a je prospěšná při kvašení cukrů či tvorbě vitaminů skupiny B. Ve vodě je indikátorem fekálního znečištění, tvoří třetinu hmotnosti fekálií (Lata & Juránková 2011). Mezi zástupci druhu *E. coli* najdeme komenzální i vysoce patogenní kmeny. *E. coli* může způsobit různé infekce – mykózy, průjmová onemocnění, záněty močových cest. K prospěšným kmenům patří například *E. coli* Nissle, tento kmen se osvědčil při léčbě zánětlivých onemocnění střev (Johnson & Russo 2002).

Dalším hojně se vyskytujícím rodem v gastrointestinálním traktu jsou streptokoky. Tento rod se vyskytuje i na kůži, v horních dýchacích cestách a v normální mikrobiotě vaginální soustavy žen. Také jsou součástí mlékařských kultur. Najdeme zde ale také patogenní druhy. *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* mohou způsobit respirační i zánětlivá onemocnění a snadno si vytvářejí rezistenci na antibiotika (Baron 1996).

Také rod *Lactococcus* se hojně vyskytuje v gastrointestinálním traktu. Tento rod je homofermentativní a v průmyslu se využívá k produkci kyseliny mléčné. U teplokrevných savců nezpůsobuje závažná onemocnění, ale u nižších druhů (například u ryb) může způsobit chronická onemocnění (Teuber 1995). Ukázka rozdělení některých rodů a druhů z pohledu prospěšnosti a škodlivosti hostiteli je uvedena na Obrázku č. 7.



Obrázek č. 7 Rozdělení bakterií, které mohou vést buď ke škodlivým nebo k prospěšným účinkům, upraveno dle De Almada et al. (2015).

4.4 Rod *Bifidobacterium*

Bakterie rodu *Bifidobacterium* byla poprvé izolována Henry Tissierem v Pasteurově institutu ve Francii v roce 1900. Jednalo se o izolát ze stolice kojence. Prvně byla pojmenována jako *Bacillus bifidus*. Až do roku 1974 byly bifidobakterie řazeny kvůli jejich podobnosti mezi laktobacily. Poté byly uvedeny jako oddělený rod obsahující 11 druhů. Kmeny *Bifidobacterium* jsou schopné antimikrobiální aktivity a tím inhibují růst některých bakterií včetně multirezistentních bakterií. Kromě toho dokáží bifidobakterie modulovat imunitní systém zvýšením imunoglobulinů (Ruiz et al. 2017).

4.4.1 Taxonomická klasifikace

Bifidobakterie patří do domény Bacteria, oddělení Firmicutes, kmen Actinobacteria, třída Actinobacteria, řád Bifidobacteriales, čeleď *Bifidobacteriaceae*, rod *Bifidobacterium* (*B.*). V roce 2021 se v tomto rodě nacházelo 117 druhů bifidobakterií a toto číslo stále roste. Patří sem například:

B. adolescentis, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. ruminale*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. stercoris*, *B. subtilis*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* (Lim & Shin 2021).

4.4.2 Morfologie a fyziologie

Bifidobakterie jsou nepohyblivé, nesporulující, grampozitivní tyčinky. Žijí jednotlivě, v řetězcích či ve shlucích. Jsou převážně anaerobní a kataláza negativní. Kolonie bifidobakterií jsou bílé až nažloutlé. Optimální teplota pro růst těchto bakterií je okolo 37-39 °C. Optimální pH je 6–7, při nižším či vyšším pH přestávají bakterie růst (Bottacini et al. 2014).

4.4.3 Metabolismus

Bifidobakterie jsou schopné fermentovat sacharidy za vzniku kyseliny mléčné a kyseliny octové v poměru 1:2, jsou heterofermentativní. Tímto způsobem potlačují růst patogenních mikroorganismů a zajišťují tak správnou mikrobiotu. Pomocí enzymu fruktóza-6-fosfátfosfoketolázou se z glukózy nakonec stává fosfát a acetát (Mayo & Sinderen 2010). Tímto mechanismem dokáží fermentovat sacharidy a u potravin zároveň prodlužovat trvanlivost výrobků. Bifidobakterie také produkují thiamin a laktoflavin (Delgado et al. 2019).

4.4.4 Výskyt a druhové zastoupení

Přirozeně se bifidobakterie vyskytují v těle lidí i zvířat jako nepatogenní organismus. Nacházejí se v trávicím traktu, mateřském mléce, vaginální mikroflóře a v dutině ústní. U novorozenců a kojenců tvoří až 94 % střevní mikrobioty (Ruiz et al. 2017). Ve střevech člověka nalezneme *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. catenulatum/pseudocatenulatum* a *B. bifidum* (O'Callaghan & van Sinderen 2016). Méně častý je pak výskyt *B. angulatum*.

Ve střevě novorozenců a kojenců najdeme především druhy *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis*, ve střevě dospělého člověka se množství a druh bifidobakterií liší. U dospělého jedince najdeme hlavně rod *B. adolescentis* a *B. longum* subsp. *longum*. V dutině ústní se může vyskytovat *B. dentium*, který se podílí na vzniku zubních kazů (Maxa & Rada 1996).

4.4.5 Antimikrobiální antikvita bifidobakterií

Ve střevech se nachází největší množství bakterií schopných produkovat antimikrobiální látky. Probiotické kmeny, do kterých patří i bifidobakterie, produkují organické kyseliny, které mají také nejspíše vliv na inhibici patogenních mikroorganismů. Mechanismus jejich působení není zcela jednoznačný. Pozitivní stimulaci jejich růstu lze ovlivnit enzymatickými hydrolyzáty bílkovin, které jsou například součástí syrovátkové bílkoviny, kvasničného autolyzátu nebo řas *Chlorella* a *Scenedesmus* (Maxa & Rada 1996).

Bakteriociny produkují bakterie syntézou ribozomálních antimikrobiálních peptidů. Bakterie jsou navíc imunní vůči svým vlastním bakteriocinům. Tato vlastnost je zajištěna speciálními proteiny (Cotter et al. 2005).

Bifidobakterie produkují bakteriociny, například bifidin, který produkuje druh *B. bifidum*. Tento peptid obsahuje z aminokyselin nejvíce fenylalaninu a kyseliny glutamové (Martinez et al. 2013).

Dále *Bifidobacterium* subsp. produkuje bifidoadocin, který je proteinové povahy. Neobsahuje lipidové ani sacharidové části. Tento bakteriocin je odolný vůči teplu a je aktivní ve velkém rozsahu hodnot pH. Nejčastěji ho nalezneme v dutině ústní, kde pravděpodobně působí proti patogenům a původcům zubního kazu (Mahdi et al. 2018).

Kmen *B. longum* je schopný produkovat bakteriocin bifilong, který může inhibovat některé gramnegativní a grampozitivní bakterie. Bifilong je stabilní, pokud je pH v rozmezí 2,5 až 5,0 (Kang et al. 1989). Přehled a charakteristiky bifidobakteriálních bakteriocinů jsou uvedeny v Tabulce č. 1 a v Tabulce č. 2 je poté ukázka antagonistické aktivity kmenů *Bifidobacterium* proti patogenním mikroorganismům.

B. bifidum produkuje bifidocin B. Tento bakteriocin dokáže inhibovat kmeny z rodů *Listeria*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Leuconostoc* a *Bacillus* (Yildirim et al. 1999).

Bifidobakterie pro inhibici patogenů produkují kyselinu mléčnou, která snižuje pH a nejspíše inhibuje ureázový systém patogenu. Více bakteriemi produkováná kyselina octová má silnější antimikrobiální aktivitu než kyselina mléčná, a to z důvodu vyšší disociační konstanty. Schopnost produkovat laktát a acetát přispívá k antagonistickým a ochranným účinkům proti druhům salmonel a listerióz. Ze studovaných kmenů bylo zjištěno, že *B. kashiwanohense*, *B. gallicum* a *B. longum* subsp. *infantis* produkují acetát i laktát v prostředí, kde přežívají (Devika & Raman 2019). Zajímavé je, že kmen *B. longum* Reuter 1963 produkoval pouze acetát, pokud jeho jedinou živinou byly monosacharidy. Produkce acetátu je ovlivněna živinovým prostředím a liší se u různých kmenů, zatímco produkce laktátu je na živném prostředí nezávislá (Servin 2004).

Produkce bakteriocinů nastává při pozdní logaritmické nebo stacionární fázi růstu nebo pokud dojde ke stresovým podmínkám pro buňku. Buňka může být například ohrožena jiným mikroorganismem nebo prostředím. Tyto stresové podmínky ovlivňují biologickou funkčnost buňky a ta začne reagovat. Pro zachování bakterií je nutné správné uchovávání. Osvědčila se například metoda zmrazování při -20 °C, při které bakterie přežijí až jeden rok stále aktivní. Také se zachovala jejich funkčnost po lyofilizaci – usušení mrazem (Simpson et al. 2005).

Díky receptorům se bakteriocin dostane do buňky, následně nastává reakce bakteriocinu v buňce. Většinou dojde k usmrcení buňky kvůli špatné syntéze energie, kterou vyvolal právě účinek bakteriocinů (Souza et al. 2005).

Získávání čistých bakteriocinů je velmi složité. Získávají se kvůli komerčním účelům nebo kvůli vědeckým výzkumům. Nejčastějším způsobem je chromatografie (chemicko-fyzikální separační metoda) nebo extrakce pomocí methanolu (Cheikhyoussef et al. 2008).

Tabulka č. 1 Charakteristika bakteriocinů, upraveno dle Martinez et al. (2013).

Název bakteriocinu	Druh kmene	Rozmezí teploty, času a pH
Bifidin (Anand et al. 1984)	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i>	100 °C po dobu 30 minut, pH 4,8–5,5
Bifidocin (Yildirim et al. 1999)	<i>B. bifidum</i>	121 °C po dobu 15 minut, pH 5,0–6,0
Bifilong (Kang et al. 1989)	<i>B. longum</i>	121 °C po dobu 15 minut, pH 4–7
Bifilact (Saleh & El-Sayed 2004)	<i>B. lactis</i>	Není odolný vysokým teplotám, pH 4-7
Thermophilicin (Von Ah 2006)	<i>B. thermophilum</i>	100 °C po dobu 5 minut, pH 6
Lantibiotic (Bisin) (Lee et al. 2011)	<i>B. longum</i>	-

Tabulka č. 2 Antagonistická aktivita kmenů *Bifidobacterium* proti patogenním mikroorganismům, upraveno dle Sarquis et al. (2019).

	<i>Escherichia coli</i> V517	<i>Staphylococcus aureus</i> 76	<i>Salmonella enterica</i> OMS-Ca	<i>Listeria monocitogenes</i> ATCC 15313
<i>B. aesculapii</i> MRM3/1	+	+	+	+
<i>B. aesculapii</i> MRM4/2	+	++	+	++
<i>B. avesanii</i> TREC	++	++	+	+++
<i>B. areophilum</i> TRE26	+	+	+	++
<i>B. lactis</i> INL1	+	+	+	+
<i>B. lactis</i> Bb12	+	+	+	+
<i>B. lactis</i> P32/1	+	+	+	+

(- Žádná inhibice růstu, + inhibice 1-3mm, ++inhibice 3-5mm, +++>5mm)

4.5 Rod *Lactococcus*

Jedná se o fakultativně anaerobní, grampozitivní a homofermentativní druh bakterie, který produkuje kyselinu mléčnou rozkladem laktózy. Rod *Lactococcus* jsou kataláza negativní nepohyblivé koky, které žijí jednotlivě nebo v řetízích. Běžně se využívají při výrobě fermentovaných výrobků. Rostou již při teplotách nižších než 7 °C, ale optimální teplota pro růst je okolo 30 °C (Robinson et al. 1999).

4.5.1 Taxonomická klasifikace

Lactococcus patří do domény bakterie, kmen Bacillota, třída Bacilli, řád Lactobacillales, čeleď *Streptococcaceae* a do rodu *Lactococcus* (*L.*). Tento rod byl blíže popsán v roce 1985. Řadil se mezi mléčné streptokoky, protože si je s tímto druhem podobný. Aktuálně se v tomto rodě nachází 24 druhů. Patří sem například: *L. formosensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. laudensis*, *L. nasutitermitis*, *L. piscium*, *L. plantarum* (Casalta & Montel 2008).

4.5.2 *Lactococcus garvieae*

Tento druh laktokoků patří k nejvýznamnějším patogenům tohoto rodu. Je to fakultativně anaerobní, nepohyblivý, grampozitivní kok. Nejčastěji se vyskytuje v akvakultuře, napadá tedy vodní organismy, ale může být patogenní i pro člověka. Zdrojem infekcí může být syrové mléko, sýry nebo rybí maso. U vodních organismů je léčba náročnější a většinou končí smrtí, protože tento druh napadá cévy a následně nastává krvácení do vnitřních orgánů. Poprvé byl izolován u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v roce 1950 (Chao et al. 2013).

4.5.3 *Lactococcus petauri*

Jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní a kataláza negativní kok. Poprvé byl izolován z vakoveverky létavé (sugar glider, lat. *Petaurus breviceps*). Vakoveverka létavá je malý vačnatec pocházející z Austrálie a Nové Guineje (Goodman et al. 2017).

4.5.4 *Lactococcus formosensis*

Jedná se o grampozitivní, kataláza negativní, kokoidní nebo vejčité buňky. Jsou fakultativně anaerobní a rostou při teplotách 20–37 °C. Dokáží růst v prostředí 6% NaCl. Z glukózy dokáží vyrobit kyselinu mléčnou. Poprvé byl tento druh izolován z „yan-tsai-shin“ (fermentované stonky z brokolice). Jedná se o tradiční jídlo na Tchaj-wanu (Chen et al. 2014).

4.5.5 *Lactococcus lactis*

Je to grampozitivní, nepohyblivý, fakultativně anaerobní kok. Jedná se o první geneticky modifikovaný mikroorganismus. Vyskytuje se v řetízcích nebo jednotlivě. Optimální teplota pro růst je 30 °C. Jedná se o homofermentativní bakterii mléčného kvašení. Do druhu *L. lactis* patří ještě tyto poddruhy: *L. lactis* biovar. *diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. lactis* subsp. *tructae* (Song et al. 2017).

Zástupci druhu *L. lactis* se používají hlavně při výrobě měkkých a tvrdých sýrů jako startovací kultura, například je dominantním druhem u sýru typu Camembert. Laktokoky jsou schopné citrátového cyklu, tedy metabolizace kyseliny citronové nebo citrátu za vzniku specifického aroma, které je důležitou součástí mléčných fermentovaných výrobků. Vzniká acetoin, diacetyl nebo 2,3-butandiol (Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 2012).

4.6 Rod *Streptococcus*

Jedná se o grampozitivní, kulovité koky, které jsou schopné dělení podle jedné osy – toto je odlišuje od stafylokoků. Tvoří nepravidelné řetězce a buňky mají často nepravidelný tvar. Streptokoky jsou součástí kůže, slin či dýchacího systému. Jsou kataláza negativní a fakultativně anaerobní. V tomto rodu *Streptococcus* (*S.*) najdeme přes 50 druhů a najdeme zde jak patogenní, tak užitečné druhy. Patogenní druhy se dělí na dvě skupiny: alfa-hemolytické a beta-hemolytické. U lidí a zvířat s oslabenou imunitou mohou však způsobit invazivní infekce. U zvířat například mastitidy, u žen například předčasný porod s úmrtím dítěte (Krzyściak et al. 2013).

Alfa-hemolytické druhy jsou schopné jen částečné hemolýzy, tj. rozpad krvinek. Nejlepší identifikací je test na krevním agaru, kdy dochází k oxidaci železa v krvinkách a tím ke změně barvy agaru na nazelenalou. Patří sem *S. pneumoniae* a *S. viridans*. Tyto druhy způsobují meningitidy, záněty středního ucha a pneumonie.

Beta-hemolytické druhy způsobují úplnou hemolýzu krvinek. Na krevním agaru se to projeví prosvětlenými až průhlednými zónami. Beta-hemolytické druhy se rozdělují ještě na skupinu A a skupinu B. Do skupiny A patří *S. pyogenes*, který způsobuje širokou škálu invazivních i neinvazivních infekcí. Nejčastěji se projevuje spála, streptokoková faryngitida nebo zápal plic. Do skupiny B patří *S. agalactiae* (Bogaert et al. 2004).

4.6.1 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae je grampozitivní, kataláza negativní a fakultativně anaerobní bakterie. Je druhem skupiny B a je to komenzální bakterie. Může však způsobit invazivní onemocnění – nejčastěji způsobuje meningitidu nebo pneumonii. Tento druh může kolonizovat střeva nebo vaginální trakt ženy. Hrozí zde přenos bakterie na novorozené dítě či předčasný porod. U zvířat, zejména u savců, způsobuje mastitidy (Armistead et al. 2020).

S. agalactiae produkuje oranžový pigment granadaene. Struktura pigmentu obsahuje 12 konjugovaných dvojných vazeb. Na jednom konci struktury se nachází rhamnóza a na druhém aminokyselina ornitin. Pigment granadaene není rozpustný ve vodě ani ve většině rozpouštědel. Podobný pigment produkuje i *L. lactis*. Tento pigment bakterie zřejmě využívají jako obranný systém proti konkurenčním druhům bakterií (Rosa-Fraile et al. 2006).

5 Metodika

Praktická část bakalářské práce byla zaměřena na stanovení antimikrobiální aktivity bifidobakterií proti potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům.

Testované izoláty byly ze sbírky bifidobakterií pocházejících z trávicího traktu primátů tamarinů zlatých (*Leontopithecus rosalia*). Ačkoliv u nich byly izolovány patogenní laktokoky, zvířata nevykazovala žádné zjevné zdravotní obtíže. Testovaná kolekce bakterií byla rozšířena o sbírkové izoláty z potravin a izoláty lidského, zvířecího i hmyzího původu, zahrnující zástupce rodů *Bifidobacterium*, *Lactococcus* a *Streptococcus*.

Testování bylo prováděno v laboratorních podmínkách, tedy *in vitro*, pomocí diskové difúzní metody a spotové metody.

Celkem bylo pro testování vybráno 12 potenciálně patogenních kmenů zahrnující laktokoky a streptokoky. Jejich seznam je uveden v Tabulce č. 3. Jako 13. kmen v tabulce je nepatogenní *L. lactis* ATCC 11454 pocházející z oficiální sbírky.



Obr. č. 8 Ukázka tamarína zlatého (*Leontopithecus rosalia*) Dostupné z: https://www.zoo-olomouc.cz/sites/default/files/images/animalcard/dsc_5980_1.jpg.

Tabulka č. 3 Přehled testovaných laktokoků a streptokoků zahrnující potenciální patogeny.

	Původ	Druh	Kmen
1	Tamarín zlatý (<i>Leontopithecus rosalia</i>)	<i>Lactococcus petauri</i>	LG4 ^{KMVD}
2	Tamarín zlatý (<i>Leontopithecus rosalia</i>)	<i>Lactococcus petauri</i>	LG26 ^{KMVD}
3	Larvy potemníka brazilského (<i>Zophobas morio</i>)	<i>Lactococcus formosensis</i>	I4/60 ^{KMVD}
4	Ústní absces u vakoveverky létavé (<i>Petaurus breviceps</i>)	<i>Lactococcus petauri</i>	DSM 104842 ^T
5	Stolice kojence	<i>Lactococcus garvieae</i>	18 (Mg ²) ^{KMVD} ^T
6	Siláž	<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM 20064 ^S
7	Ledvina kranase amerického (<i>Seriola lalandi</i>)	<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM 6783 ^S
8	Mastitida skotu	<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM 20684 ^T
9	Syrové mléko	<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM 20385 ^S
10	Žádné přesné informace	<i>Streptococcus agalactiae</i>	LMG 15088 ^S
11	Infekce hovězího dobytka	<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSM 6784 ^S
12	Mléčná žláza skotu	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CCM 6187 ^S
13	Žádné přesné informace	<i>Lactococcus lactis</i>	ATCC 11454 ^S (M71)

Vysvětlivky:

^{KMVD} Kmen ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze, izolováno v rámci studie (Neuzil-Bunesova et al., 2022); ^T Typový kmen z oficiální sbírky; ^S Sbírkový kmen z oficiální sbírky;

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur),

LMG – Belgian coordinated collections of microorganisms (Belgické koordinované sbírky mikroorganismů),

ATCC – American Type Culture Collection (Americká sbírka typových kultur).

V Tabulce č. 4 je seznam bifidobakterií a dalších látek, které byly vybrány k testování s předpokladem jejich antimikrobiální aktivity vůči výše uvedeným potenciálně patogenním mikroorganismům. Jednalo se celkem o 77 bifidobakteriálních kmenů, z nichž bylo 71 původně izolovaných z fekálních vzorků tamarinů ze ZOO Olomouc, u kterých byla detekována také přítomnost granadaene produkujících laktokoků.

Jednalo se o *B. avesanii* (n=3), *B. roussetti* (n=2), *B. aerophilum*, *B. adolescentis/faecale* (n=11), *B. faecale* (n=2), *B. ruminantium*, *B. aerophilum*, *B. avesanii*, *B. callimiconis* (n=2), *B. callitrichidarum*, *B. callitrichos*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. goeldii* (n=3), *B. moraviense*, *B. olomucense*, *B. platyrrhinorum* (n=3), *B. pseudocatenulatum*, *B. ramosum* (n=2), *B. roussetti* (n=2), *B. saguini* (n=3), *B. stellenboschense* (n=19), *B. parmae*, *B. vansinderenii*, *B. scaligerum/cebidarum*, *B. cebidaru*, *B. felsineum*, *B. miconisangentani*.

U některých z testovaných kmenů (*B. adolescentis/faecale*) nebyla identifikace dostatečná pro odlišení, zda se jednalo o druh *B. adolescentis* nebo *B. faecale* (identita byla ověřena pomocí MALDI TOF MS v rámci jiného projektu).

S. agalactiae je typickým producentem granadaene a byl použit jako kontrola. Dále byly pro potvrzení účinků bifidobakterií na potenciálně patogenní laktokoky a streptokoky testovány komerční a lidské kmeny bifidobakterií. Zde bylo vybráno celkem 6 kmenů náležících k 5 druhům: *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *B. breve* BR-03, *B. animalis* subsp. *lactis* (Activia, DANONE), *B. longum* subsp. *infantis* (dětská výživa), *B. adolescentis* (dospělý člověk), *B. breve* (kojenec). Navíc byly k testování přidány vzorky jako lysozym, mateřské mléko, mateřské mlezivo a antibiotikum mupirocin, u kterých byla předpokládána antimikrobiální aktivita.

Tabulka č. 4 Přehled testovaných bifidobakterií a antimikrobiálních látek.

Vzorek	Identifikováno jako	Vzorek	Identifikováno jako
GLT1	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	GLT42	<i>Bifidobacterium rousetti</i>
GLT2	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	GLT43	<i>Bifidobacterium rousetti</i>
GLT3	<i>Bifidobacterium rousetti</i>	GLT44	<i>Bifidobacterium saguini</i>
GLT4	<i>Bifidobacterium rousetti</i>	GLT45	<i>Bifidobacterium saguini</i>
GLT5	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	GLT46	<i>Bifidobacterium saguini</i>
GLT6	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	GLT47	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT7	<i>Bifidobacterium aerophilum</i>	GLT48	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT8	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT49	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT9	<i>Bifidobacterium adolescentis/faecale</i>	GLT50	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT10	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT51	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT11	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT52	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT12	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT53	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT13	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT54	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT14	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT55	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT15	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT56	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT16	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT57	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT17	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT58	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT18	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT59	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT19	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT60	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT20	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GLT61	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT21	<i>Bifidobacterium faecale</i>	GLT62	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT22	<i>Bifidobacterium faecale</i>	GLT63	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT23	<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	GLT64	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT24	<i>Bifidobacterium aerophilum</i>	GLT65	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>
GLT25	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	GLT66	<i>Bifidobacterium parmae</i>
GLT26	<i>Bifidobacterium callimiconis</i>	GLT67	<i>Bifidobacterium vansinderenii</i>
GLT27	<i>Bifidobacterium callimiconis</i>	GLT68	<i>Bifidobacterium scaligerum/cebidarum</i>
GLT28	<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	GLT69	<i>Bifidobacterium cebidarum</i>
GLT29	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	GLT70	<i>Bifidobacterium felsineum</i>
GLT30	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	GLT71	<i>Bifidobacterium miconisangentani</i>
GLT31	<i>Bifidobacterium goeldii</i>	BB-12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12
GLT32	<i>Bifidobacterium goeldii</i>	BR-03	<i>Bifidobacterium breve</i> BR-03
GLT33	<i>Bifidobacterium goeldii</i>	BDAN	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (Activia, DANONE)
GLT34	<i>Bifidobacterium moraviense</i>	BINF	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> (dětská výživa)
GLT35	<i>Bifidobacterium olomucense</i>	JK2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (dospělý člověk)
GLT36	<i>Bifidobacterium platyrrhinorum</i>	TA-2	<i>Bifidobacterium breve</i> (kojenec)
GLT37	<i>Bifidobacterium platyrrhinorum</i>	MM 1	Mateřské mléko
GLT38	<i>Bifidobacterium platyrrhinorum</i>	MM 2	Mateřské mlezivo
GLT39	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	L100	Lysozym (100 mg/l)
GLT40	<i>Bifidobacterium ramosum</i>	L1000	Lysozym (1000 mg/l)
GLT41	<i>Bifidobacterium ramosum</i>	MUP200	Mupirocin (200 µg/disk, Oxoid)

5.1 Pracovní postup

Pro každý nový experiment se prováděla příprava kultivačních médií, kultivace potenciálních patogenů, i příprava čerstvých kultur a supernatantů bifidobakterií. Díky tomu byla zaručena aseptická práce celého experimentu a také aktivita bakterií.

5.1.1 Příprava kultivačních médií

Pro kultivaci kmenů potenciálních patogenů a bifidobakterií byl použit anaerobně připravený modifikovaný Wilkins-Chalgren bujón/tekuté médium (Oxoid, Velká Británie; dále v práci uváděn jako WSP bujón), jeho složení je uvedeno níže v Tabulce č. 5 a v Tabulce č. 6.

Komponenty na přípravu bujónu byly naváženy, promíchány a rozvařeny v destilované vodě. Následně byl bujón rozdělen do „Hungate zkumavek“. Zkumavky byly předehřívány při teplotě 100 °C z důvodu odstranění kyslíku. Poté byl obsah ve zkumavkách probublán CO₂ a zkumavky byly uzavřeny a sterilovány v autoklávu (program určený pro tekutiny).

Příprava WSP agaru (zde modifikovaný Wilkins-Chalgren agar) probíhala tak, že nejprve byly jednotlivé navážené složky rozmíchány v Erlenmayerově baňce v destilované vodě. Dále byla baňka uzavřena hliníkovou fólií a následovala sterilace v Papinově hrnci po dobu 60 minut. Poté byl agar temperován ve vodní lázni na teplotu přibližně 50 °C a dále se aplikoval do Petriho misek. Přesné složení modifikovaného agaru je uvedeno v Tabulce č. 7 a Tabulce č. 8.

Tabulka č. 5 Přehled složení navážek pro přípravu WSP bujónu.

Voda	Wilkins-Chalgren bujón	Soya Peptone	Cystein	Tween 80
1000 ml	43 g	5 g	0,5 g	0,5 g

Tabulka č. 6 Přehled jednotlivých složek Wilkins-Chalgren bujónu.

Složení	g/l
Trypton	10
Želatinový pepton	10
Kvasnicový extrakt	5
Glukóza	1
Chlorid sodný	5
L-Arginine	1
Pyruát sodný	1
Menadione	0,0005
Haemin	0,005
pH 7,1 ± 0,2; 25 °C	

Tabulka č. 7 Přehled složení navážek pro přípravu WSP agaru.

Voda	Wilkins-Chalgren agar	Soya Peptone	Cystein
1000 ml	43 g	5 g	0,5 g

Tabulka č. 8 Přehled jednotlivých složek Wilkins-Chalgren agaru.

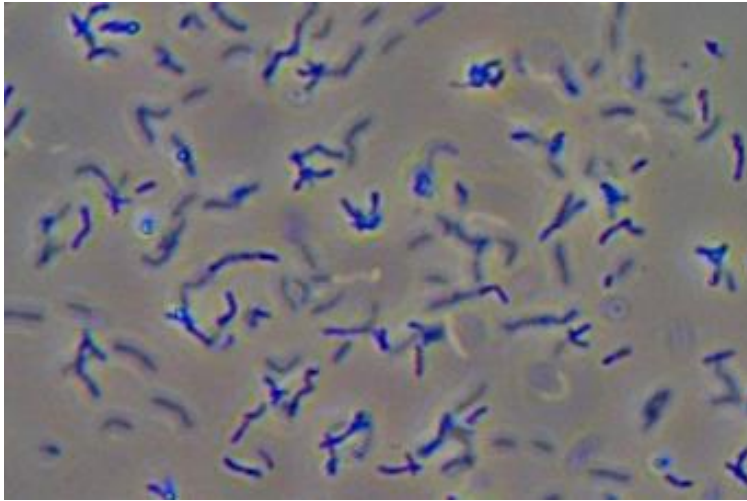
Složení	g/l
Tryptone	10
Želatinový pepton	10
Kvasnicový extrakt	5
Glukóza	1
Chlorid sodný	5
L-Arginine	1
Pyruát sodný	1
Menadione	0,0005
Haemin	0,005
Agar	10
pH 7,1 ± 0,2; 25 °C	

5.1.2 Příprava kmenů pro testování

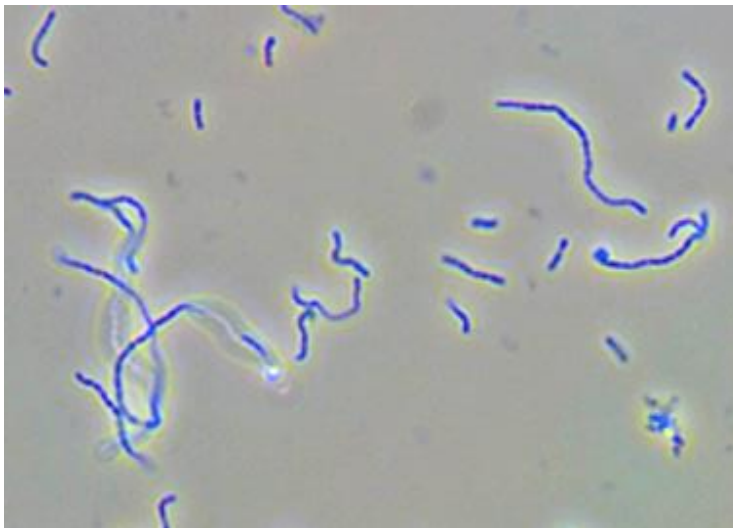
Výše uvedené kmeny bakterií (Tabulka č. 3, Tabulka č. 4) byly dlouhodobě skladovány v zamraženém stavu při teplotě -20 °C nebo -80 °C, kde byly uchovány v kultivačním médiu obohaceném o glycerol (20 % v/v). Pro použití kmenů bylo nutné vzorky nejdříve rozmrazit a přeočkovat do předem připraveného kultivačního média. Po rozmrznutí bylo 0,3 ml rozmražené bakteriální kultury přeočkováno do 9 ml anaerobně připraveného WSP bujónu. Následně byla provedena kultivace bujónu s kulturou v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

5.1.3 Kontrola čistoty kultur

Po kultivaci bylo nutné ověřit čistotu vzorku čerstvě narostlých kultur (Obrázek č. 9, Obrázek č. 10). Na podložní sklíčko se injekční stříkačkou přeneslo inokulum bakterie, přiložilo se krycí sklíčko a vzorek se vložil pod světelný mikroskop Nikon ECLIPSE E200 s fázovým kontrastem. Za pomoci mikroskopie s fázovým kontrastem byla postupně ověřena čistota všech 12 potenciálních patogenů, ale i používaných bifidobakterií.



Obrázek č. 9 Vlastní mikroskopování *B. breve* (mikroskopie s fázovým kontrastem).



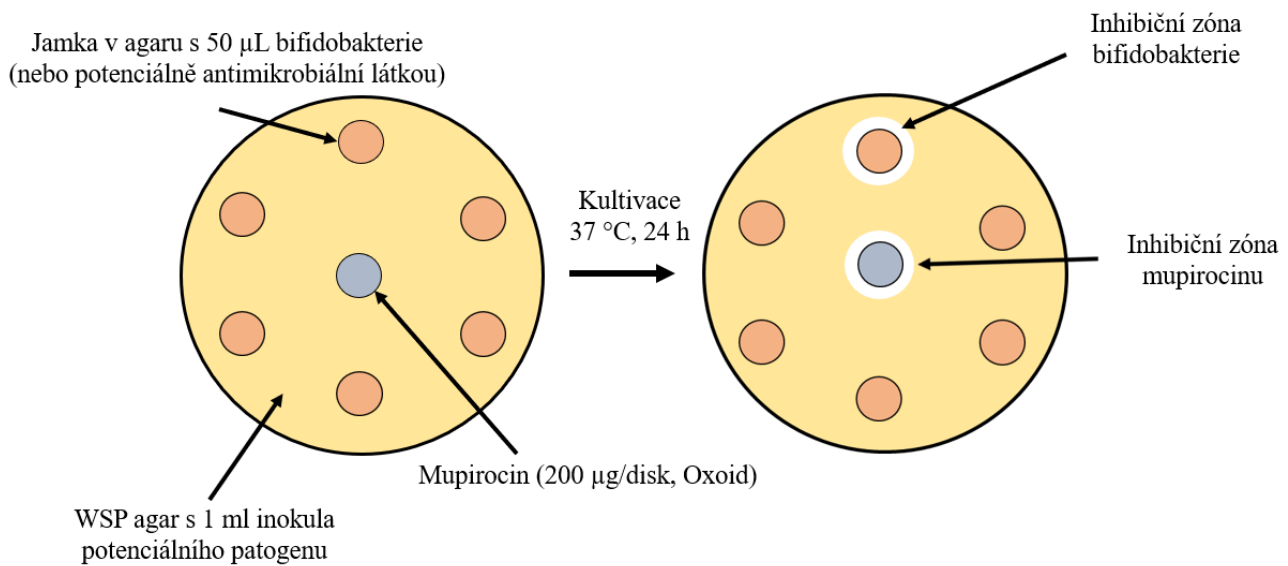
Obrázek č. 10 Vlastní mikroskopování *L. formosensis* (mikroskopie s fázovým kontrastem).

5.1.4 Příprava supernatantů bifidobakterií pro difúzní metodu

Z čerstvě vyrostlých bifidobakteriálních kultur se odebral 1 ml, který se odstředil v mikrozkuvkách při rychlosti 12 000 ot/min po dobu 5 minut. Supernatant, který byl po odstředění čirý, se přelil do další sterilní mikrozkuvky. S usazeninou (peletou), která v mikrozkuvce zbyla, se dále nepracovalo a byla zlikvidována. Supernatanty se poté použily pro jednotlivé metody. V rámci experimentu byla souběžně testována i čerstvě narostlá bifidobakteriální kultura, kdy došlo pouze k jejímu odebrání do mikrozkuvky a bez dalších úprav byla aplikována.

5.2 Testování pomocí deskové difúzní metody

Do velké Petriho misky (90 mm) se naočkoval 1 ml supernatantu čerstvě narostlé kultury potenciálního patogenu. Sterilní agar (25 ml) vytemperovaný na 50 °C byl nalit do Petriho misek pomocí sterilního dávkovače a promíchán jemnými krouživými pohyby s inokulem. Následně se agar i s inokulem nechal ztuhnout. Poté se do agaru pomocí lihem a plamenem vysterilovaného korkovrtu vytvořilo 6 jamek. Do uvedených jamek bylo aplikováno 50 µL čerstvé kultury nebo supernatantu testovaných bifidobakterií. Mupirocin byl aplikován doprostřed agaru ve formě antibiotického disku (s koncentrací 200 µg/disk, Oxoid), sloužil tak zároveň jako kontrola, protože laktokoky a streptokoky jsou citlivé na mupirocin. Spolu s bifidobakteriemi se ještě v průběhu celé práce ověřovala antimikrobiální aktivita i jiných látek, jako například lysozymu, mateřského mléka nebo mleziva (Tabulka č. 2). Následovala inkubace v anaerobním prostředí speciálního plastového boxu (vytvořeno pomocí AnaeroGen, Oxoid) při teplotě termostatu 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byly Petriho misky vyhodnoceny tím, že byly změřeny vzniklé inhibiční zóny. Pokud zde byly patrné inhibiční zóny, byl vzorek vyhodnocen jako pozitivní, tedy mající antimikrobiální aktivitu vůči testovanému patogenu (Obrázek č. 11).



Obrázek č. 11 Ukázka deskové difúzní metody.

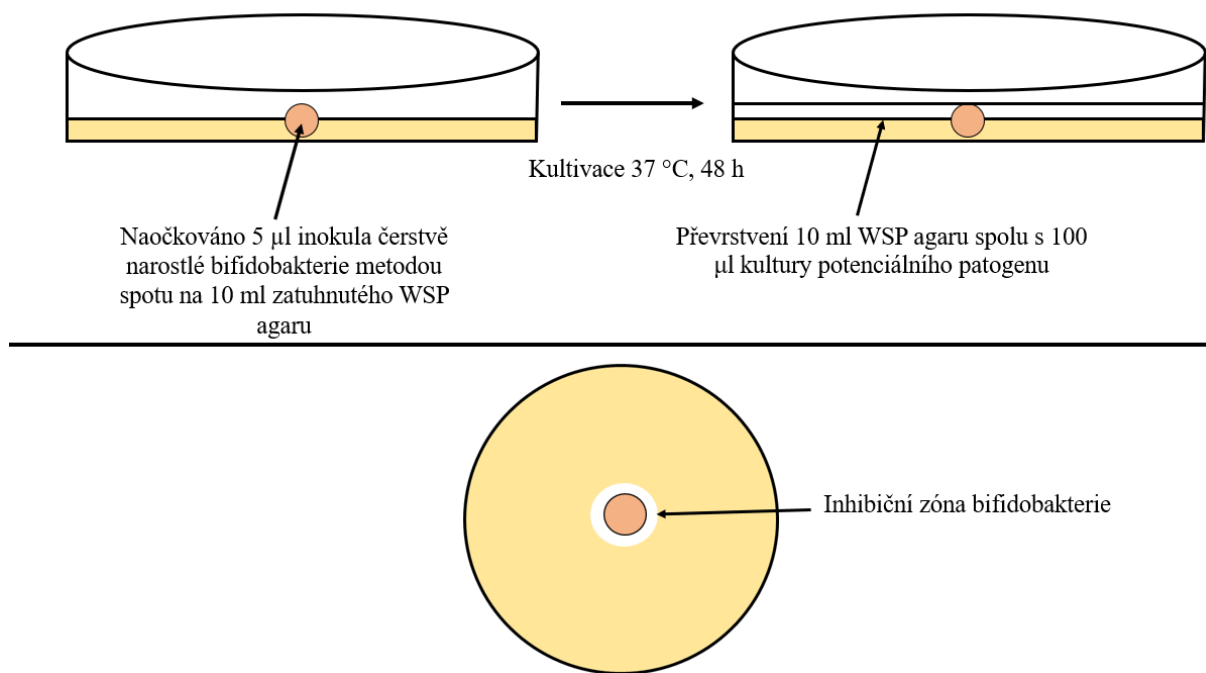
5.3 Testování pomocí spotové metody

Princip spotové metody spočívá v tom, že se vytvoří spot, tedy nárůst bakteriální kultury, u které je předpoklad inhibice patogenu. Přes tento spot je aplikována patogenní kultura, která se nechá narůst a sleduje se, zda v místě testování kultury s antimikrobiálním potenciálem došlo k inhibici potenciálního patogenu. Zde byly v rámci práce zkoušeny dvě varianty testování.

Metoda spotu

Do velkých Petriho misek bylo nalito 10 ml WSP agaru, který se nechal zatuhnout. Dále bylo naočkováno 5 µl inokula čerstvě narostlé bifidobakteriální kultury. Následovala kultivace 48 h při 37 °C v anaerobních podmínkách boxu (AnaeroGen, Oxoid). Po kultivaci byla provedena kontrola, zda došlo v místě spotu k nárůstu kultury. Poté byl narostlý spot bifidobakterie převrstven zhruba 10 ml WSP agaru, který byl smíchán se 100 µl kultury potenciálního patogenu. Opět se miska nechala kultivovat v anaerobním prostředí, tentokrát 24 h při 37 °C. Uvedená metoda byla testována také na malých Petriho miskách s 5 ml WSP agaru, kde se aplikovalo 2 µl kultury (inokula) pro spot. Podmínky kultivace byly stejné, ale na druhou vrstvu bylo aplikováno jen 5 ml agaru s 50 µl patogenu.

Po kultivaci následovalo vyhodnocení antimikrobiální aktivity bifidobakterií, která se projevila inhibicí růstu potenciálního patogenu kolem spotu – místa, kde byla naočkována bifidobakterie (Obrázek č. 12).



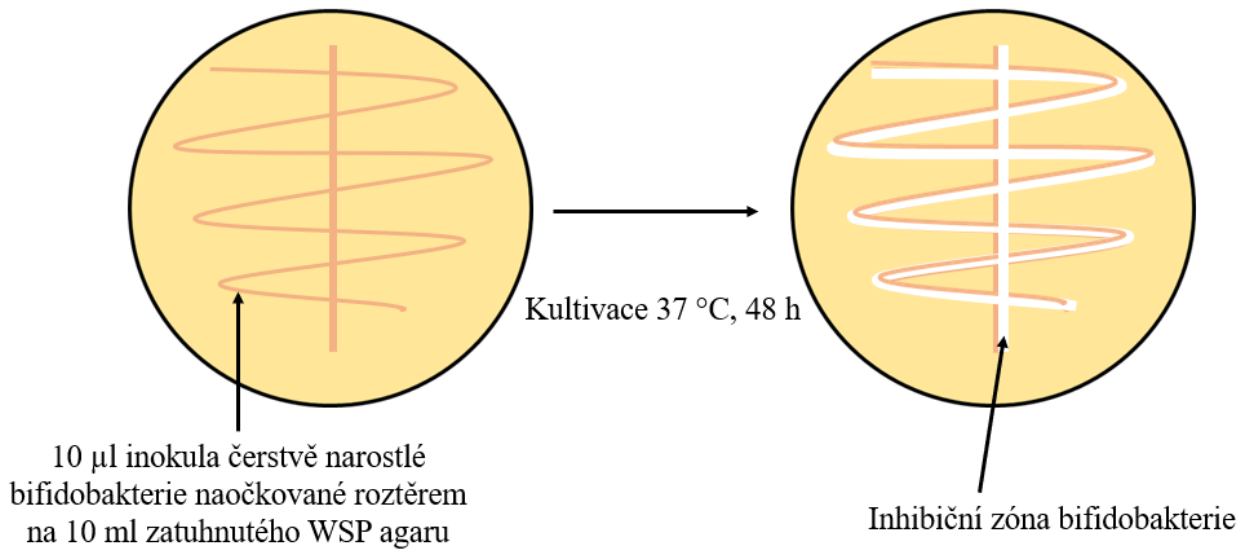
Obrázek č. 12 Ukázka klasické spotové metody.

Metoda spotu s roztěrem

Do velkých Petriho misek bylo nalito 10 ml WSP agaru, který se nechal zatuhnout. Dále bylo naočkováno sterilní plastovou kličkou 10 µl inokula čerstvě narostlé bifidobakteriální kultury, které bylo rozetřeno po středu Petriho misky rovnou čarou. Poté bylo ještě toto inokulum představující čáru rozetřeno vlnovkou po celé ploše Petriho misky (Obrázek č. 13). Následovala kultivace po dobu 48 h při 37 °C v anaerobních podmínkách speciálního plastového boxu (vytvořeno pomocí AnaeroGen, Oxoid).

Poté byla provedena kontrola, zda došlo k nárůstu kultury (nejvyšší koncentrace buněk/nárůst v místě začátku inokula). Následně byl nátěr bifidobakterie převrstven zhruba 10 ml WSP agaru, který se nechal trochu zatuhnout a na něj bylo aplikováno roztěrem 10 µl inokula patogenu (Obrázek č. 13).

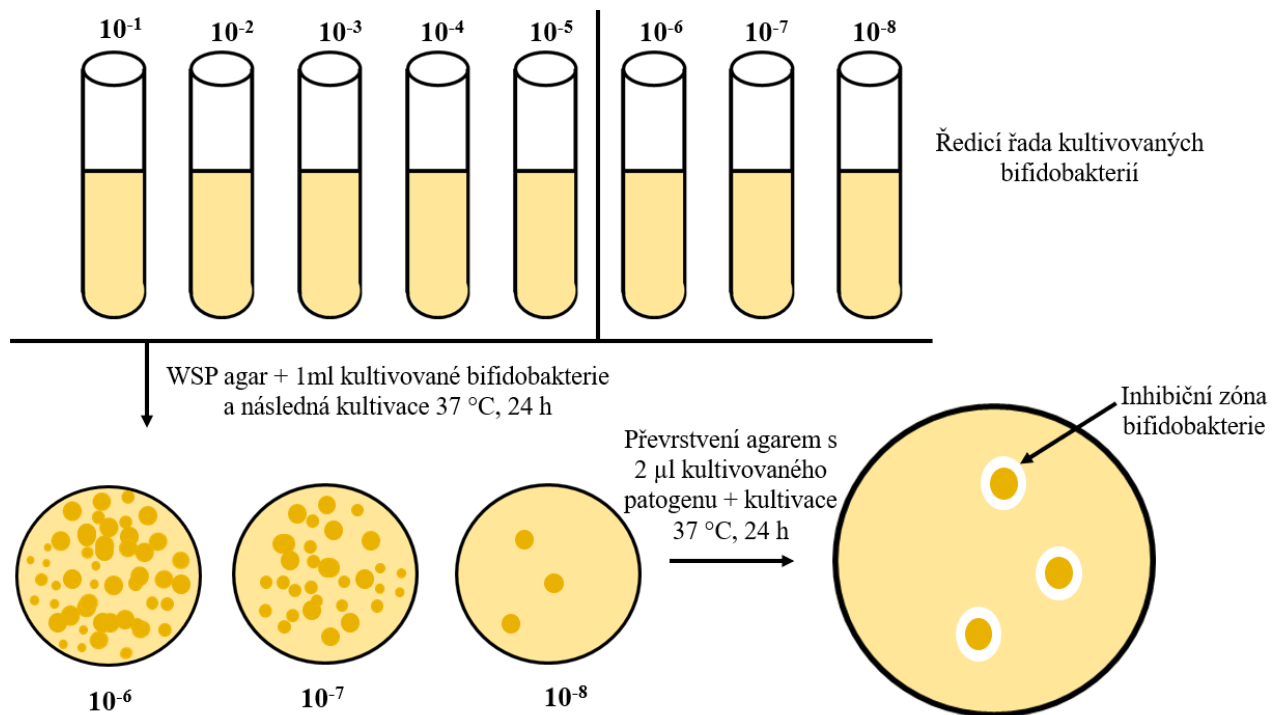
Celá zaočkovaná Petriho miska se nechala kultivovat, tentokrát 24 hodin při 37 °C v anaerobním prostředí. Po kultivaci následovalo vyhodnocení antimikrobiální aktivity bifidobakterií, která se projevovala inhibicí růstu potenciálního patogenu v místě nátěru (čáry), kde byla naočkována bifidobakterie.



Obrázek č. 13 Ukázka spotové metody roztěrem.

Spotová metoda pomocí ředící řady

Pro tuto metodu bylo důležité vytvoření ředící řady. Ze vzorku kultivovaných bifidobakterií (kde byla očekávána koncentrace buněk cca 10^8 - 10^9 KTJ/ ml) byl odebrán 1 ml, který byl zaočkován do 9 ml ředící tekutiny (Tabulka č. 5). Tím bylo dosaženo 1. ředění (10^{-1}), takto bylo postupováno až do 8. ředění. Narostlá kolonie poté představuje „spot“. Takto zpracované vzorky byly zaočkovány na malé Petriho misky a zality cca 5 ml WSP agaru, dále kultivovány při 37 °C po dobu 24 h za anaerobních podmínek (AnaeroGen, Oxoid). Poté byly misky zkontrolovány a přelity vrstvou agaru obsahující patogen (v koncentraci 0,01 % v/v). Opět probíhala anaerobní kultivace při 37 °C po dobu 24 h a poté byly misky vyhodnoceny. Bylo hodnoceno, zda dochází v místě bifidobakteriální kolonie k inhibici růstu patogenu (Obrázek č. 14). Toto lze aplikovat u vyšších ředění, na nízkých ředěních lze zhodnotit, zda patogen v druhé vrstvě narostl.



Obrázek č. 14 Ukázka spotové metody pomocí ředící řady.

6 Výsledky

K testování antimikrobiální aktivity byly použity tři druhy metod: difúzní desková metoda, kdy byl použit supernatant nebo čerstvě narostlá kultura bifidobakterií, dále spotová metoda a metoda spotu pomocí ředící řady. Uvedené tři metody byly různě modifikovány s cílem najít optimální podmínky pro experiment. Výsledky získané prostřednictvím uvedených metod jsou prezentovány níže v podkapitolách.

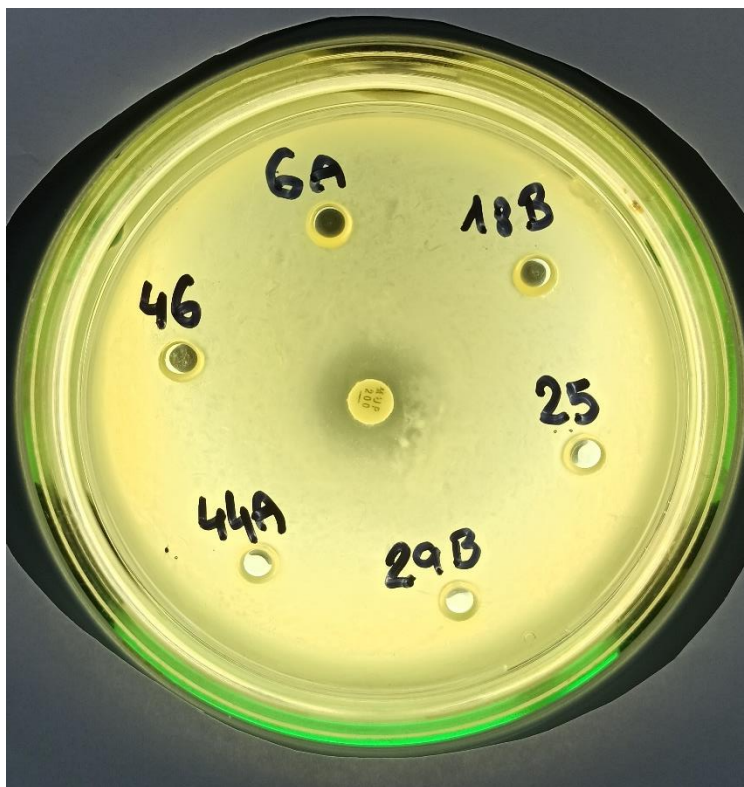
6.1 Difúzní desková metoda

Všechny testované kmeny bifidobakterií byly nejprve otestovány difúzní deskovou metodou ve formě čerstvě narostlé kultury anebo supernatantu. Nebyla zde zaznamenána žádná inhibiční zóna, která by poukazovala na antimikrobiální aktivitu a možnou přítomnost nějakého bifidobakteriálního metabolitu, popřípadě bakteriocinu působícího vůči patogenním laktokokům a streptokokům, a to i přesto, že bylo testováno celkem 77 kmenů bifidobakterií náležících k 27 druhům tohoto rodu (Obrázek č. 15).

Účinnou antimikrobiální aktivitu zde mělo pouze antibiotikum mupirocin v koncentraci 200 μg na disk, které bylo při každém pokusu umístěno doprostřed Petriho misky. Mupirocin sloužil tedy jako kontrola správnosti provedené analýzy. Všechny testované vzorky potenciálně patogenních laktokoků a streptokoků byly na mupirocin citlivé.

Kromě bifidobakterií a mupirocinu bylo ještě testováno mateřské mléko, mateřské mlezivo a lysozym. Předpokládalo se, že tyto látky, které vykazují antimikrobiální aktivitu, budou působit i na vybrané potenciálně patogenní laktokoky a streptokoky. Lysozym byl použit v koncentraci 100 $\mu\text{l/ml}$ a 1000 $\mu\text{l/ml}$.

Po vyhodnocení testování mateřského mléka, mateřského mleziva a lysozymu však nebyla shledána žádná inhibiční zóna vůči potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům.



Obrázek č. 15 Ukázka výsledků difúzní deskové metody.

6.2 Spotová metoda a její modifikace

Na počátku byly otestovány 3 různé metody a jejich modifikace s cílem nalézt nejlepší formu testování všech kmenů bifidobakterií a potenciálně patogenních laktokoků a streptokoků. Jednalo se o metodu spotu, metodu spotu s roztěrem a spotovou metodu pomocí ředící řady. Tento screening byl proveden na vybraných zástupcích, jednalo se o kmeny *B. breve* (BR-03), *B. animalis* subsp. *lactis* (BB-12), *B. stellenboschense* (GLT 48), *B. adolescentis* (GLT8), *B. roussetti* (GLT3), *B. callitrichos* (GLT29), *B. platyrrhinorum* (GLT36), *B. ruminantium* (GLT23), *B. parmae* (GLT66).

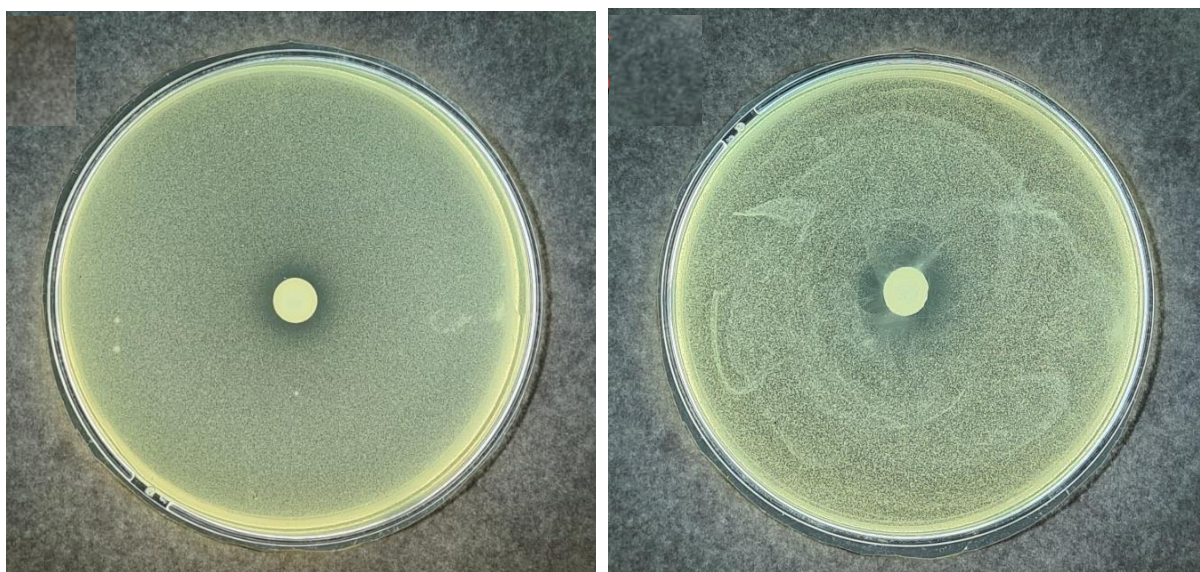
Všechny výše uvedené kmeny (Tabulka č. 4) vykazovaly pozitivní výsledek, tedy inhibiční zónu vůči potenciálním patogenům. Z tohoto důvodu byly pro kontrolu otestovány i potenciálně patogenní streptokoky a laktokoky navzájem. Při testování nebyla shledána žádná antimikrobiální aktivita. Pouze kmen *L. lactis* ATCC 11454 vytvořil inhibiční zónu, a tím tedy i antimikrobiální aktivitu vůči ostatním testovaným potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům, stejně jako testované bifidobakterie.

Zajímavé výsledky byly zaznamenány při testování spotové metody pomocí ředící řady. Opět bylo shledáno velké množství pozitivních výsledků, tedy kmenů inhibujících růst testovaných potenciálně patogenních laktokoků i streptokoků v těsné blízkosti testovaných bifidobakterií (Obrázek č. 17).

Navíc na miskách, kde byly bifidobakterie v nejvyšší koncentraci, testované koky v druhé vrstvě vůbec nenarostly. Také nedocházelo k produkci pigmentu granadaene. Nevýhodou této metody byla časová náročnost přípravy ředící řady a také větší spotřeba materiálu při testování.

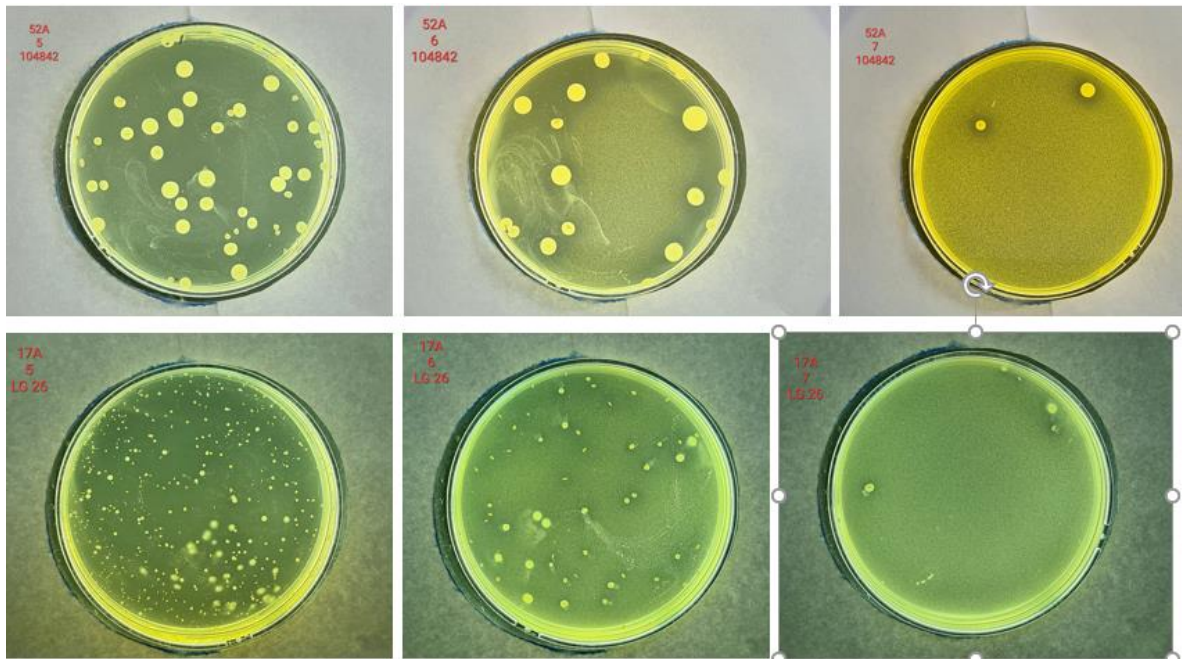
Na základě ověření všech tří výše uvedených metod na souboru vybraných vzorků byla k dotestování zbývajících bifidobakterií vybrána metoda testování formou spotu (Obrázek č. 16). Všechny testované bifidobakterie v okolí spotu inhibovaly růst potenciálně patogenních laktokoků i streptokoků.

Jednalo se však o zóny ve velikosti 1-3 mm od hranice spotu. Podobný výsledek byl zaznamenán u *L. lactis* ATCC 11454, ne však u ostatních laktokoků a streptokoků navzájem.



a) *B. stellenboschense* vs *Lactococcus petauri* b) *B. breve* vs *Lactococcus formosensis*

Obrázek č. 16 Ukázka výsledků metody spotem.



Obrázek č. 17 Ukázka výsledků metody ředící řadou.

7 Diskuze

Rod *Lactococcus* jsou grampozitivní kokoidní mikroorganismy, které se přirozeně nacházejí v trávicím traktu zvířat a lidí. Mohou však způsobovat závažná onemocnění. U zvířat se jedná například o mastitidy skotu a záněty žaber ryb v akvakulturách. Můžeme se setkat i se zoonózami neboli přenosem ze zvířete na člověka. Zdrojem je nejčastěji syrové mléko, sýry nebo rybí maso (Robinson et al. 1999). Taktéž rod *Streptococcus* tvoří grampozitivní, kulovité koky, některé druhy a kmeny mohou být patogenní a jejich výskyt je rozmanitý od člověka po nejrůznější živočichy. Často kolonizují střeva nebo vaginální soustavu žen a rozdělujeme je podle patogenity na: alfa-hemolytické a beta-hemolytické. Pokud má jedinec oslabenou imunitu, mohou být streptokoky původci invazivních onemocnění. Zvířata poté postihují mastitidy a u žen mohou způsobit i předčasný porod (Krzyściak et al. 2013). Zde se často jedná o *S. agalactiae*, který produkuje oranžový pigment granadaene (Rosa-Fraile et al. 2006).

Hmyz je zdrojem živin a nachází se v potravě mnoha různých druhů zvířat, ale i lidí po celém světě. Tím může dojít k ohrožení bezpečnosti potravin, ale i zdraví konzumentů hmyzu. Hmyz je totiž přenašečem potenciálně patogenních mikrobů (Garofalo et al. 2019). Nedávno prezentovaná studie poukazuje, že *Lactococcus graviae* produkující pigment granadaene se vyskytuje také v trávicím traktu opic a zdrojem těchto laktokoků může být právě krmný hmyz (Neuzil-Bunesova et al. 2022). Velká část zkoumaných vzorků laktokoků a bifidobakterií v této práci pocházela ze ZOO Olomouc a byla získána v rámci výše uvedené studie. Kmeny byly izolovány z fekálních vzorků tamarinů zlatých (*Leontopithecus rosalia*) bez zjevných zdravotních obtíží. V experimentu realizovaném v rámci této bakalářské práce bylo zjišťováno, zda významné zastoupení bifidobakterií v trávicím traktu tamarinů zlatých snižuje míru patogenity těchto granadaene produkujících laktokoků (Modrackova et al. 2021).

Nasvědčoval by tomu fakt, že zvířata neměla žádné zdravotní obtíže. Je známo, že bifidobakterie jsou schopny inhibovat patogeny prostřednictvím produkce acetátu a laktátu (Servin 2004), navíc některé bifidobakteriální kmeny produkují bakteriociny (Cotter et al. 2005). Zmíněná produkce acetátu a laktátu by také mohla inhibovat produkci granadaene. Podle výsledků Neuzil-Bunesova et al. (2022) má na produkci pigmentu vliv pH prostředí, ve kterém bakterie roste.

Při testování antimikrobiální aktivity difúzní metodou nebyla nalezena žádná bifidobakterie, která by prokazatelně vytvořila inhibiční zónu, tedy antimikrobiální aktivitu vůči potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům. Správnost testování byla ověřena pomocí mupirocinu. Je to antibiotikum, které funguje na principu baktericidních účinků na široké spektrum bakterií, mezi které patří laktokoky i streptokoky (Sutherland et al. 1985). Jako další kontroly v rámci testování byly použity kultury a supernatanty testovaných koků a další potenciálně antimikrobiální látky. Příkladem je enzym lysozym, který se běžně nachází ve slinách, vaječném bílku nebo v krevní plazmě. Lysozym patří mezi skupinu glukosidáz. Glukosidázy jsou skupiny enzymů, které dokáží štěpit jednotky polysacharidových vazeb.

Lysozym má tedy baktericidní účinky, jelikož buněčná stěna bakterií je složena z polysacharidů – peptidoglykanů (Hilgenfeld & Klemm 2005). Ani v jedné z použitých koncentrací (100 mg/l a 1000 mg/l) lysozymu nebyla zaznamenána viditelná inhibiční zóna.

Dále bylo do testování zahrnuto mateřské mléko a mlezivo, které obsahuje také lysozym a další látky s antimikrobiálním potenciálem (Hilgenfeld & Klemm 2005). Jedná se například o oligosacharidy. Mají schopnost stimulovat růst prospěšných bakterií ve střevech a zároveň působit antimikrobiálně vůči potenciálním patogenům. Fungují na principu složité formy glykanů, které se nestráví a dostanou se až do tlustého střeva. Zde působí na stěnu střev a zabraňují uchycení potenciálních patogenů (Musilová et al. 2015). Byl zde předpoklad, že by mléko nebo mlezivo mohlo zpomalit nebo inhibovat růst potenciálně patogenních laktokoků a streptokoků. Tyto pokusy byly ovšem stejně jako u lysozymu bez pozitivního výsledku. Možná by přineslo lepší výsledek testovat patogeny přímo v mateřském mléce nebo prostřednictvím dilučních metod.

V porovnání s difúzní metodou byla mnohem účinnější spotová metoda, kdy byly testovány její dvě modifikace. Téměř u všech testovaných bifidobakterií v obou modifikovaných metodách byla zaznamenána inhibiční zóna vůči testovaným potenciálním patogenům. Inhibiční zóny dosahovaly velikosti 1-5 mm (šířka zóny od okraje spotu/kolonie), okem byly dobře viditelné. Některé laktokoky byly testovány proti sobě. Antimikrobiálně zde působil pouze kontrolní kmen *Lactococcus lactis* ATCC 11454. Uvedený kmen je znám pro produkci bakteriocinu Nisinu (Millette et al. 2004). Nicméně ani u tohoto kmene nebyl zaznamenán účinek při testování difúzní metodou proti ostatním kokům.

Otázkou však zůstává, zda antimikrobiálně působily primární či sekundární metabolity testovaných bifidobakterií nebo se mohlo jednat o působení například některých komponent bakteriální buňky. Je známo, že bifidobakteriální exopolysacharidy mohou mít antimikrobiální účinky (Shengjie et al. 2014). Obecně však spotové metody oproti difúzním metodám vykazují více pozitivních výsledků. S větším počtem pozitivních výsledků spotové metody oproti difúzní metodě se setkali i autoři Monteiro et al. (2019), kteří se ve své práci zabývali testováním *in vitro* antimikrobiální aktivity a probiotickým potenciálem bifidobakterií a laktobacilů proti některým druhům klostridií.

Pro produkci bakteriocinů musí buňka bakterií dostat impulz nebo být vystavena stresujícím podmínkám (Martinez et al. 2013). V experimentální části byly však testovány supernatanty kultur narostlých v optimálních podmínkách. Nicméně ani aktivní čerstvě narostlé kultury, které byly součástí testování difúzní metodou, nevykazovaly antimikrobiální účinek ve formě inhibiční zóny. Stále zde však může být skrytý potenciál produkce bakteriocinů v případě optimalizace metodiky.

8 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo zpracovat přehled, týkající se problematiky antimikrobiální aktivity testovaných bifidobakterií vůči potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům. Byla stanovena hypotéza s předpokladem, že u testovaných druhů bifidobakterií bude detekována antimikrobiální aktivita vůči uvedeným patogenům.

Hypotéza, která byla předpokládána, se potvrdila. Byla nalezena antimikrobiální aktivita bifidobakterií vůči potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům. Nejen bifidobakterie izolované z tamarínů zlatých, ale i další bifidobakterie s probiotickým potenciálem inhibovaly růst streptokoků i laktokoků, a to nejen izolátů ze zmíněných jedinců. Pozitivní výsledky byly zaznamenány u spotové metody a jejích modifikací. V případě difúzní metody se výsledek nepotvrdil, nicméně by bylo vhodné zařadit do testování kontrolní bakteriální kmen s prokázanou produkcí bakteriocinu, který působí proti potenciálně patogenním laktokokům a streptokokům. Také by bylo vhodné podpořit u testovaných kmenů případnou produkci antimikrobiálních látek složením kultivačních médií a vstupními substráty nebo některými stresovými faktory, například změnou teploty nebo pH.

Pochopení mechanismů antimikrobiální aktivity bifidobakterií vůči patogenním kokům by mohlo být využito cíleně při jejich regulaci v lidské i zvířecí mikrobiotě nebo také v potravinářství.

Zpracováním této bakalářské práce jsem se blíže seznámila s danou problematikou a se zajímavou prací v laboratoři. Práce pro mě byla velkým přínosem a díky tomu jsem získala cenné poznatky, které budu moci využít ve svém dalším studiu.

9 Seznam použité literatury

- Abrahamsson T, Wu R, Jenmalm M. 2015. Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatr Res* **77**: 214–219. DOI: 10.1038/pr.2014.165.
- Almeida A. et al. 2021. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol* **39**:105–114. DOI: 10.1038/s41587-020-0603-3.
- Anand SK, Srinivasan RA, Rao LK. 1984. Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-I. *Cult Dairy Prod J.* **2**:6-7.
- Armistead B, Whidbey C, Iyer LM, Herrero-Foncubierta P, Quach P, Haidour A, Aravind L, Cuerva JM, Jaspán HB, Rajagopal L. 2020. The *cyl* Genes Reveal the Biosynthetic and Evolutionary Origins of the Group B *Streptococcus Hemolytic Lipid*, Granadaene. *Frontiers in Microbiology* DOI: 10.3389/fmicb.2019.03123.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **2**:71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Baron S. 1996. *Medical Microbiology*. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. 2012. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* **61**:160-174. DOI: 10.1159/000342079.
- Bezoušková K. 2019. Hodnocení bazických alkylarylkarbamátů proti enterokokům [MSc. Thesis], Veterinární univerzita Brno, Brno (2019).
- Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* **4(3)**:144-54. DOI: 10.1016/S14733099(04)00938-7.
- Bottacini F, Ventura M, van Sinderen D. et al. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microb Cell Fact* **13** (Suppl 1). DOI: 10.1186/1475-2859-13-S1-S4.
- Casalta E, Montel MC. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* **126**:271–273. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.013.
- CLSI Methods of Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline, M26, V. 19, No. 18, 1999. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

Coelho MC, Malcata FX, Silva CCG. 2022. Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods* **11(15)**:2276. DOI: 10.3390/foods11152276.

Conde-Martínez N, Acosta-González A, Díaz LE, Tello E. 2017. Use of a mixed Culture strategy to isolate halophilic bacteria with antibacterial and cytotoxic activity from the Manaure solar saltern in Colombia. *BMC Microbiol* **17**:230. DOI: 10.1186/s12866-017-1136x.

Cotter PD, Hill C, Ross PR. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* **3(10)**:177-188. DOI: 10.1038/nrmicro1273.

De Almada CN, Nunes de Almada C, Martinez RCR, Sant'Ana A de S. 2015. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Appl Microbiol Biotechnol* **99(10)**:4175-4199. DOI: 10.1007/s00253-015-6582-5.

Delgado S, Guadamuro L, Flórez AB, Vázquez L, Mayo B. 2019. Fermentation of commercial soy beverages with lactobacilli and bifidobacteria strains featuring high β -glucosidase activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **51**:148-155. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.03.018.

Devika NT, Raman K. 2019. Deciphering the metabolic capabilities of Bifidobacteria using genome-scale metabolic models. *Scientific Reports* **9**:1-9. DOI: 10.1038/s41598-019-546969.

Garofalo C, Milanović V, Cardinali F, Aquilanti L, Clementi F, Osimani A. 2019. Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. *Food Res Int.* **125**:108527. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108527.

Gibson GR, Probert HM, Loo J Van, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* **17(2)**:259-275. DOI:10.1079/NRR200479.

Goodman LB, Lawton MR, Franklin-Guild RJ, Anderson RR, Schaan L, Thachil AJ, Wiedmann M, Miller CB, Alcaine SD, Kovac J. 2017. *Lactococcus petauri* sp. nov., isolated from an abscess of a sugar glider. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **67**:4397-4404. DOI:10.1099/ijsem.0.002303.

Göpfertová D. 1999. *Epidemiologie: [přůvodce epidemiologickou metodou]*. Triton, Praha.

Hill C. et al. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **11(8)**:506-14. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66.

Hilgenfeld R, Klemm D. 2005. The crystal structure of a bacterial lysozyme at atomic resolution: Dissertation. Chemisch – Geowissenschaftlichen Fakultät der Fridrich – Schiller – Universität Jen, Jen.

Chao CT, Lai CF, Huang JW. 2013. *Lactococcus garvieae* peritoneal dialysis peritonitis. *Perit Dial Int* **33(1)**:100-1. DOI: 10.3747/pdi.2012.00078.

Cheikhoussef A, Pogori N, Chen W, Zhang H. 2008. Antimicrobial proteinaceous Compounds obtained from bifidobacteria. From production to their application. *Int J Food Microbiol* **125(3)**:215-22. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.012.

Chen YS, Otaguro M, Lin YH, Pan SF, Ji SH, Yu CR, Liou MS, Chang YC, Wu HC, Yanagida F. 2014. *Lactococcus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:146-151. DOI: 10.1099/ijs.0.052811-0.

Johnson JR, Russo TA. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*.” *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **139(3)**:155-162. DOI: 10.1067/mlc.2002.121550.

Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* **49(11)**:1749-1755. DOI: 0.1086/647952.

Kang KH, Shin HJ, Park YH, Lee TS. 1989. Studies on the antibacterial substances produced By lactic acid bacteria: purification and some properties of antibacterial substance “Bifilong” produced by *B. longum*. *Food Control, Korea*.

Kittnar O. 2011. *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha.

Krishnan M, Dey DK, Sharma C, Kang SC. 2019. Antibacterial activity of *Weissella confusa* by disc diffusion method. *Bangladesh Journal of Pharmacology* **14**:117–122. DOI: 10.3329/bjp.v14i3.41545.

Krzyściak W, Pluskwa KK, Jurczak A, Kościelniak D. 2013. The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **32(11)**:1361-1376. DOI: 10.1007/s10096013-1914-9.

Kumar R, Shrivastava SK, Chakraborti A. 2010. Comparison of Broth Dilution and Disc Diffusion Method for the Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus flavus*. *American Journal of Biomedical Sciences* **2(3)**: 202-208. DOI: 10.5099/aj100300202.

Kyselá V. 2019. Hodnocení antimikrobiálních účinků tuhých a práškových nanokompozitů na vybraných kmenech, [BSc. Thesis], Ostravská univerzita, Ostrava.

Lata J, Juránková J. 2011. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých Interních chorob. *Interní Med.* **13(2)**: 63–69.

Lee JH, Li X, O'Sullivan DJ. 2011. Transcription analysis of a lantibiotic gene cluster from *Bifidobacterium longum* DJO10A. *Appl Environ Microbiol* **77**:5879-5887. DOI: 10.1128/AEM.00571-11.

Lee W bin, Fu CY, Chang WH, You HL, Wang CH, Lee MS, Lee G bin. 2017. A microfluidic device for antimicrobial susceptibility testing based on a broth dilution method. *Biosensors and Bioelectronics* **87**:669–678. DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.008.

Lim HJ, Shin HS. 2021. Antimicrobial and immunomodulatory effects of bifidobacterium strains: A review. *Korean Society for Microbiolog and Biotechnology* **30(12)**:1793-1800. DOI: 10.4014/jmb.2007.07046.

Luckner M. 1984. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. *Biochem. Educ.*, Berlin.

Mahdi LH, Auda IG, Ali IM, Alsaadi LG, Zwain LAH. 2018. Antibacterial activity of a novel characterized and purified bacteriocin extracted from *Bifidobacterium adolescentis*. *Reviews and Research in Medical Microbiology* **29**:73–80. DOI: 10.1097/MRM.000000000000128.

Martinez FAC, Balciunas EM, Converti A, Cotter PD, de Souza Oliveira RP. 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol Adv.* **31(4)**:482-488. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.010.

Maxa V, Rada V. 1996. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha.

Mayo B, Sinderen D. 2010. *Bifidobacteria: Genomics and molecular aspects*. Caister Academic Press, Norfolk.

Millette M, Smoragiewicz W, Lacroix M. 2004. Antimicrobial Potential of Immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against Selected Bacteria. *Journal of Food Protection* **67**:1184–1189. DOI: 10.4315/0362-028x-67.6.1184.

Modrackova N, Stovicek A, Burtscher J, Bolechova P, Killer J, Domig KJ, Neuzil-Bunesova, V. 2021. The bifidobacterial distribution in the microbiome of captive primates reflects parvorder and feed specialization of the host. *Scientific Reports* **11(1)**:15273. DOI: 10.1038/s41598-021-94824y.

Monteiro CRAV, do Carmo MS, Melo BO, Alves MS, dos Santos CI, Monteiro SG, Bomfim MRQ, Fernandes ES, Monteiro-Neto V. 2019. In vitro antimicrobial activity and probiotic

potential of bifidobacterium and lactobacillus against species of clostridium. *Nutrients* **11(2)**:448. DOI: 10.3390/nu11020448.

Musilova S, Rada V, Vlkova E, Bunesova V. 2014. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Benef Microbes* **5(3)**:273-283. DOI: 10.3920/BM2013.0080.

Neuzil-Bunesova V, Ramirez Garcia A, Modrackova N, Makovska M, Sabolova M, Spröer C, Bunk B, Blom J, Schwab C. 2022. Feed Insects as a Reservoir of Granadaene-Producing Lactococci. *Front. Microbiol.* **13**:848490. DOI: 10.3389/fmicb.2022.848490.

O'Callaghan A, van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers Media S.A.* **15**:925. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00925.

Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences. 2012. 6. Slovakia: HACCP Consulting s.r.o., Slovakia, www.haccp.sk.

Robinson RK, Batt C, Patel P. 1999. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Berkshire.

Rosa-Fraile M, Rodríguez-Granger J, Haidour-Benamin A, Cuerva JM, Sampedro A. 2006. Granadaene: proposed structure of the group B Streptococcus polyenic pigment. *Appl Environ Microbiol.* **72(9)**:6367-6370. DOI: 10.1128/AEM.00756-06.

Ruiz L, Delgado S, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. 2017. Bifidobacteria and their molecular communication with the immune system. *Frontiers Media S.A.* **8**:2345. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02345.

Saleh FA, El-Sayed EM. 2004. Isolation and characterization of bacteriocins produced by *Bifidobacterium lactis* BB-12 and *Bifidobacterium longum* BB-46 9th Egyptian Conference For Dairy Science and Technology, Research Papers, Cairo **9**:323-337. DOI: 10.13140/2.1.3107.5524.

Sarquis MA, Siroli L, Modesto M, Patrignani F, Lanciotti R, Mattarelli P, Reinheimer J, Burns P. 2019. Novel bifidobacteria strains isolated from nonconventional sources. Technological, antimicrobial and biological characterization for their use as probiotics, *Journal of Applied Microbiology*, **4**:1207–1218, DOI: 10.1111/jam.14367.

Servin AL. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* **28(4)**:405-40. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.01.003.

Shengjie L, Renhui H, Nagendra P. Shah, Xueying T, Yonghua X, Hua W. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03

and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science* **12**:7334-7343. DOI: 0.3168/jds.2014-7912.

Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. 2005. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology* **99**(3):493-501. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02648.x.

Snyder AB, Worobo RW. 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J Sci Food Agric* **15**(94):28-44. DOI: 10.1002/jsfa.6293.

Song AAL, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. 2017. A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. *Microb Cell Fact* **16**(1):55. DOI: 10.1186/s12934-017-0669-x.

Souza EL de, Silva CA da, Sousa CP de. 2005. Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**:559–566. DOI: 10.1590/S1516-89132005000500008.

Sutherland R, Boon RJ, Griffin KE, Masters PJ, Slocombe B, White AR. 1985. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob. Agents Chemother* **27**:495-498. DOI: 10.1128/AAC.27.4.495.

Tamarin-zlaty. In: *ZOOLOMOUC: ZOOLOGICKÁ ZÁHRADA OLOMOUC* [online]. Olomouc. Dostupné z: https://www.zoolomouc.cz/sites/default/files/images/animalcard/dsc_5980_1.jpg.

Teuber M. 1995. The genus *Lactococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (eds) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. The Lactic Acid Bacteria, Springer, Boston, MA. DOI: 10.1007/97814615-5817-0_6.

Urbanczyk H, Ast JC, Dunlap PV. 2010. Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *Phylogeny, Genomics and Symbiosis of Photobacterium*. *FEMS Microbiology Reviews* **35**: 32442. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x.

Von Ah U. 2006. Identification of *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 isolated from baby faeces and partial purification of its bacteriocin. Culture. [PhD. Thesis], Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.

Vrbová L. 2020. Hodnocení antimikrobiálních vlastností nově vyvíjených kompozitních Materiálů [MSc. Thesis], Ostravská univerzita, Ostrava.

Yildirim Z, Winters D, Johnson M. 1999. Purification, amino acid sequence and mode of Action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454J. *Appl Microbiol* **86**:45-54. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00629.x.