



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

CHARAKTERIZACE ADSORBČNÍCH VLASTNOSTÍ PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ

CHARACTERIZATION OF ADSORPTION PROPERTIES OF PROBIOTIC BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Klára Černá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1132/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Klára Černá**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Charakterizace adsorbčních vlastností probiotických bakterií

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Kultivace probiotických bakterií
3. Optimalizace metod pro stanovení povrchových vlastostí probiotických bakterií
4. Stanovení adsorbčních vlastností probiotických bakterií na různé povrchy

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Klára Černá
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce je charakterizace adsorbčních vlastností probiotických bakterií. Charakterizace byla provedena pomocí navržené a zoptimalizované spektrofotometrické metody stanovení adheze probiotických bakterií k mucinu, jakožto hlavní viskoelastické složce hlenu, která byla nedílnou součástí experimentální části práce. Za účelem detailnějšího popisu adhezních interakcí, podílejících se na adhezi probiotických bakterií k mucinu, byla stanovena pomocí průtokové cytometrie viabilita vybraných probiotických bakteriálních kmenů: *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium breve* CCM 7825, *Bacillus coagulans* CCM 2658 a potencionálního probiotického kmene *Lactobacillus zeae* CCM 7069. U zmíněných bakterií byl také stanoven hydrofobní efekt pomocí BATH (bakteriální adheze k uhlovodíkům) experimentu. Poslední navrženou a zoptimalizovanou technikou byl dynamický a elektroforetický rozptyl světla charakterizující povrchové vlastnosti jako ζ -potenciál, průměrná distribuce velikosti a izoelektrický bod. Z této metody byly získány informace o agregaci bakteriálních buněk a o elektrostatických interakcích. Kombinací těchto metod byla charakterizována adheze, jako velmi specifický, senzitivní a klíčový parametr úspěšného probiotického mikroorganismu, který je ovlivňován rozličnými vlivy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Adsorpce, fyzikální a chemické interakce, probiotické bakterie, mucin, spektrofotometrie, BATH, průtoková cytometrie, dynamický a elektroforetický rozptyl světla, izoelektrický bod

ABSTRACT

The aim of the diploma thesis is to characterize the adsorption properties of probiotic bacteria. Characterization was performed using of designed and optimized spectrophotometric method of determination of adhesion of probiotic bacteria to mucin as the main viscoelastic component of mucus. In order to provide a more detailed description of the adhesion interactions involved in the adhesion of probiotic bacteria to mucin, the viability of selected probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium breve* CCM 7825, *Bacillus coagulans* CCM 2658 and a potential probiotic strain of *Lactobacillus zeae* CCM 7069. Moreover, bacterial adhesion to carbohydrates was also determined for all the bacteria tested. The last proposed and optimized technique was dynamic and electrophoretic light scattering characterizing surface properties such as ζ -potential, average size distribution and isoelectric point. From this method, information was obtained on aggregation of bacterial cells and on electrostatic interactions. The combination of these methods was used as a complex tool to characterize adhesion of the tested bacterial cultures as a very specific, sensitive and key parameter of a successful probiotic microorganism that is influence by the multiple effects.

KEY WORDS

Adsorption, physical and chemical interactions, probiotic bacteria, mucin, spectrophotometry, BATH, flow cytometry, dynamic and electrophoretic light scattering, isoelectric point

ČERNÁ, K. *Charakterizace adsorbčních vlastností probiotických bakterií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 87 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Bc. Klára Černá

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla především poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za konzultace ke studované problematice ať k experimentální či teoretické části práce, za rady v průběhu experimentální činnosti a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat konzultance mé práce Ing. Evě Fryšové za ochotu, pomoc při zpracování experimentální části a za cenné rady při psaní diplomové práce. Ing. Evě Slaninové chci poděkovat za pomoc v laboratoři především, co se týče mikrobiologické práce a cenné rady k obsluze Zetasizeru Nano ZS. Také chci poděkovat Ing. Lucii Müllerové za pomoc s obsluhou průtokového cytometru. Velké poděkování patří i mé rodině a mým přátelům za podporu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1	Adsorpce.....	11
2.1.1	Charakterizace adsorpce.....	11
2.1.1.1	Fyzikální adsorpce (fyzisorpce).....	13
2.1.1.2	Chemická adsorpce (chemisorpce).....	13
2.2	Fyzikální popis mikrobiální adheze.....	14
2.2.1	DLVO teorie.....	15
2.2.2	Rozšířená XDLVO teorie.....	16
2.3	Probiotické bakterie.....	17
2.3.1	Vlastnosti probiotických bakterií.....	18
2.3.1.1	Odolnost vůči pH stresu.....	19
2.3.1.2	Antimikrobiální aktivita.....	19
2.3.1.3	Mikrobiální adheze – biologický popis.....	20
2.4	Klasifikace probiotických bakterií.....	22
2.4.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	23
2.5	Výskyt probiotických mikroorganismů v lidském těle.....	25
2.5.1	Gastrointestinální trakt (GIT).....	25
2.5.1.1	Mucin.....	26
2.6	Mechanismus účinku probiotických bakterií.....	28
2.6.1	Příznivé účinky probiotik na člověka.....	30
2.7	Biofilm.....	32
2.7.1	Tvorba biofilmu v GIT.....	33
2.7.2	Probiotické bakterie tvořící biofilm.....	33
2.8	Screening nových bakteriálních kmenů především z pohledu adhezních vlastností....	34
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje.....	37
3.1.1	Vybrané probiotické bakteriální kmeny.....	37
3.1.2	Chemikálie.....	37
3.1.3	Přístroje a zařízení.....	37
3.2	Uchovávání zdrojových bakteriálních kultur.....	38
3.3	Kultivace vybraných probiotických kmenů.....	39

3.4	Optimalizace spektrofotometrické metody ke stanovení bakteriální adheze k mucinu	39
3.4.1	Příprava roztoků využitých při optimalizaci metody	39
3.4.2	Příprava vzorků bakteriálních kultur	40
3.4.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a sedimentace vybraných bakterií	40
3.4.4	Pilotní stanovení rozpustnosti mucinu	41
3.4.5	Příprava roztoku mucinu	41
3.4.6	Stanovení absorpčního spektra mucinu	41
3.4.7	Studium adheze buněk na mucin	42
3.4.7.1	Optimalizace metody	42
3.4.8	Stanovení viability vybraných bakteriálních kultur	43
3.4.9	Verifikace metody pomocí vybraných bakterií	43
3.5	Charakterizace vlivů ovlivňujících mikrobiální adhezi na mucin	43
3.5.1	Vliv koncentrace mucinu při kultivaci <i>L. rhamnosus</i>	43
3.5.2	Vliv teploty inkubace na adhezní vlastnosti <i>L. rhamnosus</i>	44
3.5.3	Vliv pH a iontové síly prostředí na adhezní vlastnosti <i>L. rhamnosus</i>	44
3.6	Charakterizace adheze <i>L. rhamnosus</i> v různých fázích kultivace	44
3.6.1	Gravimetrické stanovení růstové křivky <i>L. rhamnosus</i>	44
3.7	BATH metoda	45
3.8	Stanovení ζ -potenciálu a průměrné distribuce velikosti vybraných bakteriálních kmenů a mucinu	46
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
4.1	Optimalizace metody adheze probiotických bakterií na mucin	47
4.1.1	Stanovení koncentrace a rychlosti sedimentace bakteriálních buněk ve vzorku	47
4.1.2	Spektrofotometrické stanovení rozpustnosti mucinu	48
4.1.3	Spektrofotometrické stanovení absorpčního spektra mucinu	49
4.1.4	Pilotní experiment adheze vybraných probiotických bakterií na mucin	51
4.1.5	Optimalizace metody	51
4.2	Stanovení možných vlivů působících na adsorbční vlastnosti <i>L. rhamnosus</i>	55
4.2.1	Vliv mucinu při kultivaci na adhezi <i>L. rhamnosus</i> k mucinu	55
4.2.2	Vliv teploty inkubace <i>L. rhamnosus</i> s mucinem na adsorbční vlastnosti	56
4.2.3	Vliv pH a iontové síly prostředí na adsorbční vlastnosti <i>L. rhamnosus</i>	57
4.2.3.1	Vliv pH na mikrobiální adhezi k mucinu	59
4.2.3.2	Vliv iontové síly na mikrobiální adhezi k mucinu	60

4.3	Stanovení adsorbčních vlastností <i>L. rhamnosus</i> v různých fázích růstu	61
4.4	Charakterizace adsorbčních vlastností vybraných probiotických bakterií	63
5	ZÁVĚR.....	72
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	85
7.1	Seznam použitých zkratek	85
7.2	Seznam použitých symbolů.....	87

1 ÚVOD

Gastrointestinální trakt (GIT) jedince před porodem je naprosto sterilní, teprve při samotném porodu se kontaktem s matčíným tělem mikrobiálně osídluje (z vagíny, z konečníku, kojením). Pokud porod neproběhne přirozeným způsobem, tak mikroflóra dítěte vykazuje odlišné složení bakterií, protože dítě nepřichází do kontaktu s matkou, nýbrž s okolním prostředím. Novorozencům narozeným tímto způsobem pak po zbytek života obvykle chybí určitý druh bakterie. Během života jedince se složení mikroflóry nadále individuálně mění, jak příznivě, tak nepříznivě, a u dospělého zdravého jedince mikroflóra obsahuje v řádu 10^{13} až 10^{14} buněk mikroorganismů s rozsahem stovek až tisíců druhů. Na základě přibývajících studií je stále jasnější, že tyto bakterie nejsou pouze komenzály, ale spojily se s lidským tělem ve skutečný symbiotický vztah. Nicméně existují rizikové faktory různého druhu vedoucí ke zdravotním obtížím, nemocím nebo k narušení imunitního systému. Na ochranu lidského zdraví se proto po mnoho staletí využívají prospěšné mikroorganismy vyskytující se ve fermentovaných a konzervovaných potravinách s účelem zlepšit rovnováhu mezi mikroorganismy především v GIT. V novodobém světě byla zjištěna existence těchto mikroorganismů nejenom v potravinách, nýbrž i v lidském a zvířecím organismu, a tyto prospěšné mikroorganismy vykazující příznivé účinky na lidské zdraví (v rámci prevence i v léčbě onemocnění) byly definovány jako probiotika.

Probiotický výzkum má za cíl charakterizovat druhové složení a koncentraci různých bakterií v jednotlivých částech GIT, a to především u zdravé střevní mikroflóry jedince. Dalším cílem je porozumět interakcím mezi mikrobem a sliznicí střev, mezi jednotlivými mikroby v rámci mikrobiologie a porozumět antimikrobiálním a imunitním mechanismům, které přispívají k příznivým účinkům probiotik. Na základě těchto studií vznikají závěry umožňující využívat mikroorganismy jako mikrobiologický nástroj pro specifická onemocnění. Na základě výsledků z těchto studií se vyrábí komerčně dostupné přípravky obsahující specifické mikroorganismy, které poskytují příznivé a zdravotně nezávadné účinky v místě poruchy jako je tomu například u syndromu dráždivého střeva (IBS).

Probiotické bakterie zastupují jak gram-pozitivní tak gram-negativní bakterie a kvasinky (např. *Saccharomyces boulardi*). Jedním z nejrozšířenějších mikrobiálních rodů vyskytující se v dostupných probiotických přípravcích je rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Zmíněné bakterie vykazují nezbytné mechanismy zapříčiňující jejich příznivý účinek a mezi klíčový a první krok se považuje adheze k intestinálnímu epitelu následována kolonizací tkáně. Epitelová tkáň živočichů včetně člověka je pokrytá hydrogelem – hlenem – obsahující glykoproteiny, lipidy, soli, DNA, enzymy a buněčný odpad. Hlavní složku této hydrogelové komponenty představují muciny zahrnující 50–90 % O-vázaných glykanů (vztaženo na hmotnost molekul mucinu). Muciny jsou buď sekretované nebo membránové, nicméně oba tyto druhy poskytují ochranu epitelu proti extracelulárnímu prostředí a představují hlavní komponentu pro mikrobiální adhezi. Nicméně adheze probiotických mikroorganismů, ať již z fyzikálního, či biologického přístupu, je velmi kmenově specifická a navíc závisí na mnoha faktorech, jako je pH, iontová síla, bakteriální pohyblivost, viabilita, stav růstu a růstové faktory atd.

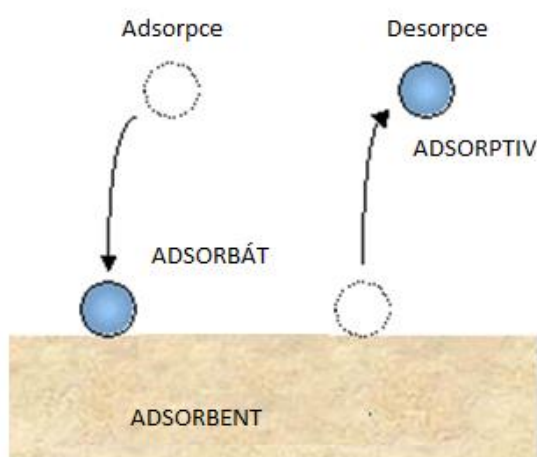
Predikce mechanismů příznivých účinků včetně adheze na intestinální mucin nejsou prozatím zcela jasně definované, proto se tato diplomová práce především v experimentální části zabývá charakterizací adsorpce a adsorbčních interakcí probiotických bakterií. V budoucnosti by lepší pochopení této problematiky mohlo dosáhnout specifitějšího výběru probiotických kmenů, ale také by mohly otevřít cestu k výzkumu nových probiotických vlastností příznivě ovlivňujících lidské zdraví, což je důležité pro naši populaci, neboť zdraví máme v životě jen jedno.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Adsorpce

Adsorpcí je označován jev, kdy jsou molekuly a atomy vázány na fázovém rozhraní působením mezimolekulových interakcí. Obvykle se za adsorpci považuje pozitivní adsorpce, při níž se jedná o samovolné zvyšování koncentrace látky v oblasti rozhraní a tedy snižování koncentrace látky v oblasti objemové fáze. Důsledkem je následné snížení mezifázové, nebo-li povrchové energie. Termínem negativní adsorpce se naopak označuje snižování koncentrace látky na rozhraní a obvykle se využívá označení desorpce. Adsorpci dále rozlišujeme na základě typu fázového rozhraní na adsorpci na pohyblivých rozhraních, kdy mezifází je kapalina-plyn, případně dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, a na adsorpci na tuhém fázovém rozhraní tvořenou fází kapalina-pevná látka, nebo plyn-pevná látka. Adsorpce na tuhém fázovém rozhraní se využívá jako nejčastější příklad adsorpce [1, 2, 3].

Látka, která se adsorbuje z kapalné či plynné fáze se nazývá adsorbát a tuhá fáze, na které dochází k adsorpci, se označuje termínem adsorbent. Termínem adsorptiva se označují veškeré látky schopné adsorpce na jakýkoliv druh sorbentu (viz obr. 1). V rámci studia biochemických interakcí v přítomnosti živých systémů bývá adsorpce často nahrazovaná pojmem adheze, při které dochází k přilnavosti působením přitažlivých sil mezi atomy nebo molekulami na tuhou látku a dalo by se zjednodušeně říci, že se jedná o jakýsi prvotní krok adsorpce [1, 3].

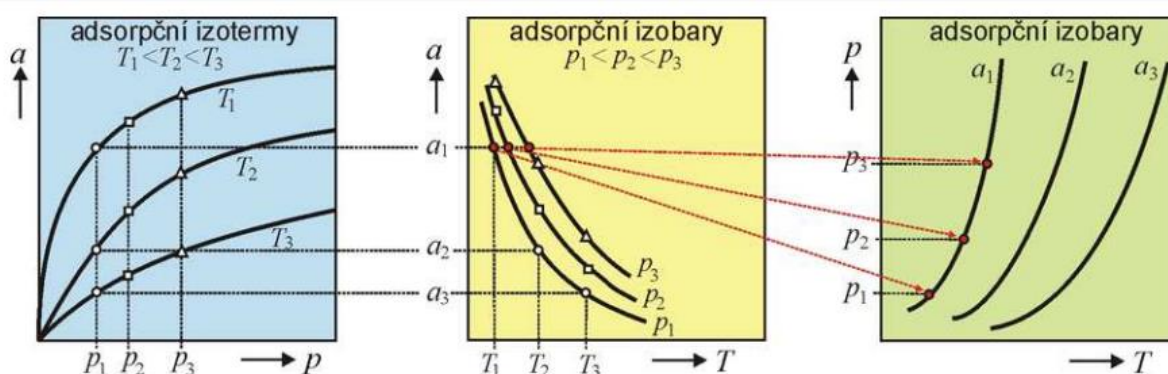


Obr. 1: Definice termínu adsorpce [4].

2.1.1 Charakterizace adsorpce

Adsorbované množství a ovlivňuje teplota, parciální tlak sorbující se složky a vlastnosti adsorbentu. Obvykle bývá vyjadřováno v molech, avšak v některých případech se setkáváme i s vyjádřením této proměnné v jednotkách hmotnosti či objemu naadsorbované substance. Jelikož je obtížné stanovit povrch sorbentu, musí se tato veličina vždy přepočítávat na hmotnost použitého sorbentu [2]. Adsorpce je obecně účinnější při nižších teplotách, jelikož dochází k exotermní reakci, tedy k přeměně kinetické energie částic zachycujících se na povrchu na teplo. Navíc teplo vzniká i v průběhu ubývání volných vazebných míst na povrchu sorbentu [3].

Mezi adsorbčním filmem a druhou fází (plynnou/kapalnou) se ustanovuje tzv. adsorbční rovnováha, při které je buď rovnovážné množství naadsorbované látky (relativní adsorpce) úměrné tlaku plynu při konstantní teplotě nebo je rovnovážné množství naadsorbované látky úměrné koncentraci při konstantní teplotě v případě, že se jedná o adsorpci látky z roztoku. Tato závislost je označována jako adsorbční izoterma, která je pro charakterizaci adsorpce nejčastěji používaná. V rámci charakterizace adsorbovaného množství se také experimentálně stanovují izobary vyjadřující závislost adsorbovaného množství na teplotě za konstantního tlaku nebo se stanovují izostery vyjadřující teplotní závislost rovnovážného tlaku plynu adsorbujícího se na pevném sorbentu při konstantním adsorbovaném množství (viz obr. 2) [1, 2, 3].



Obr. 2: Grafické znázornění adsorpce [2].

Pro charakterizaci adsorbovaného množství v závislosti na teplotě za konstantního tlaku pro fázové rozhraní plyn-pevná látka a kapalina-pevná látka se využívá Freundlichova, Langmuirova a BET (**B**runauer, **E**mmet a **T**eller) izoterma, kdy hodnoty jejich konstant je nutné individuálně experimentálně stanovovat [1, 2]. Dále byla odvozena základní Gibbsova adsorbční izoterma, která je obecně platná pro všechna fázová rozhraní:

$$\Gamma = -\frac{c}{RT} \cdot \frac{d\gamma}{dc}, \quad (1)$$

kde c je koncentrace v objemu, R je univerzální plynová konstanta, T je teplota a Γ je relativní adsorpce [2].

Pro pozitivní adsorpci dále platí empirická Szyszkowského rovnice popisující závislost povrchového napětí vodných roztoků organických látek na koncentraci:

$$\gamma = \gamma_0 - a \cdot \log(1 + bc), \quad (2)$$

kde c je koncentrace v objemu, γ_0 je povrchové napětí čistého rozpouštědla, γ je povrchové napětí roztoku a a, b , jsou konstanty [2].

Kombinací těchto dvou rovnic dostáváme konečný tvar Gibbsovy rovnice [2]:

$$\Gamma = \frac{a}{2,303RT} \cdot \frac{bc}{1 + bc}. \quad (3)$$

2.1.1.1 Fyzikální adsorpce (fyzisorpce)

Fyzisorpce je zapříčiněna fyzikálními nekovalentními interakcemi mezi adsorbátem a adsorbentem. Zde se vyskytují síly, které jsou relativně slabé a vratné z důvodu nízké aktivační energie. Mezi tyto interakce se nejčastěji zařazují vodíkové můstky, elektrostatické interakce, van der Waalsovy interakce a hydrofobní efekt [1, 5].

Vodíkové vazby vznikají mezi dvěma elektronegativními atomy, kdy jeden z partnerů je donorem vodíku a druhý akceptorem s volným elektronovým párem. Při této interakci hrají důležitou roli elektrostatické interakce umožňující vznik tzv. vodíkového můstku [5, 6].

Elektrostatické interakce zahrnují veškeré interakce, které se řídí Coulombovým zákonem. Tedy jejich energie závisí na velikosti nábojů a permitivitě prostředí. Jedná se o přitažlivé nebo odpuzivé interakce nábojů nebo permanentních dipólů a představují interakce středního až dalekého dosahu, jejichž síla klesá s druhou mocninou jejich vzdálenosti. Tyto interakce jsou obecně považovány za nejsilnější nekovalentní interakce [5, 6].

Van der Waalsovy interakce (vdW) jsou označovány za slabé interakce, avšak dalekého dosahu. Nicméně jejich podstata taktéž závisí na elektrickém přitahování a odpuzování, nicméně ne v rámci celistvých nábojů jak je tomu u coulombických sil. Zjednodušeně lze tyto nekovalentní interakce definovat jako všechny interakce, které nejsou zahrnuty v rámci elektrostatických a vodíkových interakcí, a taktéž nejsou zahrnuty do hydrofobního efektu [5].

Hydrofobní efekt umožňuje nepolárním molekulám se shlukovat ve vodném roztoku pomocí dvou příspěvků. Z entalpického hlediska se jedná o vdW interakce mezi nepolárními molekulami, avšak převládající je efekt entropický, který je řízený. Celková entropie při hydrofobním efektu vzrůstá, protože v oblasti hydrofobních skupin se musí molekuly vody oddělit od nepolárních molekul zpět do chaotického vodného prostředí. Tento efekt vykazuje středně silné síly dalekého dosahu [5].

Jelikož se jedná o širokou skupinu interakcí, tak jsou přítomny u všech druhů částic. Z tohoto důvodu není fyzikální adsorpce specifická a její pole působnosti je na celém povrchu adsorbentu. Dalším charakteristickým jevem fyzikální adsorpce je její vysoká rychlost (v rámci několika sekund) a možnost tvoření vícevrstvé adsorpce a to tak, že se na již vytvořeném adsorbčním filmu vytvoří další vrstva pomocí fyzikálních sil [1, 2]. Ve fázovém rozhraní kapalina-pevná látka např. dochází k tzv. molekulární adsorpci, vznikající na principu právě fyzisorpce. Principiálně se jedná o zachycování celých molekul případně o zachycování obou druhů iontů v elektrolytu ve stejném rozsahu. Měření zmíněné adsorpce probíhá při ustanovení adsorbční rovnováhy, kdy se detekuje změna v koncentraci látky v roztoku [2].

2.1.1.2 Chemická adsorpce (chemisorpce)

Chemisorpce se odlišuje od fyzisorpce především tím, že molekuly jsou k povrchu sorbentu vázány chemickou vazbou, zpravidla kovalentní. Tato adsorpce je specifická a to v závislosti na určitém místě tzv. aktivním centru na povrchu adsorbentu, které umožňuje vytvoření chemické vazby. Jedná se o síly krátkého dosahu a jsou daleko silnější, než nekovalentní

vazby. Interakce mezi sorbentem a sorbátem je pomalejší, než v případě fyzisorpce a není možné tvořit pomocí kovalentních sil vícevrstvé filmy, avšak na vzniklou monovrstvu mohou být další vrstvy tvořeny fyzikálními silami [1, 2].

2.2 Fyzikální popis mikrobiální adheze

Objasnění přilnavosti mikroorganismů, nejčastěji bakterií, k různým rozhraním (abiotickým či biotickým povrchům) je v současnosti předmětem rozsáhlých výzkumů. Tento fyzikální jev upoutání jedné planktonické buňky k určitému substrátu následně vede ke kolonizačním a agregačním procesům, a k finální tvorbě složité povrchové komunity tzv. biofilmu (více o biofilmu v kapitole 2.7) [7, 8]. Předpokládá se, že první fáze adheze je podnícená fyzikálními vratnými interakcemi snižující mezifázovou energii a/nebo je způsobena chemickými interakcemi mezi planktonickou buňkou a substrátem. Sekundární fází se označuje biologický popis adheze způsobující trvalé a nevratné připoutání k povrchu specifickými interakcemi vyžadující inkubaci často i na několik hodin (viz 2.3.1.3). Fyzikálně-chemická charakteristika primární fáze je odlišná pro biotické a abiotické povrchy, avšak vždy pro úspěšnou adhezi platí, že planktonické bakterie se musí dostat do dostatečného kontaktu se substrátem, ať již náhodně nebo vlastním pohybem. Jakmile se bakterie dostanou do kontaktu, tak se začnou projevovat různé kombinace fyzikálních sil zahrnující sterické interakce, vdW interakce, hydrofobní efekt a elektrostatické interakce a dojde i na zapojení chemických interakcí. Předpokládá se, že elektrostatické interakce vykazují převážně odpudivé síly, protože bakterie a většina substrátů (v závislosti na různých podmínkách) nabývají záporného náboje [7, 8, 9].

Adheze na epitel je možné změřit jako počet připojených buněk po více či méně definovaném promývacím kroku, kde se odstraní nenavázané buňky a experimentální hodnoty jsou následně časově závislé. Původně byly dominantní statistické experimentální systémy, avšak v současnosti se čím dál více používají tokové systémy, kdy je možné pomocí on-line mikroskopické detekce zachycovat rychlost adsorpce a desorpce. Avšak ani tyto experimenty nejsou pro popis mikrobiální adheze dostačující, protože se nejčastěji zkoumá systém v jednom čase a pouze jeden bakteriální kmen. V reálném živém systému je povrch epitelu osídlován celou řadou různých bakterií, které spolu vzájemně komunikují. Jeden druh buňky pravděpodobně ovlivňuje přítomnost dalších buněk na povrchu a tento stav se nazývá ko-adheze. Tudíž pokud nemají bakterie k sobě svého obvyklého „společníka“, nebo není v dostatečně blízkosti, tak v prováděných experimentech nemusí být adheze určité bakterie k povrchu vůbec měřitelná, případně je adheze na povrchu menší, než by byla v reálném systému [8].

Primární fázi lze charakterizovat dvěma základní přístupy – termodynamickým přístupem a DLVO teorií. Termodynamický přístup využívá k získání interakční energie měření kontaktních úhlů mezi fázovými rozhraními, z nichž lze dalším přepočtem získat mezifázové energie pro studované povrchy. Tímto způsobem lze určit, zda je primární mikrobiální adheze výhodná či ne. Nevýhodou tohoto postupu je, že původně tato teorie vznikla na charakterizaci povrchových vlastností pevných látek makroskopického měřítka, a pojednáváme-li o mikroskopických útvarech, není možné zohlednit širokou variabilitu mikroskopických

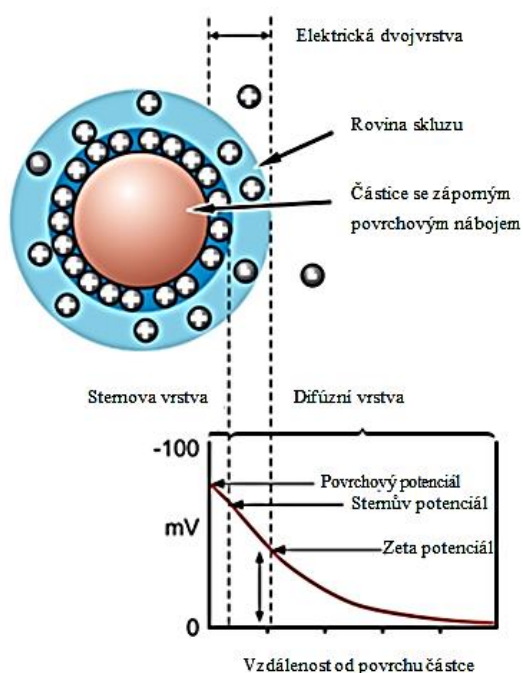
buněk. Navíc tato teorie nezahrnuje příspěvek elektrostatických sil mezi jednotlivými buňkami a buňkou a adsorbentem [7].

2.2.1 DLVO teorie

V roce 1940 byla vypracována teorie stability koloidních disperzí ruskými autory **Děržaginem** a **Landauem** a holandskými koloidními chemiky **Verweym** a **Overbeekem**. Každá částice disponuje elektrickým nábojem na svém povrchu. Jak je vidět na obr. 3, tak okolo např. záporně nabitého povrchu se hromadí kladně nabitě ionty z roztoku, a vzniká nepohyblivá pevně vázaná Sternova vrstva. K ní přiléhá difúzní vrstva s mobilními ionty, které již nejsou tak pevně připojeny. Mez skluzu je pomyslná hranice, kde se ionty uvnitř difúzní vrstvy pohybují s částicí a ionty za hranicí se pohybují nezávisle na částici. Na této hranici vzniká elektrokinetický potenciál tzv. zeta-potenciál (ζ -potenciál) určující potenciál mezi prostředím kapaliny a povrchem částice (v difúzní vrstvě) a poskytuje informaci o potencionální stabilitě koloidního systému [10]. Navíc znaménko ζ -potenciálu je opačné oproti vrstvě iontů vyskytujících se v elektrické dvojvrstvě, čímž nám dává přesný údaj o povrchovém náboji částice [2]. DLVO teorie se tedy zabývá bilancí mezi odpudivými silami vznikajícími mezi sousedními elektricky nabitými částicemi, respektive mezi náboji jejich elektrických dvojvrstev a přitažlivými mezimolekulovými van der Waalsovými interakcemi [7, 8, 11]. Celková energie adheze ($\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}$) mezi povrchy daná vzdálenostmi povrchů mikrobiálních buněk (d) ve vodném prostředí je tedy vyjádřena sumou sil elektrické dvojvrstvy (obvykle odpudivé) a přitažlivých van der Waalsových sil:

$$\Delta_{\text{adh}}G_{\text{DLVO}}^{\text{tot}}(d) = \Delta G^{\text{EL}}(d) + \Delta G^{\text{LW}}(d), \quad (4)$$

kde ΔG^{EL} je příspěvek elektrostatické interakční energie a ΔG^{LW} je příspěvek Londonovy-van der Waalsovy interakční energie [7].



Obr. 3: Struktura elektrické dvojvrstvy [12].

Důsledkem této teorie je, že po styku dvou částic nesoucí stejně nabitě ionty v překrývajících elektrických dvojrstvách, budou převládat odpuzivé síly a částice nebudou koagulovat. Elektrická dvojrstva je ovlivňována hodnotou pH a iontovou silou roztoku elektrolytu a bylo prokázáno, že při vyšších koncentracích elektrolytu v rozmezí od 0 do 0,1–0,2 M, klesá tloušťka elektrické dvojrstvy, čímž se usnadňuje integrace mezi povrchy a obvykle dochází ke zvýšení adheze bakterií [7, 8, 10]. Podle studie *Sharp a kol. (2005)* docházelo při tloušťce difúzní vrstvy (Debyova délka) 20–30 nm mezi buňkami *Candida albicans* a skleněným povrchem v roztoku elektrolytu o koncentraci 0,1–100 mM k uspokojivým experimentálním výsledkům adheze na povrch s porovnáním s DLVO teorií [13]. Hranice koagulace je závislá na povaze systému a vymezuje ji ζ -potenciál od ± 25 mV do ± 30 mV. Tento potenciál je ovlivněn především pH přidaného elektrolytu. V momentě, kdy např. částice dosahují záporného ζ -potenciálu a bude se do systému přidávat alkalický roztok, tak se jejich záporný náboj bude zvětšovat. V opačném případě, kdy se do systému kontinuálně dodává kyselý elektrolyt, tak se bude jejich záporný náboj snižovat, až dosáhne úplné neutralizace. S dalšími přidávkami kyseliny bude ζ -potenciál nabývat kladných hodnot. V bodě, kdy pH roztoku je takové, že zapříčiňuje ζ -potenciál rovný nule (tedy nulový celkový náboj) se nazývá izoelektrický bod. Tento bod je pro charakterizaci systémů klíčový, jelikož v závislosti na hodnotě izoelektrického bodu budou částice v roztocích o různém pH vykazovat různého povrchového náboje [10, 11].

Tuto teorii lze použít jako druhý přístup pro vysvětlení adheze mikrobiálních buněk s využitím informací o elektrostatických interakcích působících mezi povrchem a bakteriemi, protože mikrobiální buňky obsahují mnoho ionogenních skupin nesoucích za fyziologických podmínek záporný celkový náboj. Avšak elektrostatické interakce nejsou jedinými prokázanými interakcemi vyskytující se při mikrobiální adhezi, a proto byla tato teorie následně rozšířena [7, 8].

2.2.2 Rozšířená XDLVO teorie

Oba výše zmíněné přístupy jsou přínosné, avšak vychází z předpokladu, že se interakce vyskytují mezi hladkými, rigidními a v rámci povrchových vlastností homogenními částicemi, což v rámci reálných živých buněk neplatí. Navíc byly do stále vyvíjející se problematiky zařazeny další interakce popisující mikrobiální adhezi. Klasická DLVO teorie byla rozšířena o Lewisovy acidobazické interakce zahrnující hydrofilní/hydrofobní efekt a osmotické interakce krátkého dosahu, ale v případě mikrobiálních buněk se osmotické interakce zanedbávají. Celková interakční energie adheze ($\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}$) je v závislosti na vzdálenosti mezi dvěma povrchy vyjádřena [7, 8, 11]:

$$\Delta_{\text{adh}}G^{\text{tot}}_{\text{XDLVO}}(d) = \Delta G^{\text{EL}}(d) + \Delta G^{\text{LW}}(d) + \Delta G^{\text{AB}}(d), \quad (5)$$

kde ΔG^{AB} je příspěvek hydrofobního efektu.

Hydrofobicita povrchu buněk je dána přítomností brv, fimbrií, pilů, proteinů a povrchových sacharidů. V závislosti na počtu hydrofobních domén na povrchu mohou být hydrofobní interakce až 100x silnější než van der Waalsovy síly nebo elektrostatické odpuzování, z tohoto důvodu nelze tyto interakce zanedbat [9, 14].

2.3 Probiotické bakterie

Termín probiotika pochází částečně z latiny (pro) a částečně z řečtiny (bios) a v plnohodnotném slova smyslu znamená „pro život” [15]. V roce 1989 definoval Fuller termín probiotikum, jako „živý mikrobiální přísun krmiva příznivě ovlivňující hostitelské zvíře tím, že zlepšuje jeho střevní rovnováhu”. Následně definice prošla mnoha obměnami a v roce 2001 nabyla své současné podoby formulované FAO/WHO jako „živé nepatogenní mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství poskytují hostiteli zdravotní výhody” [15, 16, 17].

Původ mléčných výrobků, jakožto zdraví přínosných potravin, pochází již z počátku civilizace. Záznamy o užívání těchto potravin jsou uvedeny jak v Bibli, tak v posvátné knize hinduismu zaznamenávající např. příznivé účinky kefiru, nicméně v té době nebyla souvislost s bakteriemi ještě objevena [18]. První novodobá zmínka o účelovém podávání těchto bakterií pochází z roku 1899, kdy Henry Tissier izoloval *Bacillus bifidus* ze stolice kojenců a zjistil, že izolované mikroorganismy jsou převládající složkou střevní mikroflóry. Na základě tohoto zjištění následně doporučil podávání bakterií rodu *Bifidobacterium* dětem na prŕjem. Od objevu Tissiera začal narůstat zájem o tyto prospěšné bakterie a ruský vědec Ilya Ilyich Metchnikov v roce 1907 napsal svůj slavný text „Prodloužení života”, což byl první vědecký popis potenciálu ke zlepšení lidského zdraví prostřednictvím konzumace látek příznivě ovlivňující gastrointestinální mikroflóru. Probiotická terapie následně učinila velký krok směrem k dnešnímu využití těchto bakterií a v roce 1935 japonský mikrobiolog Minoru Shirota uvedl na trh první nápoj obsahující bakterie způsobující fermentaci živin. Tento nápoj byl komerčně prodáván pod názvem Yakult a prodává se dodnes. Rod *Lactobacillus* byl poprvé izolován až v roce 1990 a konkrétně se jednalo o druh *Lactobacillus acidophilus*, nicméně v současnosti jsou považovány za nejvýznamnější probiotický rod vůbec. Probiotika se dnes využívají k přípravě fermentovaných mléčných výrobků, jako je jogurt, sýr nebo lyofilizované kultury a dále se používají ke konzervaci potravin. Navíc jsou studována i v rámci nemléčných výrobků, kvůli přítomnosti alergenů jako je například laktóza. Vhodnými matricemi by mohly být luštěniny, obiloviny, ale především zelenina a ovoce, které by se v budoucnu mohly využívat na výrobu probiotických ovocných šťáv [17, 18, 19].

Pojem probiotika se často zaměňuje s termínem prebiotika, nicméně tento pojem vyjadřuje substráty vytvářející vhodné podmínky pro probiotické bakterie umožňující manipulaci se střevní mikroflórou. Bindelsem a kol. (2017) konstruovali definici prebiotik za účelem relevantnějšího pohledu na fyziologii hostitele a na produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). Na tomto základě prebiotikum definovali jako nestravitelnou sloučeninu, která je prostřednictvím mikroorganismů v GIT metabolizována za účelem změny ve složení (selektivně stimulují proliferaci) a/nebo aktivitě střevní mikroflóry, a tím přináší příznivý fyziologický účinek na hostitele [20]. Většina dosud identifikovaných prebiotik jsou nestabilní, fermentované sacharidy, zejména krátké a dlouhé řetězce β -fruktanů označované zkratkou FOS (frukto-oligosacharidy). Do této skupiny se zahrnuje jeden z nejznámějších prebiotik – inulin. Dalšími sacharidovými sloučeninami v této skupině jsou galakto-oligosacharidy (GOS), laktulóza, škroby, pektin, arabinoxylan a mezi nesacharidové sloučeniny se řadí polyfenoly [16, 19, 21].

Existuje ještě jeden termín úzce související s probiotiky, a to synbiotika. Jedná se o velký budoucí potenciál kombinující používání prebiotik společně s probiotiky synergickým způsobem, avšak Nagpal a kol. (2011) zjistili, že růst a následná životaschopnost probiotických mikroorganismů za přítomnosti prebiotik je značně specifická pro určitý bakteriální kmen [22]. Nicméně Kivit a kol. (2012) již prokázali příznivé účinky prebiotických galakto- a frukto- oligosacharidů v kombinaci s *Bifidobacterium breve* využívající mechanismus lektinu (Galektin-9) za účelem dosažení odolnosti před alergickými kožními příznaky [23]. Obecně se jedná o alternativní doplňky stravy proti poruchám metabolismu, neboť jejich působení má za následek změnu funkce střevní mikroflóry. Dalším příkladem mohou být SCFA vznikající při metabolizování bílkovin a komplexních sacharidů mikroorganismy v GIT. Tyto SCFA mohou snížit riziko vývoje metabolických poruch tím, že podporují syntézu žlučových kyseliny z těžko odbouratelného cholesterolu, tedy snižují koncentraci cholesterolu [16, 19, 21].

2.3.1 Vlastnosti probiotických bakterií

Probiotický efekt spočívá zejména v kolonizační odolnosti. Nicméně, aby probiotikum vykazovalo své příznivé účinky na lidské zdraví, tak musí splňovat daleko více požadavků. Pro počáteční screening a výběr probiotik jsou nutná kritéria zahrnutá v tab. 1.

Tab. 1: Vlastnosti a výhody probiotických kmenů [24, 25, 26].

Vlastnosti	Výhody
Odolnost proti enzymům, kyselině a žluči	Přežijí průchod střevním traktem
Adheze na intestinální mucus	Imunitní modulace, vyloučení patogenů, hojení poškozené sliznice, kolonizace střev, adherence ke kolonocytům
Lidský původ	Zdravotní účinky závislé na druhu a nepatogenní vlastnosti
Výroba antimikrobiálních substrátů	Antagonismus proti patogenům, imunogenicita
Dokumentované účinky na zdraví	Klinicky validované účinky na zdraví, stabilita fenotypu a genotypu včetně stability plazmidu
Zdraví	Posouzení a důkaz „GRAS” kmene, nepatogenní
Dobré technologické vlastnosti	Stabilita kmene, snadná kultivace, výroba ve velkém měřítku
GRAS: všeobecně považovaný za bezpečný	

V závislosti na životaschopnosti probiotických bakterií je odhadována optimální dávka pohybující se mezi 10^6 – 10^8 CFU (jednotky tvořící kolonie)/g střevního obsahu. Není ale možno přesně definovat optimální dávku jednotlivých ani směsných kultur, jelikož přežití probiotických bakterií v gastrointestinálním traktu je kmenově specifické [27].

Obecná definice probiotik je konkretizovaná na životaschopné bakterie. Spekuluje se však, že některé vlastnosti a mechanismy mohou být zachovány i u mrtvých buněk. Například účinek viability na mechanismus adheze není prozatím zcela pochopen a pravděpodobně bude kmenově specifický [28, 29]. Například *Tuomola a kol. (2000)* podrobili některé bakterie z rodu *Lactobacillus* tepelnému účinku ve formě autoklávování. Další vliv, kterému byly vybrané bakterie vystaveny, bylo ošetření pepsinem a trypsinem rozrušující peptidické vazby. Takto usmrcené bakteriální buňky dále neprokazovaly adhezi. Avšak bakterie ošetřené ethanolem a propanolem i nadále adherovaly. Výsledky naznačují, že bakteriální proteinové struktury jsou pro adhezi nezbytné, a dále ze studie vyplývá, že přilnavost bakterií bude závislá na způsobu usmrcení buněk [30].

Pokud by se tyto predikce dostatečně potvrdily, mělo by to obrovské ekonomické výhody především v dlouhodobé životnosti probiotických přípravků, a také v rámci snížení nákladů na přepravu a skladování v chladu [28, 29]. Přestože adheze usmrcených bakteriálních buněk u různých kmenů pravděpodobně fungovat může, tak prodloužená kolonizace GIT je možná pouze u životaschopných buněk [31].

2.3.1.1 Odolnost vůči pH stresu

Jednou z nejdůležitějších probiotických vlastností je odolnost vůči stresovým podmínkám v GIT (nízké pH a vysoká koncentrace solí žlučových kyselin). Probiotika obsažená v potravinách procházejí gastrointestinálním traktem různě dlouhou dobu a při této cestě musí odolat různým stresovým podmínkám. Po požití a přežvýkání je první bariérou nízká hodnota pH žaludku, která se pohybuje v rozmezí od 1 do 3 a průměrná doba expozice je 90 minut. Následně ve dvanáctníku hodnota pH stoupá na hodnotu 6–6,5. Doba pobytu v tenkém střevě kolísá mezi 2 až 5 hodinami. Průchod přes tlusté střevo může trvat až 40 hodin. V tomto místě jsou hodnoty pH blízké neutrálnímu (od 5 do 7) a fyziologická koncentrace žlučových solí je nižší. Pro screening předpokládaných probiotických bakterií se obvykle simulují tyto GIT podmínky *in vitro* [19]. V experimentálních studiích na odolnost probiotik vůči různému pH bylo prokázáno, že životaschopnost a stabilita probiotik je ve výše uvedeném kyselém prostředí nedostatečná. Například je již obecně známo, že kmeny bifidobakterií jsou méně tolerantní ke kyselým podmínkám než lactobacily. Z těchto důvodů byla vyvinuta technologie mikroenkapsulace pro probiotické kmeny za účelem zvýšení stability při těchto nepříznivých podmínkách. Navíc mikroenkapsulace napomáhá i v oblasti uchovávání, výroby a transportu probiotických kmenů [19, 32].

2.3.1.2 Antimikrobiální aktivita

Probiotické bakterie, které jsou součástí lidské mikroflóry, si vyvinuly mechanismy pro přežití v konkurenci s jinými mikroorganismy, a tudíž mohou následně omezovat invazi mikrobiálních patogenů. Kompletní mechanismus tohoto efektu na lidský organismus není zatím přesně znám, avšak alespoň predikce jsou uvedeny v kapitole 2.6 [19, 33]. Celosvětovým problémem u dětí a kojenců je gastroenteritida, kterou způsobují různé

patogeny jako např. rotaviry, *Escherichia coli*, *Campylobacter* a *Salmonella*. Nejedná se ale o problém pouze dětí, ale i dospělých, kdy například *Helicobacter pylori* indikují žaludeční onemocnění. Vuyst a kol (2009) prokázali příznivé účinky na snížení hladiny *H. pylori* v žaludku působením komerčně známé *Lactobacillus johnsonii* v kombinaci se směsí antibiotik a dalších léčiv. Vlivem odstranění *H. pylori* se ovlivnila kyselost v žaludku, což následně vedlo od hojení peptidických vředů až ke snížení rizika vzniku rakoviny [34]. Přímý antimikrobiální účinek vůči konkurenčním patogenním bakteriím a virům je znám, avšak účinek na viry nebyl doposud prokázán na molekulární úrovni [35].

Rod *Lactobacillus* je obecně známý a velmi účinný probiotický mikroorganismus produkující řadu sloučenin vykazujících antimikrobiální účinek. Klíčovou antimikrobiální sloučeninou produkovanou rodem *Lactobacillus* (a dalšími rody bakterií mléčného kvašení) je kyselina mléčná. Kyselina mléčná kromě toho, že snižuje pH, čímž podporuje růst dalších lactobacilů a zabraňuje adhezenci patogenů, tak ve své nedisociované formě zapříchňuje permeabilizaci vnější membrány gram-negativních bakterií. Tím umožňuje přístup dalších antimikrobiálních sloučenin do patogenu, a může tímto způsobem s ostatními sloučeninami synergicky působit, a zvýšit tak antimikrobiální efekt. Další výhodou kyseliny mléčné jsou její chelatační vlastnosti, kterými může vázat prvky jako je železo nezbytné pro růst. Dalšími antimikrobiálními látkami jsou například peroxid vodíku, který zabraňuje rozmnožování patogenních mikroorganismů [36] a bakteriociny. Bakteriociny produkují jak gram-pozitivní, tak gram-negativní bakterie a vykazují strukturu tepelně stabilního proteinu. Obvykle můžeme bakteriociny klasifikovat v závislosti na jejich velikosti na lantibiotika (<5 kDa), druhou třídou jsou bakteriociny nepatřící mezi lantibiotika, ale vykazující tepelnou stabilitu (<15 kDa), třetí třída je obecně nazývaná jako tepelně labilní bakteriociny (>30 kDa) a čtvrtou třídou bývají označovány směsi proteinů, sacharidů a lipidů [37]. Antimikrobiální účinek je založený na permeaci buněčných membrán patogenních bakterií, díky čemuž dochází k úniku molekul z jejich buňky. Bakteriociny mohou být dle různých zdrojů zařazeny mezi antibiotika, avšak toto řazení není zcela správné, protože antibiotika mají širší spektrum aktivit a oproti bakteriocinům, které účinkují převážně na úzce (kmenově) příbuzné bakterie, nevykazují tuto selektivní specifitu [35, 38].

Pro screening výše zmíněných antimikrobiálních charakteristik se používá několik *in vitro* a *in vivo* testů, ačkoliv chybí standardizovaná nebo sjednocená metodologie pro hodnocení tohoto probiotického efektu. Nicméně ze studií *in vitro* vychází skutečnost, že inhibiční schopnost je kmenově specifická a závisí na podmínkách kultury, a také, že za příznivým antimikrobiálním účinkem stojí několik molekul a mechanismů [19, 33].

2.3.1.3 Mikrobiální adheze – biologický popis

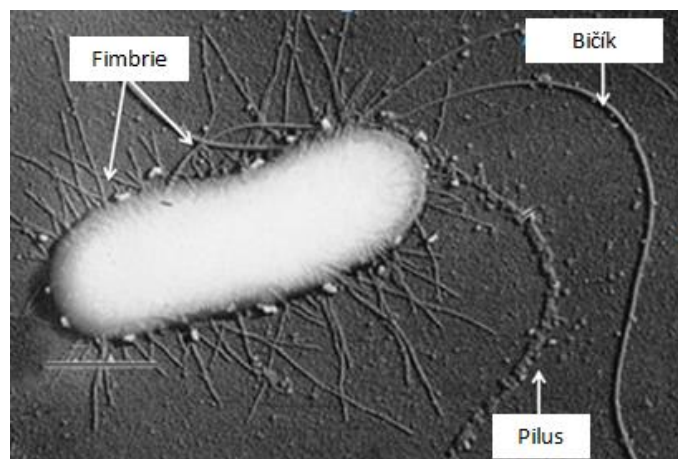
Mikrobiální adheze se rozumí přenos bakteriální buňky z nevázaného stavu v objemové fázi do více či méně pevného navázaného stavu na rozhraní [8]. Pro dosažení maximálního probiotického účinku je vyžadována dlouhá doba zadržení probiotického organismu na sliznici hostitele. Dále by měla účinná probiotika dosáhnout relativně krátké generační doby (doba od vzniku bakteriální buňky až k jejímu dalšímu rozdělení), aby se zabránilo jejich následnému odstranění společně s hlenem a obsahem lumenu. Následně je nutná jeho

multiamplifikace [19]. Jestli adheze bude nebo nebude probíhat, závisí na mnoha faktorech, jako je pH, iontová síla, bakteriální pohyblivost, stav růstu a růstové faktory a složení média [14]. Nicméně i přes výše uvedené faktory, je adheze základním předpokladem střevní kolonizace, stimulace imunitního systému a antagonistické aktivity proti enteropatogenům a jsou jí připisovány některé zdravotní účinky [19].

Genomová informace některých probiotických kmenů odhalila přítomnost několika molekul schopných ireverzibilně přilnout k různým receptorům hostitele a vyměňovat si signály se střevním imunitním systémem, což naznačuje dobré přizpůsobení probiotik v hostitelském organismu [19]. Tyto specifické molekuly jsou označovány jako adheziny. Existuje mnoho tříd bakteriálních adhezínů a důvodem pro tuto velkou variabilitu mohou být funkční požadavky na adhezín v kombinaci s dostupnými genetickými informacemi u daného bakteriálního druhu. Dále bylo zjištěno, že adheziny podléhají rychlé mikroevoluci vedoucí ke změnám receptorové specifity jednotlivých adhezínů, což následně komplikuje jejich charakterizaci. Mikrobní adheziny obvykle tvoří komplexní polymery, ale mohou také tvořit ne-organelové (nejsou přítomny v buňce) adheziny ve formě monomerů nebo jednoduchých oligomerů táhnoucí se směrem od jejich povrchu [39]. Nejčastěji se adheziny vyskytují ve formě lektinů rozpoznávající oligosacharidové zbytky glykoproteinových receptorů na hostitelské buňce [40]. Navíc musí bakterie vytvářet extracelulární polysacharidy (EPS), aby mohly na povrchu tvořit mikrobiální kolonie a ne se pouze připojit k povrchu epitelu [8].

Některé bakteriální adheziny (AIDA-I) jsou zobrazovány jako jeden nepolymerní proteinový kruh na povrchu obsahující veškeré informace pro rozpoznání receptoru a ukotvení na vnější membránu. Nicméně častěji se vyskytují vláknité struktury na povrchu buňky nazývané fimbrie a pily dosahující délky okolo 1 nm a v průměru dosahují 5–10 nm. Tyto extracelulární proteiny vykazují LPTXG motiv na C-terminálním konci, následovaný hydrofobními zbytky a kladně nabitými aminokyselinami. Proteiny obsahující tento motiv jsou schopny rozpoznávat buněčné stěny, rozrušují je a následně vytvářejí kovalentní vazby na peptidoglykan pomocí enzymu sortázy [39, 40, 41].

Fimbrie jsou velmi tenká vlákna heteropolymeru, proteinu, vyskytující se v početnějším množství a na bakteriálním povrchu tvoří „sít' chmýří“ [39]. Pily představují dlouhé vláknité struktury, které jsou v případě gram-negativních bakterií tvořeny nekovalentní homopolymerací hlavních proteinů pilusových podjednotek a následně vytvářejí pilusový hřídél. U gram-pozitivních bakterií byly pily objeveny mnohem později a vznikají kovalentní polymerací pilusových podjednotek, při kterém využívají enzym pily specifickou sortázu. Některé pilusové struktury se podílejí jak na interakci s hostitelem, tak na tvorbě biofilmu, nebo na pohyblivosti buněk na epitelu atd. [40]. Rozdíl mezi fimbrií a pílím je nepatrný a často se tyto dva termíny zaměňují, nicméně termín pily se používá hlavně pro delší a tvrdší struktury, avšak kratší než-li je bičík, zatímco fimbrie jsou považovány za kratší a početnější struktury viz obr. 4 [42].



Obr. 4: Struktura povrchu prokaryotické buňky [42].

2.4 Klasifikace probiotických bakterií

Pokud bakterie splňují vlastnosti popisované v kapitole 2.3.1 a jejich podkapitolách, tak mohou být klasifikovány jako probiotické kultury. V současné době jsou probiotické mikroorganismy zastoupeny jak gram-pozitivními tak gram-negativními bakteriemi a kvasinkami (např. *Saccharomyces boulardi*). Jedním z druhově nejvíce rozšířených a nejvýznamnějších bakteriálních rodů distribuovaných v dostupných probiotických přípravcích je rod *Lactobacillus*. Jedná se o gram-pozitivní bakterie, jejichž nomenklatura je neustále měněna, což často komplikuje jejich studium. Dalším významným rodem je rod *Bifidobacterium* patřící taktéž mezi gram-pozitivní bakterie, avšak nezahrnuje tolik probiotických druhů, jako tomu bylo u laktobacilů [17, 33, 36]. Mezi probiotické bakterie se obecně často řadí bakterie mléčného kvašení (BMK) jejichž konzumace zvyšuje odolnost proti malignitě a infekčním onemocněním a důležitý je i jejich antimikrobiální efekt. Tyto bakterie se přirozeně vyskytují ve fermentovaných potravinách, ale také například v půdě, rostlinách, či na orgánech jako součást lidské, či zvířecí mikroflóry [43]. Avšak není pravidlem, že pouze BMK jsou probiotické kultury, jak lze vidět v tab. 2. Navíc se v současnosti znovu objevuje zájem o charakterizaci dalších probiotických bakterií, a proto je studován například bakteriální druh *Lactobacillus salivarius*, izolovaný z mateřského mléka, jako potencionální probiotický mikroorganismus [44]. Dále je probiotický výzkum zaměřený na potencionální probiotické vlastnosti např. různých kmenů *Lactobacillus plantarum* [44]. *Lactobacillus zeae* by mohl být zařazen mezi další potencionální probiotické mikroorganismy, protože se přirozeně vyskytuje v GIT a vykazuje fenotypovou podobnost s *L. rhamnosus* a *L. casei* [46, 47].

Tab. 2: Mikroorganismy považované za probiotika [48, 49].

Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Druhy patřící mezi BMK	Další mikroorganismy
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyo</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. galinarum</i>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. gasseri</i>		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

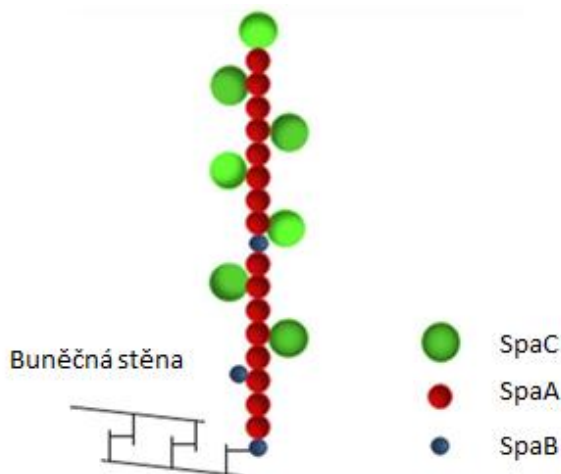
Probiotický potenciál odlišných bakteriálních kmenů se i v rámci stejného druhu liší. Kmenová specifita probiotických bakterií je vždy jedinečná, a může se lišit např. v oblasti adsorpce na intestinální sliznici hostitele (site-specific), může mít různé imunologické účinky, a také se odlišnost různých kmenů může projevit v účinku na zdravé funkční slizniční prostředí a na zanícenou sliznici. Účinek na zdravou a zanícenou sliznici bývá totiž často odlišný [18].

2.4.1 Rod *Lactobacillus*

Tento rod bakterií se zahrnuje mezi bakterie mléčného kvašení, z čehož vyplývá i jejich název odvozený z latinského lac – mléko. Do tohoto rodu zařazujeme mléčné bakterie tvořící delší, tenké tyčinky, které bývají často sdruženy do řetízků nebo palisád [36, 48]. Jak již bylo výše zmíněno, jedná se o gram-pozitivní bakterie, které jsou nepohyblivé, mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní a netvoří spóry. Optimálními podmínkami pro růst

jsou teplota 37 °C a pH média 6,5–7 (buď se používají tekutá Man Rogosa Sharpe (MRS) média nebo pevná agarová půda dle Rogosy), což jsou obecné podmínky pro kultivaci probiotických bakterií [50]. Nicméně kultivace je možná i v prostředí s hodnotou pH 5, ale při nižším pH se již růst bakterií zastavuje. Díky tomu vykazují vyšší toleranci na žlučové kyseliny. Jejich nejvýznamnější schopností je zkvašovat hexózové cukry včetně laktózy na kyselinu mléčnou. Podle této charakteristické vlastnosti můžeme *Lactobacillus* rozdělovat do dvou skupin, a to na homofermentativní druhy mléčného kvašení, kdy hlavním produktem je pouze kyselina mléčná a na heterofermentativní druhy produkující kromě kyseliny mléčné i kyselinu octovou, ethanol, oxid uhličitý, ale tyto metabolity produkují jen v menším množství. Další důležitou schopností lactobacilů je růst v podobě biofilmu na sliznici (využití jako biofilmová probiotika), což bude následně detailněji popsáno v kapitole 2.7.2 [36, 51, 52].

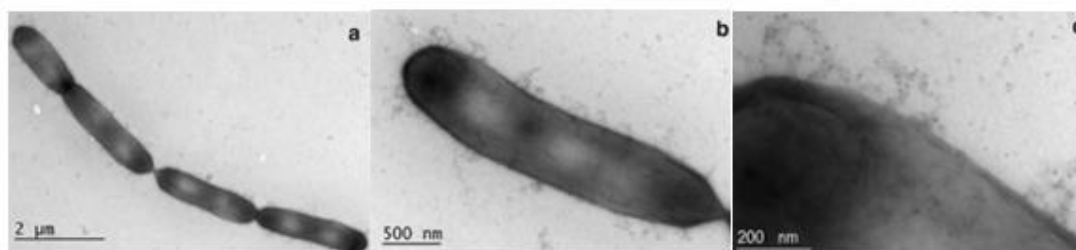
Rod *Lactobacillus* jakožto gram-pozitivní bakterie zprostředkovávají adhezi na epiteální povrch zejména pomocí dvou pilusových klastrů. Obecně je známo, že se geny kódující pilusové podjednotky uspořádávají do operonu, s alespoň jedním genem pily specifické sortázy. Například *Lactobacillus rhamnosus* GG obsahuje ve svém genomu geny pro 2 oddělené pilusové klastry: SpaCBA a SpaFED. Pilusové jednotky SpaA a SpaD pravděpodobně zobrazují základní kostru pilu, SpaB a SpaE jsou pomocné drobné pilusové podjednotky a SpaC a SpaF zodpovídají za adhezivní vlastnosti a jsou umístěny sporadicky v celé struktuře a na špičce pilu viz obr. 5. Nicméně v nejnovějších testech byly prokázány adhezivní vlastnosti i u SpaB drobné pilusové jednotky [53, 54].



Obr. 5: Schématické znázornění SpaCBA pilu [54].

Isopeptidické vazby indikované pilus specifickou sortázou vznikají mezi jednotlivými podjednotkami mezi threoninem LPTXG motivem a lysinem v YPKN pilinovém motivu. Tzv. „domácí“ sortáza v buněčné membráně také rozpoznává LPTXG motiv na pilu a kovalentně se váže k peptidoglykanu v lidské tkáni. Mezi jednotlivými kmeny stejného druhu je však jistá diferenciací mezi aminokyselinami pilů, a díky tomu mohou mít různé kmeny různě silný adhezivní efekt [53, 54].

Kankainen a spol. (2009) studovali genetické dispozice k adhezi kmenů *L. rhamnosus* GG a *L. rhamnosus* LC705 a došli k závěru, že ačkoliv *L. rhamnosus* GG obsahuje oba dva výše zmíněné typy klastrů, tak *L. rhamnosus* LC705 obsahuje pouze klastr SpaFED, což byl pravděpodobně důvod k tomu, proč v jiných studiích dosahoval *L. rhamnosus* GG značně adherentnějšího efektu k lidské tkáni než-li kmen LC705 [53]. Nedávno byl u *L. rhamnosus* objeven takzvaný mucin-binding faktor (MBF) vázající se na mucin obsažený v hlenu GIT. Tento protein spolu s EPS, teichoovými kyselinami a jinými proteiny podobnými LPXTG napomáhají rodu *Lactobacillus* přilnout k epitelu GIT a následně tak umožní kolonizaci hostitele [55].



Obr. 6: *Lactobacillus rhamnosus* s vyzobrazenými pily [56].

2.5 Výskyt probiotických mikroorganismů v lidském těle

Probiotické bakterie se přirozeně vyskytují v gastrointestinálním (izolace z dásní, slin a dutiny ústní) a genitourinárním traktu. Genitourinární trakt osídluje více než 50 druhů mikrobů a všechny tyto mikroorganismy se převážně shromažďují ve vaginální oblasti žen. Převážně u zdravých a plodných žen je vagina nejčastěji kolonizována některými druhy rodu *Lactobacillus*, označující se historickým názvem jako Döderleinův lactobacil. Těmito bakteriemi dochází k fermentaci glykogenu (a dalších látek) v oblasti pochvy na kyselinu mléčnou, díky které má vagina nízké pH, což chrání sliznici před patogenními organismy [36]. Slizniční mikroflóra vagíny může ze zatím neznámých důvodů měnit své složení. To často vede k infekci způsobené koexistencí patogenu s komenzálními bakteriemi. Nejběžnější urogenitální infekcí je bakteriální vaginóza, jejíž léčbu umožňují antibiotika, avšak v kombinaci s probiotiky dochází k narušení kvasinkových biofilmů a inhibici urogenitálních patogenů. Předpokládá se, že konzumace probiotických bakterií by mohlo sloužit i jako prevence před různými vaginálními nemocemi [57].

2.5.1 Gastrointestinální trakt (GIT)

Sliznice střev je pokryta vrstvou různých typů epiteliálních buněk, které jsou zřetelně odlišné v různých oblastech GIT a jsou v kontaktu s lumenem. Lidský GIT je osídlen 10^{12} – 10^{14} mikrobů zahrnující se do fyziologické homeostázy. V různých oblastech GIT se vyskytují jiné druhy komenzálních bakterií, a taktéž je jiné jejich kvantitativní rozložení [58]. Horní část GIT začíná ústní dutinou, ve které se probiotika objevují převážně ve formě zubního plaku. Z nových studií vyplývá, že užívání probiotik by mohlo napomáhat ke zmírnění výskytu zubních kazů a paradentózy [59]. Dále GIT pokračuje jícnem, žaludkem a dvanáctníkem na začátku tenkého střeva, které kolonizuje 10 – 10^3 /ml mikroorganismů. V této oblasti GIT je nižší počet komenzálních bakterií než-li jinde v trávicím traktu, což ovlivňuje kyselé pH způsobené žaludečními kyselinami a také je zde více pankreatických enzymů zabraňující

kolonizaci. Tenké střevo je dále rozdělené na jejunum obsahující $0\text{--}10^5/\text{ml}$ mikroorganismů a ileum s $10^3\text{--}10^9$ mikroorganismů. Nejkolonizovanější at' kvalitativně či kvantitativně je tračník v tlustém střevě, který je kolonizován $10^{10}\text{--}10^{12}/\text{ml}$ mikroorganismů [58].

Lidská střeva jsou komplexní ekosystém, ve kterém probíhají nejrůznější interakce mezi mikroflórou, živinami a hostitelem. Tato část GIT je pokryta hlenovou vrstvou chránící podkladovou sliznici před lumenním obsahem a tedy tvoří rozhraní mezi epiteliálními povrchy a jejich mimotělním prostředím. Mucus je vysoce hydratovaný gel obsahující přibližně 95 % vody a často tvoří souvislou viskózní vrstvu. Základní stavební složkou jsou velké glykoproteiny, tzv. muciny, které dále obsahují jako vedlejší komponenty soli, lipidy a proteiny. Tyto komponenty jsou zapojeny v obraně jako defensiny, růstové faktory, imunoglobuliny atd. Drtivá většina komenzálních bakterií tvoří střevní mikroflóru a kolonizují v tlustém střevě. V této oblasti je hlenová vrstva rozdělena na vnější plochu, která poskytuje volnou vrstvu sloužící jako stanoviště pro bakterie a vnitřní hustou plochu, která je neproniknutelná vůči bakteriím, odděluje od bakterií povrch epitelu a je pevně připevněna na sliznici. Mucus je tedy klíčový pro střevní homeostázu tím, že udržuje naše prospěšné bakterie v dostatečné vzdálenosti od epitelu. Naproti tomu patogeny mají vyvinuté strategie pro proniknutí do hlenovité vrstvy a k přilnutí k podkladové epitelu [60, 61].

Mucus je neustále produkován a vylučován v závislosti na orgánu a situaci. Tloušťka hlenovité vrstvy se mezi orgány velmi liší. Ústní dutina je pokryta slinným filmem, který se skládá z vody, mucinu a dalších bílkovin. Za předpokladu, že se sliny rozdělují rovnoměrně po tkáních, vypočtená tloušťka slinného filmu je 70 až 100 μm . Žaludek vykazuje silnější hlenovou vrstvu (přibližně 300 μm), která chrání podkladový žaludeční epitel proti nepřátelským kyselým podmínkám. Tenké střevo je převážně pokryto volně připojenou hlenovou vrstvou (150–400 μm), která je nejtenčí v lačníku, kde dochází k hlavnímu příjmu živin. V tlustém střevě tloušťka vrstvy sliznice tvoří gradient od slepého střeva do konečníku, kde dosáhne tloušťky 800–900 μm [60, 61].

Hlenovitá hmota má mnoho funkcí. Může sloužit jako mazivo pro usnadnění průchodu potravy ve střevě a dále jako selektivní bariéra plní funkci tím, že umožňuje průchod nízkomolekulárních složek, jako jsou živiny, do epitelových buněk. Další známou funkcí hleny je obranný systém, který chrání podkladové epitelové buňky před mechanickým poškozením, nebo před vstupem škodlivých látek buď chemické (léky, toxiny nebo těžké kovy) nebo biologické povahy (luminální pepsin, organické kyseliny). Dále zabraňuje vstupu patogenních bakterií, virů nebo parazitů. Další funkce hleny, která je momentálně předmětem vědeckého zkoumání, je využití hleny jako substrátu pro růst, přilnavost a ochranu bilionů mikrobiálních buněk, které jsou přítomny v lumenu. Vlastnosti hleny jako substrátu budou pravděpodobně ovlivňovány mimo jiné i tloušťkou hlenové sliznice v různých blastech GIT. [60, 61].

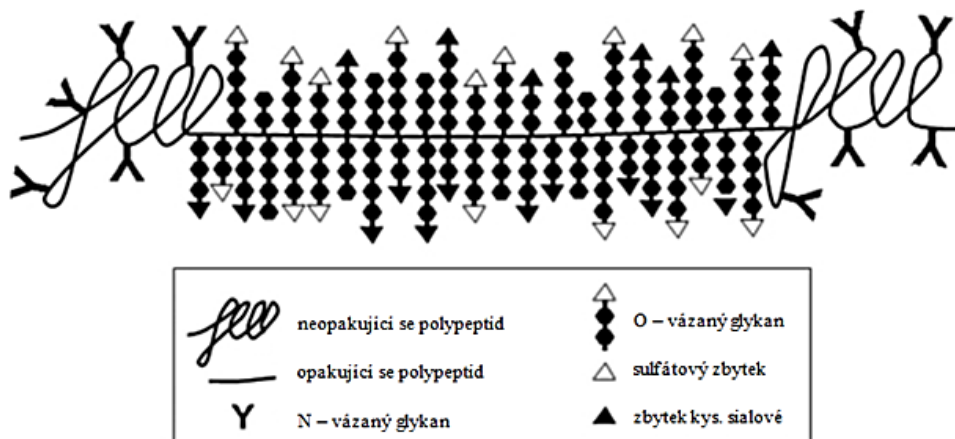
2.5.1.1 Mucin

Z pohledu biofyziky je mucin zodpovědný za viskoelastické vlastnosti hlenového gelu a je konstruován z 50–90 % O-vázanými glykany (vztaženo na hmotnost molekul mucinu), které jsou připojeny k hlavnímu řetězci bílkoviny (apomucin). Díky těmto glykanům mucin nabývá

velké molekulární hmotnosti v rozmezí od 0,5 do 20 MDa. Mucin je tedy velký, extracelulární glykoprotein složený z 80 % N-acetylglaktosaminem, N-acetylglukosaminem, fruktózou, galaktózou, kyselinou sialovou (N-acetylneuraminová kyselina) a stopami manózy a síranu. Vznikající oligosacharidové řetězce sestávající z 5 až 15 monomerů jsou připojeny k jádru bílkovin vykazující mírné větvení. K tandemovému opakování aminokyselinové sekvence polypeptidu je přidáván velký počet O-vázaných sacharidových řetězců během biosyntézy v Golgiho aparátu. Tyto řetězce jsou připojeny k apoproteinu prostřednictvím N-acetylglaktosaminu (GalNAc), který je připojen k hydroxylové skupině buď serinových nebo threoninových zbytků pomocí O-glykosidické vazby. Pak se k této počáteční GalNAc připojují galaktózy a/nebo N-acetylglukosaminové (GlcNAc) zbytky, čímž vznikají různé jaderné struktury. Páteční oblast těchto glykanů se skládá z postupného přidávání galaktózy a zbytků GalNAc nebo GlcNAc [60, 61, 62].

V závislosti na složení cukru mohou být muciny diferencovány biologicky a histochemicky jako neutrální nebo kyselé muciny. Kyselé muciny obsahují značná množství kyseliny sialové („sialomucins“) a/nebo síranové zbytky („sulfomucins“) vykazující silný negativní náboj na molekule mucinu. Většina mucinů nese alespoň některé z těchto negativně nabitých skupin. Nicméně mnoho mucinů může nést sulfáty a zbytky kyseliny sialové zároveň a název sialo/sulfo muciny ve skutečnosti pouze naznačuje převahu jedné nebo druhé negativně nabitě skupiny [60, 61, 62].

Zbývajících 20 % tvoří proteinové jádro představující proteiny o molekulové hmotnosti 200–500 kDa uspořádaných do odlišných oblastí. V první oblasti je N-terminální signální peptid zahrnující amino- a karboxylové terminály, které mohou být někdy rozptýleny mezi STP-opakování. Zmíněné charakteristické opakování je tvořeno z více než 60 % aminokyselinami především serinem, threoninem a prolinem, tudíž se jedná o oblast se sníženým počtem sacharidů. Tyto STP domény se skládají z variabilního počtu tandemových opakování (VNTR) a umožňují tak vysoký stupeň heterogenity mucinu. Tato charakteristická vláknitá proteinová kostra s vyčnívajícími oligosacharidy právě v STP doméně vede k typickému vzhledu mucinu „láhev-kartáč“ (viz obr. 7). Signální peptid je vyžadován pro cílení polypeptidu k endoplazmatickému retikulu, a to buď extracelulární sekrecí, anebo vložení syntetizovaného mucinu do buněčné membrány. Ve druhé oblasti je zahrnuta centrální glykosylovaná oblast koncentrující O-glykosylaci a vyskytuje se na ní velký počet tandemových opakování [62, 63].



Obr. 7: Schématické znázornění molekuly mucinu [63].

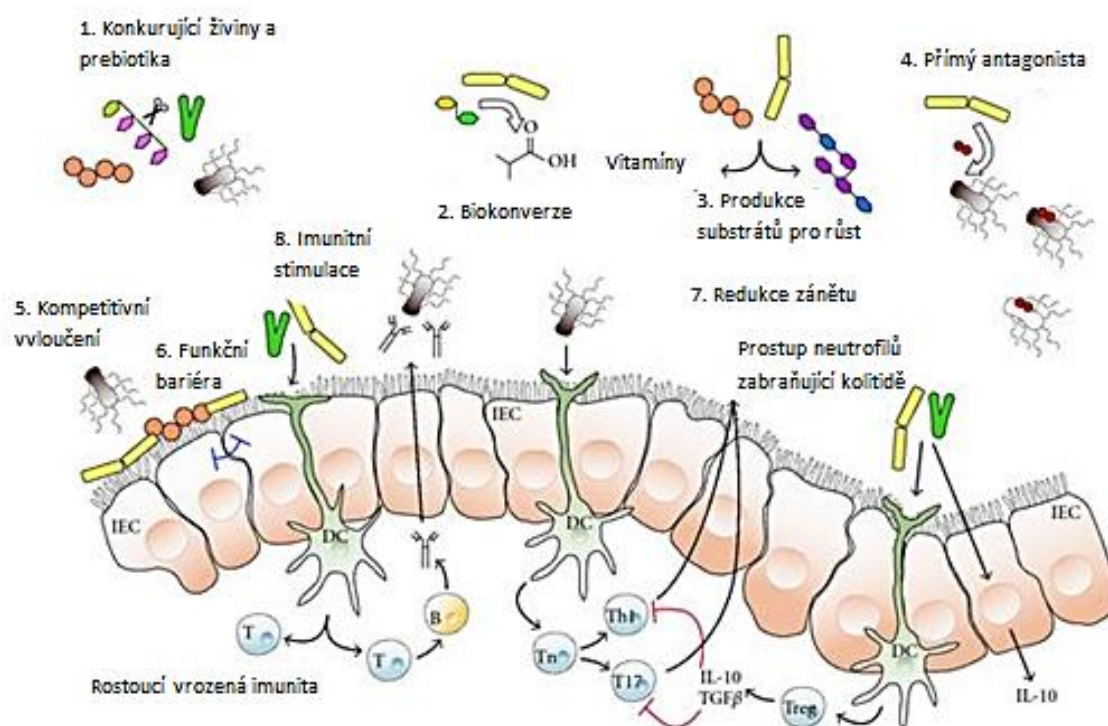
Doposud bylo uvedeno více než 20 genů patřících do rodiny mucinu identifikovaných v lidském těle. Mucus tenkého a tlustého střeva je převážně tvořen gelovým mucinem MUC2 genem, který obsahuje zejména glykoproteiny, zatímco hlen povrchu žaludku obsahuje hlavně MUC5AC gen, jehož organizace strukturální domény je podobná MUC2 genu, avšak v některých ohledech se liší. Sekreční muciny obsahují bohaté sekvence na cystein v N- a C-koncových oblastech vytvářející intra- a intermolekulární disulfidické vazby ovlivňující vznik slizniční vrstvy a způsobují její charakteristické viskoelastické vlastnosti. Druhou skupinu tvoří membránové muciny, které jsou vázány na membránu a vstupují do glykokalyxu slizničních povrchů. Zde vykonávají důležitou biologickou interakci buňka-buňka a buňka-matrix a navíc se účastní buněčné signalizace. Tyto muciny mohou být vyloučeny z povrchu a interagují ve vrstvě hlenu, kde jsou schopny ovlivnit viskozitu ochranné vrstvy a takto vylučované muciny jsou hlavní strukturální komponenty hlenového gelu [60, 64].

2.6 Mechanismus účinku probiotických bakterií

Komunikace probiotických bakterií s hostitelem může probíhat, jak na úrovni epiteliálních buněk či imunitních buněk, tak i na úrovni ovlivňování signálních drah buněk, avšak různé druhy probiotik budou využívat i odlišné mechanismy účinků (viz obr. 8). Nedávné studie prokázaly, že níže uvedené mechanismy se netýkají pouze oblasti střev, avšak např. perorální kmen *Bifidobacterium adolescentis* snižuje koncentrací vitamínu K v ústní dutině, čímž konkuruje patogenní bakterii *Porphyromonas gingivalis* [65].

V gastrointestinálním traktu probiotické bakterie převážně působí v oblasti střev, kde interagují pomocí fyzikálních sil či na chemické úrovni s různými buněčnými složkami. Po celé délce střev se nachází pohárkovité buňky (goblet cells). Tyto buňky následně exprimují tyčinkovité muciny vytvářející slizniční povrch, které jsou velmi důležité v ochraně hostitele. Intestinální epiteliální buňky (IEC) jsou počátečním bodem kontaktu mezi hostitelskými buňkami a intestinálními mikroby. Zároveň se jedná o první linii obrany proti patogenním bakteriím a značně komunikují s komenzálními mikroby včetně probiotik. Probiotika mohou ovlivňovat IEC více způsoby, například lactobacily zvyšují expresi mucinu v intestinálních buněčných liniích Caco-2 (MUC2) a HT-29 (MUC2 a 3), čímž následně blokují patogenezí a zvyšují bariérovou funkci [66]. HT-29 a Caco-2 buněčné linie představují běžné buněčné modely nediferencovaného lidského střeva odvozené z karcinomu lidského

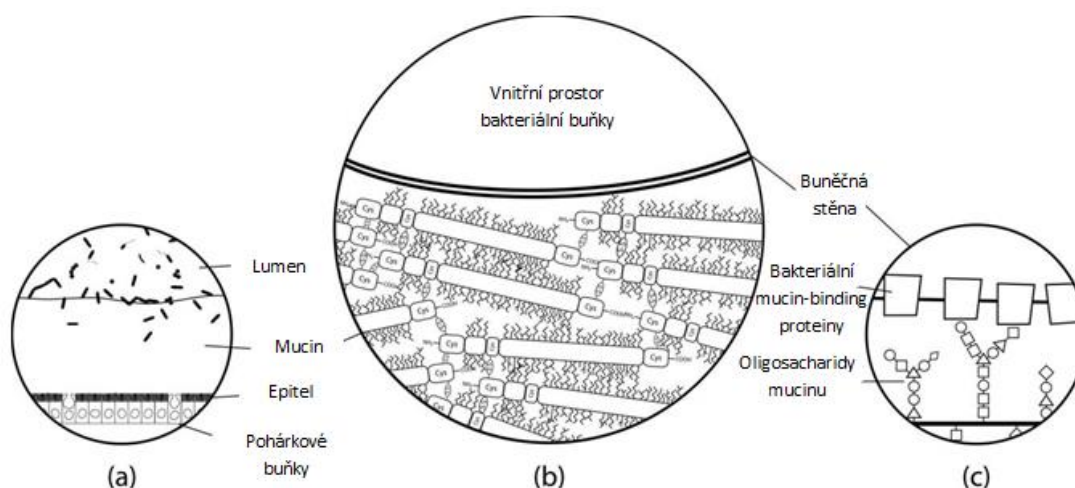
střeva. Tyto modely se následně používají pro stanovení adherence probiotických mikroorganismů při identifikaci nových probiotických kmenů, protože exprimují morfologické a fyziologické vlastnosti reálných lidských enterocytů [67, 68].



Obr. 8: Schématické znázornění potenciálních mechanismů účinku probiotických mikroorganismů na hostitele – širší vysvětlení je uvedené dále v extu. IEC: epiteální buňky, DC: dendritické buňky, T: T-lymfocyty, B: B-lymfocyty [65].

Probiotické organismy nevykazují pouze jeden mechanismus napomáhající jejich příznivému účinku na lidský GIT, ale uplatňují kombinaci několika výše zobrazených mechanismů. Příkladem je konkurence probiotik a patogenů o živiny, díky nimž bakterie dosahují své aktivity a navíc produkují například vitamíny modulující mikroflóru či EPS pro další komenzální bakterie, jakožto růstové substráty [65, 66].

Jak již bylo výše uvedeno, probiotika adherují ke specifickým místům na hleny pomocí adhezínů a mucin-vázací faktor (MBF). Tyto specifické receptory na mucinu byly definovány jako mucin-vázací proteiny (MUB), které také obsahují LPXTG motiv v C-konci k navázání bakterií a signální peptid. MUB jsou charakterizovány přítomností určitými opakujícími se motivy, které se v závislosti na kmenech liší, a tím je odlišná i jejich signální funkce a navázání probiotické bakterie [69]. Důkazy naznačují, že adheziny a MBF interagují s glykosylovými modifikacemi proteinu mucinu (viz obr. 9) V závislosti na tkáňových a buněčných specifických expresí enzymu glykosyltransferázy se vytváří různě modifikované oligosacharidy. Z toho následně vyplývá, že mohou vznikat různě preferenční vazby k jednotlivým bakteriím [69]. Přilnutím probiotik k mucusu konkurují s patogenem o vazebná místa a zlepšují barierní funkci epitelu, což dále např. ovlivňuje jaké patogeny či jaké další probiotické kmeny budou moci kolonizovat epitel [65, 66].



Obr. 9: Zjednodušený histologický průřez mikrobiální adheze k povrchu sliznice střev při různých zvětšení: a) vrstva hlenu, na něž se probiotika váží v nejvzdálenější části od epitelu, b) rozhraní bakterií a hlenu, ve kterém mucinové molekuly polymerizují, aby vytvořily matici sliznice, c) navrhovaný molekulární mechanismus adheze [69].

Veškeré probiotické kmeny nějakým způsobem ovlivňují intestinální epitelální buňky, makrofágy, dendritické buňky a populaci T-lymfocytů za účelem zvýšené sekrece protilátek. Dále je známo, že v rámci účinku na imunitní systém moduluji klíčové signální dráhy [65, 66]. Tyto signální dráhy navíc ovlivňují buněčný růst, apoptózu, bakteriální adhezi a další významné procesy. Příkladem dráhy modulované probiotiky je NFκB neboli nukleární faktor kappa B. Tento faktor je přítomen v neaktivní formě na inhibitoru IκB v cytoplasmě. Jakmile se objeví prozánětlivé podněty, tak IκB se fosforyluje a NFκB může prostoupit do jádra, kde aktivuje transkripci efektorových genů například pro zánětlivé reakce. Ve studiích bylo zjištěno, že např. *Lactobacillus casei* deaktivoval zmíněnou signální dráhu, která byla indukovaná patogenem *Shigella* [71]. V opačných případech mohou probiotika zvýšit aktivaci této dráhy, a tak zvýšit transkripci cílových genů. Nicméně oběma zásahy do imunitního systému probiotické bakterie ovlivňují širokou škálu vlastností např. úspěšnou kolonizaci [65, 66].

Veškeré predikce mechanismů, kterými probiotika zprostředkovávají své pozitivní účinky na lidský organismus, nejsou ještě zcela jasně definované a prozkoumané. Prostudováním těchto mechanismů ve studiích genové exprese, proteomiky a metabolomiky by se v budoucnosti mohlo dosáhnout specifitějšího výběru probiotického kmene, ale také by se mohly otevřít cesty k výzkumu nových probiotických vlastností [71].

2.6.1 Příznivé účinky probiotik na člověka

Existuje mnoho důkazů, že probiotické bakterie mají různé příznivé účinky na lidské zdraví a na úpravu fyziologické homeostázy střevní mikroflóry. Narušení této homeostázy vede ke vzniku zánětlivých, alergických či infekčních onemocnění. Části lidského těla jako kůže, ústní dutina, gastrointestinální trakt a vaginální dutina jsou kolonizovány biliony mikrobů. Při narození jsou lidská střeva sterilní a prvotní kolonizace nastává bezprostředně po narození

a to prostřednictvím matky. Různé kolonizační vzorce jsou ovlivněné typem porodu (vaginální přirozený porod nebo císařský řez) anebo druhem stravy (kojení nebo krmení umělou výživou). Po této prvotní kolonizaci jsou naše mikrobiální profily dále ovlivňovány během života, a to jak věkem a životním stylem (konzumací potravin), tak i prodělanými chorobami [72].

Probiotikům je věnovaná pozornost zejména v oblasti prevence různých onemocnění, ale i jejich terapeutické účinky jsou významné. Oproti jiným terapeutickým postupům se vyznačují poměrně vysokým stupněm bezpečnosti (minimum nežádoucích účinků) ve stejných indikacích. V rámci probiotické terapie je nutné znát jak přesnou genetickou výbavu, vlastnosti a účinky vybraného probiotika, tak je nutné znát stav a stádium onemocnění příslušného pacienta. Současné vědecky a klinicky prokázané účinky probiotik vedou k nadějným cílům využití této terapie, a to například v oblastech:

Prevenci průjmů a onemocnění střev: U všech typů průjmu vykazují probiotické bakterie více či méně preventivní nebo terapeutický účinek, který je závislý na bakteriálním kmeni a jeho antimikrobiálních, imunomodulačních a protizánětlivých vlastnostech. Jejich hlavní funkcí je podpora střevního imunitního systému proti virům, potenciálně škodlivým bakteriím nebo toxinům na všech úrovních a důsledkem je následná stabilizace střevní mikroflóry. Příkladem jsou *Lactobacillus GG* a *Saccharomyces boulardii* prokazující terapeutický účinek na *Clostridium difficile*, jakožto hlavní příčinu nozokomiálně (vznikající ve zdravotních zařízeních) získaných střevních infekcí ve Spojených státech. Teoretickým předpokladem výzkumu bylo, že střevní mikroflóra byla poškozena působením antibiotik, a byla tedy následně citlivější na kolonizaci této bakterie [73, 74, 75].

Alergická onemocnění: Využití probiotik v rámci antialergického účinku bylo založeno na tzv. hygienické hypotéze, kdy při nadměrné hygieně kojenců se nedostatečně osídluje mikroflóra a následně vznikají alergie jako atopický ekzém nebo astma. Právě na atopickém ekzému je nejlépe demonstrován imunomodulační účinek probiotik [76, 77].

Rakovina: Rakovina konečníku, prsu, hrtanu a močového měchýře bývá často spojována se stravou bohatou na dusičnany, tuky a proteiny. Běžně přítomné bakterie GIT, jako jsou *Escherichia coli*, *Clostridium sp.* a *Peptostraptococcus sp.*, způsobují přeměnu těchto složek potravy na karcinogeny. V rámci výzkumu v této oblasti byly bakterie vytvářející karcinogeny nahrazeny probiotickou bakterií *L. casei Shirota*, která prodloužila období bez vytvoření karcinomu močového měchýře. Konzumace této bakterie vedla i u dalších pacientů s jiným typem rakoviny ke snížení vývoje nádoru [76, 77].

Paměť: Zdá se, že existuje mnoho spojitostí mezi střevem a mozkem. Komunikaci mezi těmito dvěma orgány dokazuje řada testů, kdy bylo potvrzeno, že střevní mikrobi snižují oxidační stres a produkci systémově zánětlivých cytokinů. Dále ovlivňují hladiny prekurzorů neurotransmiteru prostřednictvím aminokyselin a struktury neuronální membrány prostřednictvím mastných kyselin (vagus nervový kanál). Tento předpoklad byl dokázán v Novel Object testu, kdy paměť myši bez přítomnosti mikroorganismů (ať už se jedná o mikroflóru myši nebo mikroorganismy na jejich povrchu) byla narušena oproti normálním

zdravým myším obsahující mikroflóru. Z toho důvodu se očekává, že pomocí probiotik by se mohlo ztrátě paměti alespoň částečně zabránit. Dále střevní mikrobi tlumí intestinální propustnost prostřednictvím oslabení hypotalamus-hypofýza-nadledvina (HPA) osově odezvy a snižují centrální neuroflamaci. V poslední řadě střevní mikrobi snižují zátěž uremického toxinu, který je zodpovědný za závažný stav – uremický syndrom – jakožto důsledek těžké poruchy funkce ledvin [76, 77].

Mentální stav: V rámci zvířecího testu nuceného plavání (FST) na hlodavcích, je zkoumán jejich nehybný stav, který je vyvolaný depresí a dává informace právě o rozsahu zmiňovaných depresí. Bylo zjištěno, že mladí hlodavci oddělení od matek vykazují dvojnásobek počtu nehybností ve srovnání s kontrolou v FST. Depresivní hlodavci byli léčeni antidepresivním lékem citalopramem, který snížil nehybnost, a zároveň bylo toto antidepresivum doplněno probiotickou bakterií *Bifidobacterium infantis*, a díky tomuto aditivu se stav depresivních myší dostal až na úroveň kontroly. Tato pozorování ve studiích na zvířatech jsou v souladu s humánními studiemi, u nichž bylo zjištěno, že kvasný nápoj obsahující *L. casei* zlepšuje náladu zdravých dospělých pacientů s mírnou depresí a snižuje úzkost [76, 77].

Metabolické poruchy: Přisun probiotik by mohl být jednou z cest k mikrobiální rovnováze v GIT. Nerovnováha bývá často způsobená dietami obsahující vysoký podíl tuků. Vysoký obsah tuku může měnit profil střevní mikroflóry a následně snížit funkci epitelu jakožto bariery, zvýšit přítomnost endotoxinů v krvi, což následně vede k systémovému zánětu až nakonec k metabolickým poruchám [76, 77].

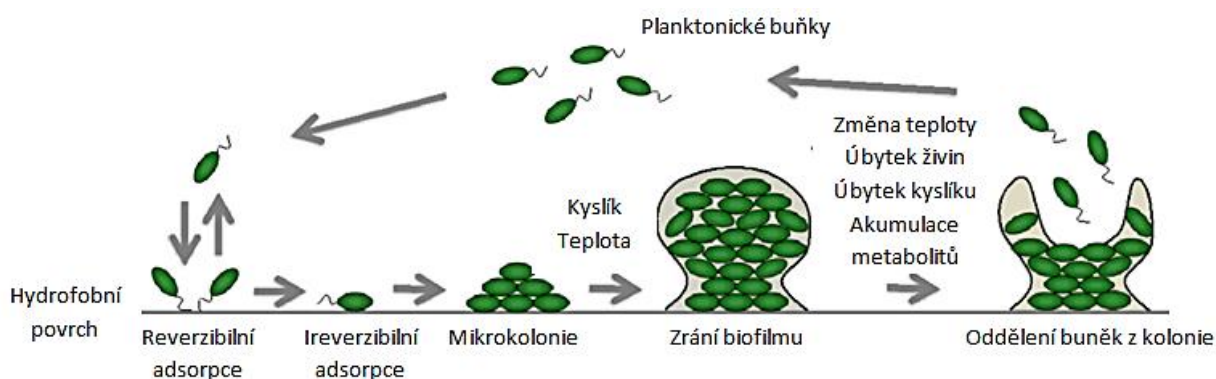
2.7 Biofilm

Pozitivní vliv adheze mikroorganismů se vyskytuje v rámci biotechnologické laboratorní i průmyslové praxe například při využívání imobilizovaných buněk ve výrobních linkách nebo při čištění odpadních vod. Další pozitivní vlastností je tvorba biofilmu v rámci medicínských aplikací, díky kterému jsou prospěšné mikroorganismy zachyceny na pohyblivém epitelu orgánů v lidském těle a mohou tak vykonávat své prospěšné efekty na lidské zdraví. Tvorba biofilmu má i negativní vliv, a to například v podobě zanícení katetrů. V rámci průmyslové aplikace mohou mikroorganismy ulpívající na povrchy způsobovat nákladné poruchy např. na papírenských strojích, na lodích a námořních stavbách, na biomateriálech v oblasti medicínských aplikacích [7, 8]. Biofilmy byly poprvé studovány v 17. století Van Leeuwenhoekem, který charakterizoval biofilm na svých vlastních zubech. Následně byla biofilmům věnována čím dál větší pozornost a roku 2002 vyšla nejnovější mikrobiálně odvozená definice: „Biofilm zahrnuje společenstvo charakterizované buňkami, které jsou nevratně připojeny k substrátu nebo k rozhraní, případně k sobě navzájem (jednodruhová či vícedruhová společenstva) a jsou obaleny tzv. extracelulární nebo-li mimobuněčnou maticí, tvořenou sloučeninami, které buňky samy produkují a vykazují změněný fenotyp vzhledem k rychlosti růstu a transkripci genu.“ [78].

Nezastavující rozvoj v oblasti probiotických léčiv a doplňků se zabývá i slizničními biofilmy v tlustém střevě, jakožto nejvíce kolonizovanou částí GIT. Bakterie rostoucí v biofilmech jsou obecně odolnější vůči antibiotikům, kyselému prostředí, vysokým teplotám a mechanickému poškození než bakterie, které ve společenství žít [79].

2.7.1 Tvorba biofilmu v GIT

Bylo navrženo pět etap zahrnujících tvorbu biofilmu (viz obr. 10). V první etapě dochází k nahromadění organických molekul na povrchu bakterií během několika sekund a k počáteční adsorpci planktonních buněk na fázovém hydrofobním rozhraní [14], která je silně závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech bakteriálního povrchu buněk. V tomto kroku vzniká reverzibilní adheze buněk k mucusu či k sobě navzájem, kdy se buňky mohou zpět navrátit do planktonního stavu. Druhá etapa zahrnuje ireverzibilní připojení k EPS. Třetí etapa označuje prvotní vývoj biofilmové architektury nebo-li buňky začínají agregovat do mikrokolonií, které jsou výsledkem souběžné akumulace a růstu mikroorganismů. Navíc se jedná o hlavní fázi produkce EPS, které napomáhají posílit vazbu mezi bakteriemi a substrátem a stabilizují kolonii před jakýmkoli environmentálním stresem. Ve čtvrté fázi biofilm dozrává a rozvíjí se v organizovanou strukturu, která může být plochá nebo houbovitá, v závislosti na zdroji živin a probíhá až několik dní (10 a více). V posledním pátém stádiu se buňky biofilmu oddělí od kolonie a přechodně se vrátí do planktonické podoby [78, 80, 81].



Obr. 10: Schématické znázornění vzniku biofilmu [82].

Z principu vyplývá, že tvorba biofilmu je závislá na hydrofobicitě povrchu buněk, protože se jedná o první krok adheze k hydrofobním povrchům. Nicméně jde o poměrně novou problematiku a detailní mechanismus není prozatím zcela popsán. Předpokládá se, že vytváření biofilmu představuje nejenom hydrofobní interakce, ale jedná se o komplexnější a složitější mechanismus [14]. Bylo pozorováno, že již celistvé biofilmy nejsou pouze strukturní monovrstvy mikrobiálních buněk na povrchu, ale jsou heterogenní jak v čase, tak prostoru [78]. Tato heterogenní struktura je ovlivňována různými faktory jako je rychlost syntézy biofilmu, chemické složení mucusu, rychlost obměny mucusu, dostupnost adhezních míst, složení probiotické výživy nebo přítomnost enzymů např. produkce lysozymu. Navíc bylo prokázáno, že zralý biofilm má větší antimikrobiální aktivitu a více toleruje kyselé prostředí než-li nově vytvořený biofilm a jeho vlastnosti závisí na hustotě buněk, které je tvoří [78, 80, 81].

2.7.2 Probiotické bakterie tvořící biofilm

Bakterie se nacházejí v přírodě ve dvou formách: buď jako volně plovoucí planktonické bakterie nebo jako přisedlé kolonie mikroorganismů tvořících biofilmy [80]. Z dostupných zdrojů tvoří biofilm většina probiotických bakterií zejména rody *Bifidobacterium* (*B. breve*,

B. animalis atd.) [83] a *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* atd.). Zmíněné probiotické druhy jsou využívány jako komerční probiotické organismy, které se sdružují do různých generací v závislosti na jejich léčivé formě. Obecně by měly být probiotické přípravky chráněny fyzikální bariérou, aby se zabránilo kontaktu s nepříznivými podmínkami v GIT a se složkami potravy (často se probiotika začleňují do potravy). Probiotika první generace zahrnují planktonní buňky, které nejsou nijak ošetřeny ani enkapsulovány. Probiotika druhé generace zahrnují takové mikroorganismy, které jsou již upravovány například v enterosolventních kapslích, nebo tabletách, a to za účelem zvýšit odolnost vůči kyselému prostředí žaludku. Probiotické přípravky třetí generace jsou již enkapsulovány obvykle polymerním materiálem, a tím se zvyšuje jejich stabilita v intestinálním prostředí, a také je chrání proti nepříznivým faktorům při skladování a transportu (vlhkost, teplota atd.). Tyto tři generace jsou již běžně na trhu, avšak nově se zavádí probiotika čtvrté generace využívající tvorbu bakteriálního biofilmu. Biofilm v tomto případě je prospěšný z mnoha důvodů. Oproti planktonickým buňkám mají biofilmová probiotika vyšší antimikrobiální účinek a vyšší odolnost vůči kyselému pH. Další důležitou vlastností biofilmu, kterou využívají nejnovější technologie k enkapsulaci je, že biofilmová probiotika mají vyšší přilnavost k povrchům, což je pro účinná probiotika nezbytné [80].

2.8 Screening nových bakteriálních kmenů především z pohledu adhezních vlastností

V současné době EU i USA zvyšují legislativní tlak na charakterizaci probiotických přípravků a snaží se zpřísnit podmínky pro charakterizaci probiotik. Nejedná se o problém jako takový, ale nová legislativa může omezit distribuci nových probiotických kmenů a aplikací na trh. Je tedy nezbytné se novým podmínkám přizpůsobit a zformulovat efektivnější standardizovaný postup *in vitro* charakterizace probiotik. Od prvních dnů průzkumu probiotik byl *in vitro* screening probiotik vhodnou volbou kvůli jednoduchosti a nízké ceně a tyto testy se nadále hojně používají kvůli schopnosti prověřovat několik kmenů současně. Mezi tato stanovení patří např. testy na přítomnost stresových faktorů v hostiteli, bezpečnostní testy (např. rezistence proti antibiotikům), testy zahrnující kolonizaci v hostiteli, kam patří např. hydrofobicita povrchu buněk (Rühs a kol. 2014, Rosenberg a Doyle 1990, Claudia Otero a kol. 2004), adheze na mucin (Laparra a kol. 2009), adheze na intestinální hlen (Ferreira a kol. 2011, Apostolou a kol. 2001), stanovení glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (Kinoshita a kol. 2008) antimikrobiální testování, imunomodulace atd. [84]. Nicméně se začínají užívat technologie molekulárních Omics, které by v budoucnu mohly tyto tradiční technologie zcela nahradit. Omics představuje technologii zaměřenou především na univerzální detekci genů (genomika), mRNA (transkriptomika), proteiny (proteomika) a metabolity (metabolomika) ve specifickém biologickém vzorku a na detekci analytu hlavně pomocí hmotnostní spektrometrie. Analýza vyžaduje zapojení statistiků a bioinformatiků, protože vzniká obrovské množství dat, tudíž se nejedná o jednoduchou a rychlou metodu [85]. Využíváním této metody by se mohly mikroorganismy nahrazovat účinnými složkami nebo metabolity a mikroorganismy tak nebudou nutné. Také by mohlo dojít k posunu některých aplikací z potravinářské na farmaceutickou oblast [84].

Ferreir a kol. (2011) studovali adhezi sedmi nově izolovaných kmenů *Lactobacillus gasseri* (UFVCC 1083, 1091, 1099, 1103, 1105, 1108 a 1111) na intestinální hlen izolovaný z lidského tlustého střeva. Tyto kmeny lactobacilu byly izolovány z výkalů zdravého novorozence dítěte. Dále byly tyto kmeny charakterizovány v závislosti adheze na mucus v přítomnosti patogenů *Cronobacter sakazakii* (ATCC 29544) a *Clostridium difficile* (1296) příležitostně se vyskytujících u dětí do 12 měsíců. V rámci testování používali UV-VIS techniky měření, kdy stanovovali A_{600} před agregací a po koagregaci bakteriálních kmenů, navíc veškeré organismy byly radioaktivně značené. Adheze byla následně vyjádřena jako procento radioaktivity získané po adhezi vzhledem k radioaktivitě bakteriální suspenze přidané k imobilizovanému hlenu. Všechny kmeny ať jednotlivě nebo v kombinaci vykazovaly významné adhezni vlastnosti a v jejich kombinaci se prokázaly jako významní antagoonisté proti vybraným patogenům [86].

Laparra a kol. (2009) uvádějí výsledky z adhezních experimentů na intestinální surový mucin (typ II, Sigma-Aldrich) v závislosti na přítomnosti Caco-2 buněčných kultur tvořící homogenní monovrstvu připomínající zralé lidské erytrocyty v tenkém střevě. Probiotické kmeny *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum* (IATA-ES1), *Bifidobacterium animalis* (IATA-A2) a jejich kombinace byly testovány na polykarbonátových jamkách ošetřených mucinem (různých typů) s/bez Caco-2 buněčných kultur. Výsledky naznačují, že bakteriální kmeny vykazují různě silnou adhezi na buněčné komponenty a několik typů mucinu přítomných v modelech, ukazující preference pro intestinální MUC2. Tato studie otevřela nové cesty ke měření adheze použitím Caco-2 buněk se surovým mucinem, díky čemuž se získané výsledky o probiotických bakteriích více blíží fyziologickým podmínkám *in vivo* [87].

Apostolou a kol. (2001) porovnávali 55 bakteriálních kmenů na adhezi k střevnímu hleny zahrnující lactobacily, bifidobakterie, carnobakterie a enterokoky. Použité kmeny se lišily místy, ze kterých byly izolovány, např. bylo použito 5 kmenů bifidobakterií: jeden získaný klinicky z krevních kultur běžně nemocných pacientů, tři z fekálních buněk zdravých dospělých dobrovolníků a jeden pocházel z mléka. Následně byla měřena radioaktivita scintilací a adheze byla vyjádřena jako procento radioaktivity získané z jamek obsahující mucus a bakterie ku radioaktivně značené bakteriální suspenzi. Ze studie vyplývá, že izoláty odebrané z krevní kultury adherují lépe než ty mléčné, avšak tyto výsledky neplatily pro všechny kmeny, a proto je adheze pravděpodobně ovlivňována ještě dalšími faktory [88].

V další studii *Kinoshita a kol. (2008)* identifikovali glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH) exprimovanou na povrchu buněk jako adhezín na mucin u *Lactobacillus plantarum* LA 318 na intestinální mucin izolovaný z lidských střev. Stanovení proběhlo pomocí BIACORE senzoru, který je založen na principu povrchové plasmové resonance (SPR). Ze studie vyplývá, nejen nový identifikovaný adhezín, nýbrž i skutečnost, že tento adhezín vlastní i mnoho patogenů, a proto lactobacily s GAPDH mohou soutěžit s patogeny infikujícími střevní sliznici [89].

Shi a kol. (2000) studovali vybrané polymerní materiály v kombinaci s mucinem jakožto ochrannou vrstvou proti adhezi patogenních bakterií *Staphylococcus aureus* a *S. epidermidis*.

Většina polymerních materiálů má hydrofobní povahu, a proto se mucin na tyto povrchy bude adsorbovat svými proteinovými částmi a sacharidové hydrofilní postranní řetězce se budou obklopotvat vodou. Z tohoto důvodu mohou být mucinové povlaky použity pro snížení rizika mikrobiálních infekcí na polymerních biomateriálech, tím že sníží jejich hydrofobicitu. Klíčové v této studii bylo porovnat adhezi vybraných bakterií na materiály s mucinovým pokrytím a bez ochranné vrstvy. Mucinem potažené materiály byly inkubovány na inkubátorové třepačce při 80 rpm, 37 °C po dobu 2 h, navíc byly stejné bakterie inkubovány za stejných podmínek po dobu 3 h s mucinem o koncentraci (1 mg/ml). Následná adheze byla identifikována pomocí mikroskopických technik. Adheze vybraných bakterií byla snížena v přítomnosti mucinu, protože přítomnost mucinu vede ke změně vlastností materiálu a ke změně interakcí. Současně mucinový povlak poskytuje bariéru proti zmíněným bakteriím [90].

Rosenberg a Doyle (1990) se zabývali hydrofobitou buněk mikroorganismů a jejich testování z této perspektivy rozdělili do dvou kategorií. První kategorie zahrnuje měření kontaktních úhlů (CAM), rozdělení buněk do jedné nebo jiné kapalně fáze (TTP) a adsorpce jednotlivých hydrofobních molekulárních sond na povrchu buněk a jejich výsledkem jsou data poukazující na hydrofobnost povrchu buněk jako celku. Druhá kategorie zahrnuje mikrobiální adhezi k uhlovodíkům (MATH) někdy se setkáváme i s druhým názvem tohoto experimentu BATH (bakteriální adheze k uhlovodíkům). Dále kategorie zahrnuje hydrofobní interakční chromatografii (HIC) a adhezi k polystyrenu a dalším hydrofobním pevným povrchům. Na základě těchto experimentů byly bakterie klasifikovány jako hydrofobní, tedy potenciálně adhezní k intestinálnímu epitelu [91].

Claudia Otero a kol. (2004) studovali bakteriální povrchové vlastnosti kmenu *Lactobacillus* z pohledu hydrofobnosti třemi testy. Prvním testem byl MATH (mikrobiální adheze k uhlovodíkům), experiment, při kterém dochází ke smíchání promytých buněčných suspenzí s testovanými uhlovodíky po určitou dobu. Následně se spektrofotometricky měří snížení zákalu ve vodné fázi. Další použitou metodou byla SAT (zkouška agregace soli) zakládající se na skutečnosti, že vysoce hydrofobní bakterie jsou schopny agregovat s charakteristickými vzory v přítomnosti různých koncentrací síranu amonného. Posledním použitým testem byla hemaglutinace (HA), kdy se využívá vlastnosti povrchu erytrocytů vázat mikroorganismy jako tkáňové buňky. Tato podobnost je dána sdílením ontogenetického původu vyznačující se např. tím, že epiteliální buňky exprimují vnější molekuly podobné membráně červených krvinek a bakteriální buňky tak mohou lehce adherovat na tento povrch [92].

Některé z uvedených testů se staly inspirací pro experimentální část předložené diplomové práce. Nicméně další inspirativní studie jsou uvedeny u konkrétních případů v experimentální části.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V rámci experimentální části diplomové práce byla klíčová optimalizace metody na charakterizaci adheze vybraných probiotických bakterií na mucin. Další částí práce bylo pomocí fyzikálně-chemických a analytických metod charakterizovat možné interakce přispívající k adhezi probiotických bakterií na mucin.

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Vybrané probiotické bakteriální kmeny

Pro experimentální práci byly vybrány probiotické bakteriální kmeny *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium breve* CCM 7825, *Bacillus coagulans* CCM 2658 a potencionální probiotický kmen *Lactobacillus zeae* CCM 7069 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.1.2 Chemikálie

Citrán trisodný dihydrát (Spolek pro chemickou a hutní výrobu)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, s.r.o.)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lach-ner, s.r.t.)

Destilovaná voda

Glycin (Lach-ner, s.r.o.)

Hexadekan (Sigma-Aldrich)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-ner, s.r.o.)

Chlorid draselný, (Sigma Aldrich Inc.)

Chlorid sodný, (Sigma Aldrich Inc.)

Kyselina citronová bezvodá (Lach-ner, s.r.o.)

Kyselina chlorovodíková 35–38% (Lach-ner, s.r.o.)

Kyselina octová 99 % (PLIVA-Lachema a.s.)

Media Mikrobiologi *Lactobacillus* MRS Broth (Himedia)

Mucin z prasečího žaludku Typ II (Sigma-Aldrich)

Octan sodný bezvodý (Lach-ner, s.r.o.)

Propidium jodid, eBioscience (USA)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Lach-ner, s.r.o.)

Veškeré použité chemikálie byly čistoty minimálně p.a.

3.1.3 Přístroje a zařízení

Analytické váhy, Boeco (SRN)

Běžné laboratorní sklo a vybavení

Centrifuga, Hettich EBA 20

Inkubátor, LTE Scientific, IP60

Koloidní analyzátor Zetasizer Nano Series, Malvern (UK)

Laminární box Aura mini, BioAir – Euroclone

Magnetická míchačka, Kartell, TKO

Minicentrifuga, Sigma 1.14 (SRN)
Nanofotometr, Implen, P 300
pH-metr 720, inoLab, Merci s.r.o. (NLD)
Programovatelný rotátor typ Multi Bio RS-24
Průtokový cytometr, Apogee Flow Systems, Apogee A50
Temperovaná třepačka, Heidolph, Incubator 1000
Přesné váhy, Kern EW 620-3NM
Vortex TK3S, Kartell spa
Vortex, Heidolph Reax Top

3.2 Uchovávání zdrojových bakteriálních kultur

Pro oživení bakterií vybraných probiotických kmenů bylo připraveno médium *Lactobacillus* MRS Broth (MRS) o koncentraci 55,15 g/l. Příslušné množství MRS bylo naváženo na předvážkách do kádinky o objemu 250 ml a doplněno příslušným množstvím destilované vody (dH₂O). Pomocí magnetické míchačky byl roztok rozpuštěn a převeden do čtyř zkumavek. Zkumavky byly sterilizovány v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 60 minut. Po ochlazení na pokojovou teplotu byly centrifugační zkumavky přesunuty do vysterilovaného laminárního boxu, kde se následně pracovalo s bakteriálními kulturami. MRS médium bylo v zásobní láhvi uchováváno ve 4 °C nejdéle 1 týden.

Složení MRS média:

Pepton	10 g
Masový extrakt	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukóza	20 g
Polysorbát 80	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
CH ₃ CO ₂ Na	5 g
Citrát amonium	2 g
MgSO ₄	0,1 g
MnSO ₄	0,05 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Bakterie v lyofilizované formě byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Tyto ampulky se následně rozbily ve sterilním prostředí boxu pomocí plamene, sterilní dH₂O a pinzety. Do otevřené ampulky se pomocí sterilního kapátka přidalo k lyofilizované kultuře MRS médium. Následně se kultura v médiu promíchala a přelila do centrifugačních zkumavek. Tento postup se opakoval, dokud nebylo převedeno veškeré množství lyofilizované kultury do centrifugačních zkumavek. Takto připravené kultury byly kultivovány ve vytemperovaném termostatu na 37 °C. Bakterie byly odebírány ve stacionární fázi a dále uchovávány při teplotě 4 °C. Za účelem zachování jejich adherentních vlastností bylo nutné bakterie přeočkovat každých 30 dnů.

3.3 Kultivace vybraných probiotických kmenů

Pro kultivaci inokul byly v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem vysterilizovány po dobu 60 minut zkumavky a MRS médium v zásobní láhvi o koncentraci 55,15 g/l. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo ve vysterilizovaném laminárním boxu pipetováno 10 ml MRS média do zkumavek a do každé zkumavky byl přidán 1 ml vybrané zdrojové bakteriální kultury v závislosti na experimentu. Bakterie byly kultivovány ve vytemperovaném termostatu při 37 °C po dobu určenou v závislosti na experimentu a na použitém mikroorganismu.

3.4 Optimalizace spektrofotometrické metody ke stanovení bakteriální adheze k mucinu

V následujících kapitolách jsou popsány veškeré optimalizační kroky k metodě stanovení adheze vybraných bakteriálních kmenů.

3.4.1 Příprava roztoků využitých při optimalizaci metody

Jako prostředí pro sledování bakteriální adheze na mucin byly zvoleny různé pufrы a roztoky simulující podmínky v lidském těle nebo pufrы běžně využívané pro práci s biopolymery či živými systémy.

Příprava PBS pufru (pH 7,5)

Pufr byl připraven do skleněné zásobní lahve rozpuštěním navážek jednotlivých složek pomocí magnetické míchačky v příslušném množství dH₂O.

Složení PBS pufru:

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2,897 g/l
KCl	0,2 g/l
NaCl	8 g/l
KH ₂ PO ₄	0,24 g/l

Příprava fosfátového pufru (100 mM, pH 7,4)

Pro přípravu 100mM fosfátového pufru bylo na předvázkách naváženo 3,522 g NaH₂PO₄·2H₂O a 27,728 g Na₂HPO₄·12H₂O. Toto množství bylo následně kvantitativně převedeno do skleněné zásobní lahve a obsah navážky byl doplněn 1 l dH₂O. Směs byla následně rozpuštěna na magnetické míchačce a pH bylo zkontrolováno pomocí pH-metru.

Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven jako 0,9% roztok NaCl. Na předvázkách bylo naváženo 9 g NaCl, které bylo kvantitativně převedeno do skleněné zásobní lahve a následně rozpuštěno v 1 l dH₂O. Roztok byl řádně promíchán.

Příprava glycinového pufru (100 mM, pH 8,6)

Pro přípravu 100mM glycinového pufru bylo naváženo 7,5 g glycinu na předvázkách, množství bylo kvantitativně převedeno do skleněné zásobní lahve a následně byl glycin rozpuštěn v 1 l dH₂O pomocí magnetické míchačky. pH roztoku bylo zkontrolováno pH-metrem.

Příprava citrátového pufru (100 mM, pH 5)

Nejprve byl připraven roztok A obsahující 21 g kyseliny citronové v 1 l dH₂O. Následně byl připraven roztok B obsahující 29 g dihydrátu citranu trisodného v 1 l dH₂O. Pro pH 5 bylo smícháno 350 ml roztoku A s 650 ml roztoku B do skleněné zásobní láhve a pH bylo zkontrolováno pomocí pH metru.

Příprava octanového pufru (100 mM, pH 4)

Pro přípravu 100mM octanového pufru bylo na předvážkách naváženo 3,28 g octanu sodného, který byl následně kvantitativně převeden do 200 ml odměrné banky. Octan sodný byl rozpuštěn v dH₂O, bylo přidáno 2,3 ml kyseliny octové a zbylý objem byl doplněn dH₂O. Ze vzniklého roztoku bylo odebráno 50 ml do 1l odměrné baňky a dH₂O byl roztok doplněn do ¾ objemu odměrné baňky. Pomocí kyseliny octové bylo upraveno pH na hodnotu 4. Po úpravě pH byl objem doplněn po rysku dH₂O, promíchán a přelit do skleněné zásobní láhve.

Příprava Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4)

Na předvážkách byl navážen tris(hydroxymethyl) pro požadovanou koncentraci 6,059 g/l. Navážka byla následně kvantitativně převedena do 1 l odměrné baňky a doplněna do ¾ objemu dH₂O. Pomocí magnetické míchačky byla navážka rozpuštěna a 3M HCl bylo upraveno pH na hodnotu 7,4 pomocí pH-metru. Po úpravě pH byl objem doplněn po rysku dH₂O, promíchán a přelit do skleněné zásobní láhve.

3.4.2 Příprava vzorků bakteriálních kultur

Vybrané bakteriální kmeny byly kultivovány dle kapitoly 3.3 a narostlé kultury byly odebírány v různých časech v závislosti na experimentu. Kultivované bakterie byly převedeny do centrifugačních zkumavek a stáčeny po dobu 5 min při 5 000 rpm. Supernatant byl slit a k sedimentu buněk bylo přidáno 5 ml dH₂O za účelem promytí bakteriálních buněk od MRS média. V promývacím kroku byly bakteriální buňky pomocí pipety rozsuspendovány v dH₂O a opět centrifugovány po dobu 5 min při 5 000 rpm. Supernatant byl opět slit a finální sediment buněk byl pipetou rozsuspendován v destilované vodě.

Bakterie byly promývány dH₂O na základě informací ze studie *Kinoshita a kol.* [89]. Zmíněná studie dospěla k závěru, že promývání bakteriálních buněk PBS pufrem významně snižuje adhezenční vlastnosti probiotických bakterií oproti promývání dH₂O. Z tohoto důvodu byla pro další experimenty vždy používána dH₂O pro promývání bakteriálních suspenzí.

3.4.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a sedimentace vybraných bakterií

Pro sjednocení optické hustoty (OD₆₀₀) pro všechny vybrané bakteriální kmeny bylo nejprve určeno, zda je možné považovat absorbanci při vlnové délce 600 nm za koncentraci bakteriálních buněk v roztoku. Pro experimenty zahrnuté v této kapitole byla jako modelová bakterie vybrána bakterie mléčného kvašení (BMK) *L. rhamnosus*, která sdílí podobnost s ostatními BMK využívanými v rámci experimentální části práce. Bakterie *L. rhamnosus* byla kultivována viz kapitola 3.3 a její zásobní vzorek byl připraven viz kapitola 3.4.2. Zásobní roztok vzorku *L. rhamnosus* byl postupným ředěním dH₂O upraven na hodnotu absorbance 2,50 při 600 nm oproti dH₂O jako blanku. Dále byly určeny teoretické hodnoty

absorbance roztoků na 2,50; 2,25; 2,00; 1,75; 1,50; 1,25; 1,00 a 0,5 a následně byly zmíněné roztoky připraveny ředěním ze zásobního roztoku. U takto připravených vzorků byly na nanofotometru, Implen, P 300 proměřeny experimentální hodnoty absorbance, které byly následně vyneseny do závislosti experimentálních absorbancí na teoretických hodnotách absorbance.

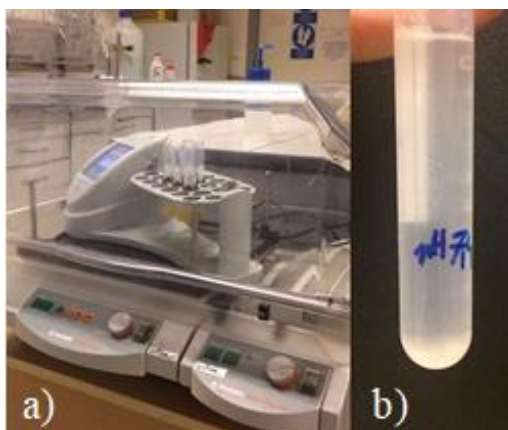
Hodnota absorbance je vždy ovlivňována rychlostí sedimentací vzorku v kyvetě. Pro experimentální stanovení sedimentace bakteriální suspenze *L. rhamnosus* byly postupným ředěním připraveny vzorky o absorbanci 2,25; 1,75 a 1,25 měřené při 600 nm oproti dH₂O jako blanku. Rychlost sedimentace byla stanovována proměřením absorbance daného vzorku po dobu 1 h v intervalu 10 min.

3.4.4 Pilotní stanovení rozpustnosti mucinu

V prvním kroku ke stanovení rozpustnosti mucinu byly vybrány 4 koncentrace (0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml a 1,5 mg/ml) mucinu inspirovány studií *Shi a kol.* [90]. Příslušné navážky mucinu byly naváženy na analytických vahách do centrifugačních zkumavek a rozpuštěny řádným protřepáním v PBS pufru (*Shi a kol.* [90]). Z takto připravených zásobních vzorků mucinu byly připraveny jednotlivé vzorky pro spektrofotometrické stanovení OD₆₀₀. Jednotlivé vzorky byly vystaveny inkubaci po dobu 1 h, 2 h s 3 h na vytemperované třepačce na 37 °C. V čase nula a v jednotlivých časech inkubace byly vzorky odebírány a byla proměřena jejich OD₆₀₀ oproti PBS pufru jako blanku.

3.4.5 Příprava roztoku mucinu

Na základě výsledků z pilotního experimentu rozpustnosti mucinu byl mucin pro nadcházející experimenty vždy připravován ve sterilních centrifugačních zkumavkách na programovatelném rotátoru (20 rpm), který byl umístěn ve vytemperované třepačce na 37 °C viz obr. 11a). Mucin byl vždy rozpouštěn ve sterilním příslušném roztoku přes noc. Na základě informací [93] měl být rozpouštěný mucin mléčně zbarvený, což bylo potvrzeno viz obr. 11b).



Obr. 11: a) aparatura k rozpouštění mucinu, b) mléčně zbarvený roztok mucinu.

3.4.6 Stanovení absorpčního spektra mucinu

Zásobní roztoky mucinu byly připraveny v PBS pufru ve 4 koncentracích (0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml a 1,5 mg/ml) do centrifuganích zkumavek viz kapitola 3.4.5.

Ze zásobních roztoků mucinu bylo odpipetováno potřebné množství do mikrozkušavek typu Eppendorf. Takto připravené vzorky byly inkubovány na vytemperované třepačce na 37 °C po dobu 1 h, 2 h a 3 h. Vzorky odebrané v daných časových intervalech byly následně stočeny (5 min, 5 000 rpm) a ze supernatantu bylo odebráno 100 µl do 900 µl PBS pufru v mikrozkušavkách. U vzorků byla ve třech sériích proměřena absorpční spektra od 200 nm do 500 nm ve křemenné mikrokvetě oproti PBS jako blanku.

3.4.7 Studium adheze buněk na mucin

Základní kostrou metody stanovení adheze bakterií na mucin bylo nejprve nutné příslušné mikroorganismy nakultivovat ze zdrojových kultur viz kapitola 3.3. Následně byl připraven roztok mucinu o koncentraci 1,5 mg/ml v příslušných optimalizačních roztocích viz kapitola 3.4.5. Bakteriální kultury byly odebírány ve stacionární fázi kultivace a jejich vzorky byly připraveny viz kapitola 3.4.2. U vzorků bakteriálních kultur, bylo vždy nastavené OD₆₀₀ na hodnotu 1,75. Z takto připravených bakteriálních kultur bylo odebráno příslušné množství bakteriální kultury do mikrozkušavek typu Eppendorf a následně byly kultury centrifugovány (5 min, 5 000 rpm). Supernatant byl odpipetován a sediment buněk byl smíchán s roztokem mucinu v příslušném poměru. Připravené vzorky byly inkubovány na temperované třepačce (80 rpm, 37 °C) a podmínky inkubace byly inspirovány na základě studie Shi a kol. [90]. Po inkubaci byly vzorky odebírány v různých časových intervalech a byly stáčeny na centrifuze (5 min, 5 000 rpm). Ze vzorků byl vždy odebírán supernatant, který byl 10x zředěn v příslušném roztoku a byla proměřena jejich absorbance při 260 nm ve zužené křemenné kyvetě oproti příslušnému roztoku jako blanku. Takto připravené vzorky byly měřeny vždy ve třech sériích.

Roztok mucinu o koncentraci 1,5 mg/ml byl připravován v příslušném optimalizovaném roztoku. Takto připravený roztok mucinu byl vždy měřen i jako kontrolní vzorek k bakteriální adhezi na mucin a byl inkubován, posléze stáčen a spektrofotometricky měřen ve třech sériích za stejných podmínek jako studované vzorky.

3.4.7.1 Optimalizace metody

Při optimalizaci metody byly měněny různé parametry metody viz tab. 3. Vzorky byly připraveny a spektrofotometricky proměřeny viz kapitola 3.4.7. Taktéž byl pro jednotlivá měření připravován kontrolní vzorek mucinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.7.

Tab. 3: Optimalizační podmínky.

Bakterie	Bakterie:mucin	Čas inkubace	Optimalizační roztoky
<i>L. rhamnosus</i>	1:1	10 min	PBS pufr (pH 7,5)
<i>L. plantarum</i>	1:2	20 min	Destilovaná voda
	1:4	40 min	Fyziologický roztok
		60 min	Tris-HCl pufr (50 mM, pH 7,4)
		3 h	Glycinový pufr (100 mM, pH 8,6)
			Octanový pufr (100 mM, pH 4)
			Fosfátový pufr (100 mM, pH 7,4)
			Citrátový pufr (100 mM, pH 5)

3.4.8 Stanovení viability vybraných bakteriálních kultur

Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena viabilita mikroorganismů zmíněných v kapitole 3.1.1. Bakterie byly kultivovány viz kapitola 3.3 a následně byly kultury odebírány ve stacionární fázi kultivace. Jednotlivé bakterie ve skleněných zkumavkách byly pipetou rozsuspendovány a do eppenderfovy mikrozkušavky bylo odebráno 100 µl konkrétní bakteriální suspenze. K takto odebraným bakteriím bylo přidáno 900 µl vysterilizovaného PBS pufru (pH 7,5). Vzorky bakterií s PBS pufrem byly šetrně zvortexovány a stáčeny v centrifuze při 5 000 rpm po dobu 2 min. Supernatant byl slit a k sedimentu byl přidán 1 ml PBS pufru a mikrozkušavky byly opět stáčeny za stejných podmínek. Tento postup byl proveden ještě jednou a k finálnímu sedimentu byl již přidán 1 ml PBS. K takto připravenému vzorku bylo přidáno 5 µl roztoku propidium jodidu v dH₂O (1 mg/ml). Následně byly vzorky ponechány ve tmě po dobu 10 min, aby došlo k účinnému obarvení a u takto připravených vzorků byla proměřena viabilita buněk na průtokovém cytometru (Apogee Flow Systems, Apogee A50).

3.4.9 Verifikace metody pomocí vybraných bakterií

Za účelem prověření funkčnosti adhezí metody na mucin byly pro kultivaci vybrány bakteriální kmeny viz kapitola 3.1.1. Tyto bakteriální kmeny byly kultivovány, dále upravovány a měřeny podle postupu uvedeného v kapitole 3.3. Pro tento experiment byl navíc zvolen roztok mucinu (1,5 mg/ml) v Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4), pro měření byl vzorek bakterií smíchán s roztokem mucinu v poměru 1:4 a jednotlivé vzorky byly inkubovány po dobu 20 min (37 °C, 80 rpm). Taktéž byl připravován kontrolní vzorek mucinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.5.

3.5 Charakterizace vlivů ovlivňujících mikrobiální adhezi na mucin

Na základě výsledků z primárních optimalizačních kroků byly vyvozeny možné vlivy ovlivňující adhezi probiotických bakterií na mucin (viz tab. 4). Vzorky byly připraveny a spektrofotometricky proměřeny viz kapitola 3.5, avšak pro tyto účely byla jako modelová bakterie zvolena pouze *L. rhamnosus*, byl vybrán poměr přípravy vzorků 1:4, čas inkubace vzorků byl stanoven na 20 min a roztok mucinu byl připravován v Tris-HCl pufru.

3.5.1 Vliv koncentrace mucinu při kultivaci *L. rhamnosus*

Pro stanovení vlivu koncentrace mucinu na adhezi probiotických bakterií k mucinu byl na analytických vahách připraven mucin o koncentracích uvedených v tab. 4. Jednotlivé koncentrace mucinu, byly následně sterilizovány UV zářením v laminárním boxu po dobu 1 h. Do vysterilizovaných zkumavek bylo rozpipetováno 10 ml vysterilizovaného MRS média (55,15 g/l). Následně byla do zkumavek převedena příslušná koncentrace sterilního mucinu a k takto obohacenému médiu byl přidán 1 ml *L. rhamnosus* ze zdrojové kultury. Takto připravené vzorky byly kultivovány a dále upravovány a měřeny podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.1 Pro tento experiment adheze *L. rhamnosus* k mucinu byl zvolen roztok mucinu (1,5 mg/ml) v Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4).

3.5.2 Vliv teploty inkubace na adhezní vlastnosti *L. rhamnosus*

Dalším experimentem, bylo stanovení teploty působící na bakterie během jejich inkubace s mucinem. Vzorky byly připraveny a proměřeny viz kapitola 3.5.2, avšak byla proměřena škála teplot uvedená v tab. 4.

3.5.3 Vliv pH a iontové síly prostředí na adhezní vlastnosti *L. rhamnosus*

Posledním vybraným vlivem, který mohl ovlivňovat adhezi bakterií na mucin byla iontová síla a pH Tris-HCl. Roztok mucinu byl připraven v Tris-HCl pufru viz kapitola 3.4.5, nicméně v závislosti na vybraných parametrech experimentu (tab. 4). Pomocí pH-metru upravované pH a postupným ředěním z 1 M roztoku byla upravována iontová síla Tris-HCl pufru. Následně byly vzorky připraveny a proměřeny viz kapitola 3.5.3.

Tab. 4: Přehled testovaných parametrů ovlivňujících adhezi mikrobiálních buněk na mucin.

Cmucinu při kultivaci [mg/ml]	Teplota inkubace [°C]	pH _{Tris-HCl} [-]	Iontová síla _{Tris-HCl} [mol/l]
0,05	25	6	0,01
0,2	30	7	0,025
0,4	37	7,4	0,05
0,6	42	8	0,1
0,8	47	9	0,5
1			
1,5			

3.6 Charakterizace adheze *L. rhamnosus* v různých fázích kultivace

Pro tento experiment probíhala příprava vzorků a jejich následné proměření dle postupu uvedeného v kapitole 3.4.7. Jako modelový mikroorganismus byl zvolen *L. rhamnosus*. Roztok mucinu (1,5 mg/ml) byl připraven v Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4). Bakteriální kultury byly odebírány v časových intervalech 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h a 96 h kultivace. Pro měření byl vzorek bakterií smíchán s roztokem mucinu v poměru 1:4 a jednotlivé vzorky byly inkubovány po dobu 20 min (37 °C, 80 rpm). Taktéž byl připravován kontrolní vzorek mucinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.7.

3.6.1 Gravimetrické stanovení růstové křivky *L. rhamnosus*

Pro gravimetrické stanovení růstové křivky byly nejprve po dobu 24 h vysušeny v inkubátoru centrifugační zkumavky při 60 °C. Jako modelový organismus byl vybrán *L. rhamnosus* jehož kultivace probíhala dle postupu v kapitole 3.3 a následně byly vzorky *L. rhamnosus* odebírány v časových intervalech 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h a 96 h kultivace. Z nakultivovaných kultur bylo odpipetováno 5 ml do předem zvážených a vysušených centrifugačních zkumavek a to vždy ve dvou sériích. Odebrané vzorky byly centrifugovány při 5 000 rpm po dobu 5 min, supernatant byl slit a k sedimentu bylo přidáno 5 ml dH₂O. Po šetrném rozsuspendování směsi na vortexu byly zkumavky opět stočeny za stejných podmínek. Supernatant byl opět slit a zkumavky byly vloženy do inkubátoru vytemperovaného na 60 °C a sušeny do konstantní hmotnosti. Takto vysušené zkumavky byly následně opět zváženy na analytických vahách a bylo stanoveno množství biomasy (g/l).

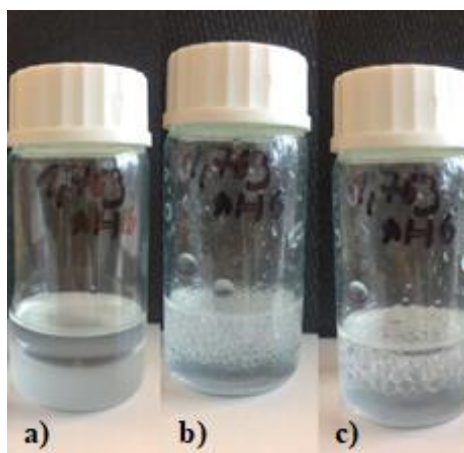
3.7 BATH metoda

Pro BATH metodu (inspirována *Rühs a kol.* [14]) byla vybrána jako modelová bakterie *L. rhamnosus*, jejichž kultivace probíhala dle postupu kapitoly 3.3. Následně byly narostlé kultury odebírány vždy ve stacionární fázi kultivace nebo v závislosti na testovaných podmínkách shrnutých v tab. 5. Takto odebrané bakteriální buňky byly převedeny do centrifugačních zkumavek a stáčeny v centrifuze při 5 000 rpm po dobu 5 min. Supernatant byl slit a k buněčnému sedimentu byla přidána dH₂O za účelem promytí. Bakteriální buňky byly pipetou rozsuspendovány a za stejných podmínek opět stočeny. Supernatant byl opět slit a k sedimentu buněk byl přidán Tris-HCl pufru viz podmínky v tab. 5.

Tab. 5: Podmínky BATH experimentů

Čas kultivace [h]	pH _{Tris-HCl} [-]	Iontová síla _{Tris-HCl} [mol/l]
4	6	0,01
8	7	0,025
12	7,4	0,05
24	8	0,1
48	9	0,5
72		1
96		

Pro spektrofotometrické stanovení procentuálního množství bakterií naabsorbovaných na rozhraní fází byly zvoleny tři koncentrace bakterií: OD₆₀₀ cca 2,25; 1,75 a 1,25. Následně byly bakteriální vzorky v Tris-HCl pufru smíchány s hexadekanem, jakožto hydrofobní fází, v poměru 1:1. Směs byla dále vortexována po dobu 2 min, a poté byly vzorky ponechány v klidu po dobu 15 min za účelem ustálení mezifázového rozhraní. Pomocí injekční stříkačky byla odebrána vodná fáze (spodní) do kyvety, tak aby se nevytvořily bubliny a absorbance vzorku byla proměřena na nanofotometru, Implen, P 300. Přejít bakteriálních buněk mezi fázovými rozhraními bylo možné pozorovat i vizuálně viz obr. 12.



Obr. 12: Vizuální kontrola přechodu bakterií do hydrofobní fáze: a) před vortexováním, b) po vortexování, c) ustálení mezifázových rozhraní.

Stejnému postupu byly podrobeny i ostatní bakteriální kmeny (viz kapitola 3.1.1), avšak jejich OD₆₀₀ bylo stanoveno na hodnotu cca 1,25 a vzorky byly připraveny v Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4). Na přístroji Zetasizeru Nano ZS byla u takto připravených vzorků (před BATH testem i po BATH testu) stanovena průměrná distribuce velikosti částic v buněčné suspenzi pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS) a pomocí elektroforetického rozptylu světla (ELS) byl u těchto vzorků proměřen ζ -potenciál popisující stabilitu buněčné suspenze v daném prostředí.

3.8 Stanovení ζ -potenciálu a průměrné distribuce velikosti vybraných bakteriálních kmenů a mucinu

Pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS byla metodou dynamického rozptylu světla stanovena průměrná distribuce velikosti částic v bakteriální suspenzi. Metodou elektroforetického rozptylu světla byl naměřen ζ -potenciál bakteriálních buněk a mucinu. Obě metody probíhaly při měnícím se pH roztoku v závislosti na použitých bakteriích. Bakterie uvedené v kapitole 3.1.1 byly kultivovány dle kapitoly 3.3 a následně odebírány ve stacionární fázi kultivace. Bakterie ve skleněných zkumavkách byly převedeny do centrifugačních zkumavek a stáčeny v centrifuze (5 000 rpm, 5 min). Supernatant byl slit a k buněčnému sedimentu byla přidána destilovaná voda a buňky byly za stejných podmínek opět stočeny. Supernatant byl opět slit a k sedimentu buněk byl přidán Tris-HCl pufru o 50mM iontové síle a pH v závislosti na vybrané bakterií. U takto připravených bakteriálních suspenzí bylo nastavené pro 10 ml roztoku OD₆₀₀ na cca 0,1.

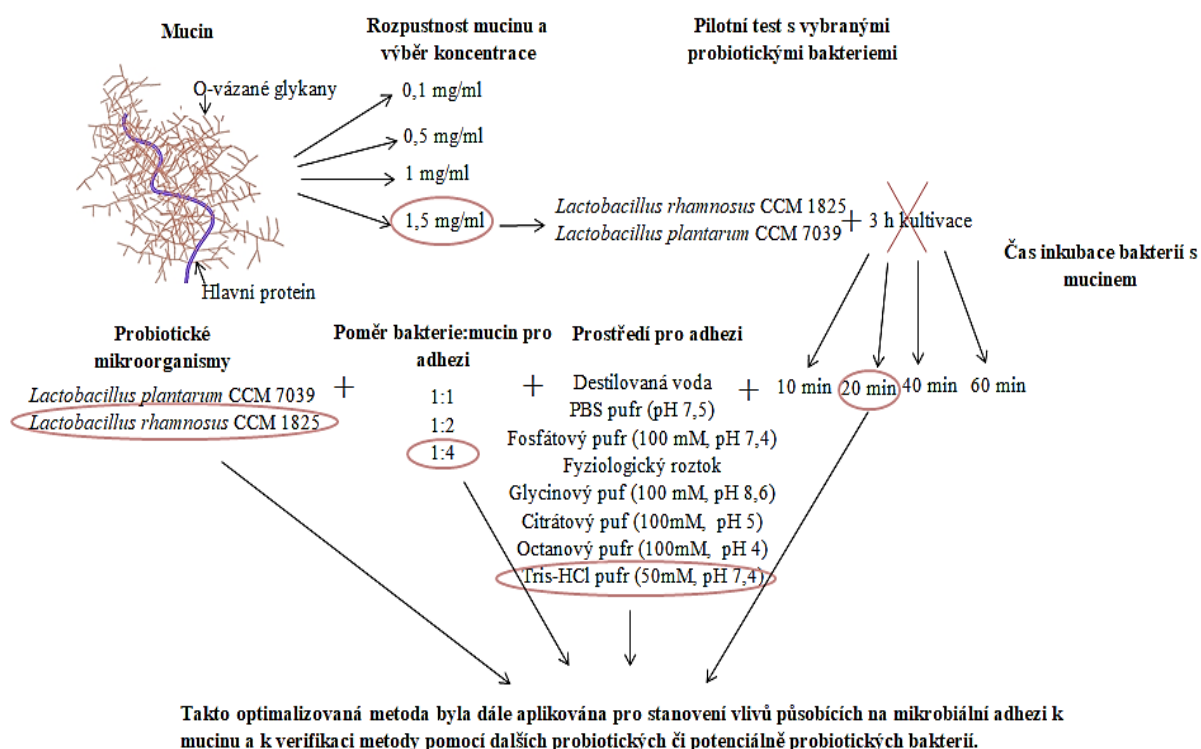
Z výsledků BATH měření ζ -potenciálu bakteriálních buněk bylo optimalizované pH Tris-HCl na hodnotu 8,5 pro *L. acidophilus* a *L. casei* a pro ostatní bakterie byl připravený Tris-HCl pufr o hodnotě pH 6. Z těchto počátečních hodnot pH roztoku bakteriální suspenze bylo pH snižováno pomocí řízeného přídávku 1M HCl na hodnotu pH 1 s krokem 0,5. Hodnota pH a tedy i izoelektrický bod bakteriální suspenze byl stanovován prostřednictvím automatického titrátoru. Nejprve byla ve vzorku proměřena distribuce velikosti částic a následně ζ -potenciál vždy ve třech sériích měření.

Stanovení izoelektrického bodu mucinu bylo proměřeno výše uvedeným postupem, avšak vzorek mucinu byl připraven viz kapitola 3.4.5 v prostředí Tris-HCl pufru (50 mM, pH 8,5).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace metody adheze probiotických bakterií na mucin

Základním předpokladem adhezních experimentů bylo, že vybrané bakteriální kmeny adherují na hlavní složku hlenu v gastrointestinálním traktu – mucin. Po inkubaci mucinu s bakteriálními buňkami byl mucin adherovaný na bakteriální buňky společně s buňkami odseparován šetrnou centrifugací a v supernatantu pak byla spektrofotometricky stanovena koncentrace tzv. volného mucinu, tedy mucinu který se na buňky nenavázal. V každé sérii měření byl pochopitelně zařazen také kontrolní vzorek bez bakteriálních buněk. Na obr. 13 můžeme vidět základní experimentální strategii při optimalizaci testů adheze na bakteriální buňky, kdy byla optimalizována celá řada parametrů – viz dále.



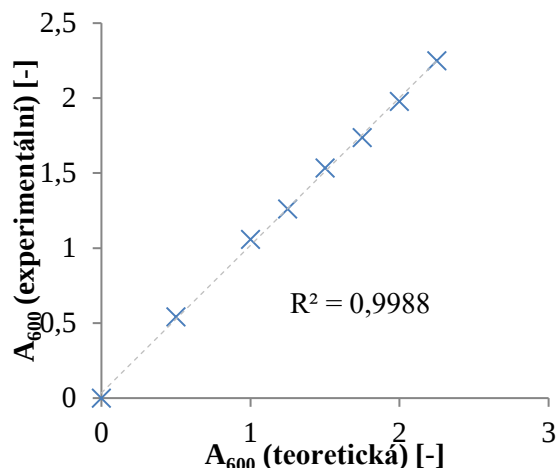
Obr. 13: Optimalizační schéma metody adheze probiotických bakterií na mucin (obrázek mucinu [94]).

4.1.1 Stanovení koncentrace a rychlosti sedimentace bakteriálních buněk ve vzorku

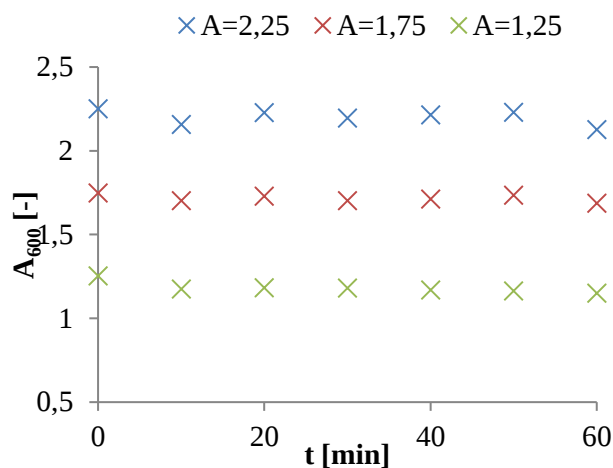
Pro spektrofotometrické měření adheze bakterií byla nejprve určena korelace mezi absorbancí při 600 nm a koncentrací bakteriálních buněk v roztoku. Vzorky modelového mikroorganismu *L. rhamnosus* byly připraveny podle popisu v kapitole 3.4.3 a měření bylo provedeno taktéž podle popisu v kapitole 3.4.3 na nanofotometru, Implen, P 300 v plastových kyvetách. Získaná data byla vynesena jako závislost experimentálních absorbancí na teoretických viz obr. 14. Na základě vysokého korelačního koeficientu je možné absorbanci buněčné suspenze považovat za úměrnou ke koncentraci buněk v roztoku.

Následně byla stanovena rychlost sedimentace bakteriálních buněk. Pokud by buňky výrazně sedimentovaly, tak by docházelo k ovlivnění hodnoty absorbance ve vzorku umístěného v kyvetě. Proto byly připraveny a proměřeny vzorky viz kapitola 3.4.3 na přístroji

nanofotometru, Implen, P 300 a získané experimentální hodnoty absorbance byly vyneseny do grafické závislosti absorbance na čase viz obr. 15. Z experimentálního stanovení je patrné, že *L. rhamnosus* výrazně nesedimentoval, a tedy není nutné měřit bakteriální suspenze ihned po odebrání vzorku, aniž by se ovlivnila hodnota absorbance.



Obr. 14: Stanovení korelace mezi experimentálními a teoretickými hodnotami absorbance pro *L. rhamnosus*.

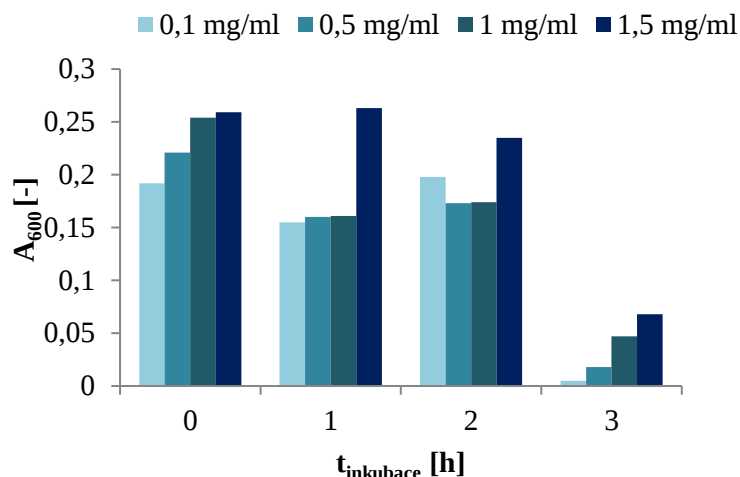


Obr. 15: Sedimentační křivky *L. rhamnosus*.

Data byla získána pouze pro modelovou bakterii *L. rhamnosus*. Nicméně závěry z těchto experimentů byly aplikovány i pro ostatní použité bakterie, protože v této diplomové práci jsou pro experimenty vybrány pouze gram-pozitivní bakterie mléčného kvašení, které sdílí podobnost v morfologii včetně velikosti.

4.1.2 Spektrofotometrické stanovení rozpustnosti mucinu

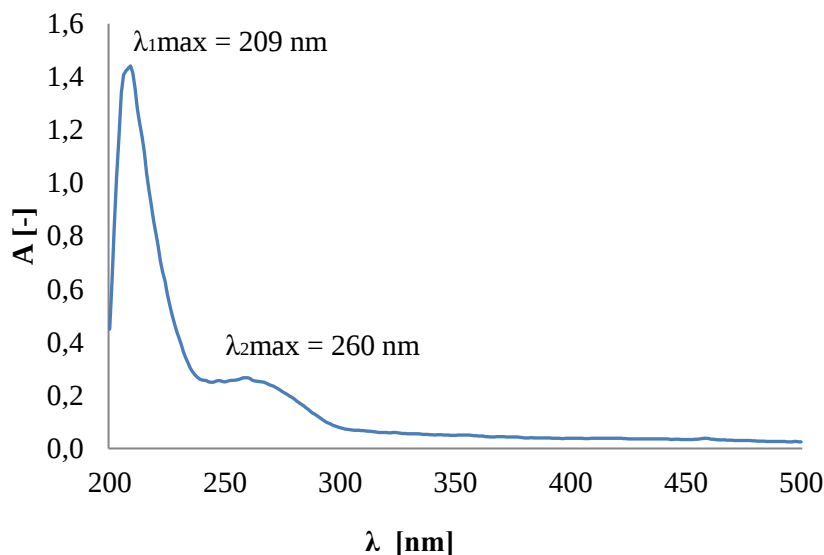
Vzorky pro stanovení rozpustnosti mucinu byly připraveny a proměřeny viz kapitola 3.4.4 pomocí nanofotometru, Implen, P 300. Stanovována byla absorbance při 600 nm, která poskytuje informaci o přítomnosti nerozpuštěných agregátů mucinu. Na základě získaných experimentálních dat uvedených na obr. 16. bylo stanoveno, že pouhé protřepání pro rozpustnost mucinu není dostačující. Jelikož se zvyšujícím se časem inkubace roztoku mucinu se snižovala hodnota absorbance, docházelo tedy i nadále k rozpouštění mucinu. Inkubace vzorků mucinu probíhala při teplotě 37 °C, proto i tato teplota byla použita pro další přípravu vzorků. Aby bylo rozpouštění ještě více podpořeno, tak byly vzorky umístěny do rotátoru (aparatura viz kapitola 3.4.5).



Obr. 16: Spektrofotometrické stanovení rozpustnosti roztoku mucinu v PBS pufru (pH 7,5).

4.1.3 Spektrofotometrické stanovení absorpčního spektra mucinu

Metoda stanovující adhezi probiotických bakterií je založena na spektrofotometrickém měření úbytku mucinu po inkubaci s probiotickými mikroorganismy, a proto bylo nutné stanovit absorpční maximum mucinu. V rámci zmíněného experimentu byly proměřeny vzorky mucinu o 4 koncentracích podle postupu v kapitole 3.4.6 pomocí nanofotometru, Implen, P 300. Příklad získaného absorpčního spektra mucinu o koncentraci 1,5 mg/ml je uveden na obr. 17.



Obr. 17: Absorpční spektrum mucinu (1,5 mg/ml) v PBS pufru (pH 7,5).

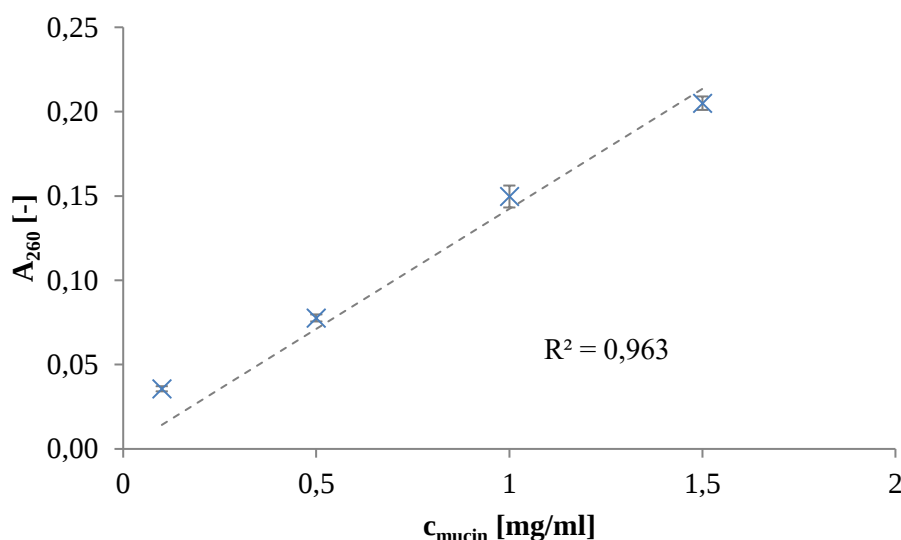
Mucin z prasečího žaludku Typu II, používaný v předložené práci, je glykoprotein složený z 20 % proteinu a zbývající procento tvoří převážně polysacharidy složené z N-acetylglaktosaminu, N-acetylglukosaminu a kyselina sialové. Je obecně známo, že u proteinů v UV oblasti významně absorbují aromatické aminokyseliny a vykazují dvě absorpční maxima, které jsou patrné i na obr. 17. První absorpční maximum proteinů je v rozmezí 200–

230 nm, druhé pak při cca 280 nm. Jelikož se v případě mucinu nejedná o čistý protein, ale o glykoprotein, tak mohou být maxima mírně posunuta vlivem ostatních skupin. Na základě absorpčního spektra byla pro měření absorbance mucinu stanovena vlnová délka 260 nm. Vybrané absorpční maximum bylo navíc potvrzeno studií *Sunoqrot a kol.*, kteří se zabývali mucinovými obaly pokrývající nanočástice a stejně jako v této metodě měřili absorpci nenávaného mucinu (z prasečího žaludku Typu III) po adsorpci na nanočástice při 263 nm [95].

Jak již bylo výše uvedeno, absorpční spektra byla proměřena pro 4 vybrané koncentrace mucinu. V tab. 6 jsou pro demonstraci zvyšující se absorbance s koncentrací mucinu uvedeny absorbance při vybrané vlnové délce 260 nm. Na základě obr. 18 byla stanovena lineární závislost mezi hodnotami absorbance a koncentracemi mucinu. Závislost byla sestrojena z dat naměřených při 1 h inkubaci, ale stejný trend se uplatnil i ve zbývajících časech. Na základě korelačního koeficientu lze říci, že hodnota absorbance při 260 nm reflektuje množství mucinu ve vzorku, proto byla následně pro další stanovení využívána. Uvedené hodnoty jsou pouze demonstrační, protože hodnota absorbance mucinu byla vždy měřena v čase jako kontrola, ke které byly procentuální výsledky adheze bakterií k mucinu vztahovány.

Tab. 6: Hodnoty absorbancí mucinu při různých koncentracích.

C _{mucin} [mg/ml]	A ₂₆₀ [-]		
	Inkubace po dobu 1 h	Inkubace po dobu 2 h	Inkubace po dobu 3 h
0,1	0,036 ± 0,002	0,031 ± 0,007	0,041 ± 0,008
0,5	0,078 ± 0,002	0,094 ± 0,010	0,094 ± 0,006
1	0,150 ± 0,007	0,176 ± 0,001	0,181 ± 0,006
1,5	0,205 ± 0,004	0,200 ± 0,003	0,217 ± 0,006



Obr. 18: Kalibrační závislost absorbance mucinu a jeho koncentrace po 1 h inkubaci.

4.1.4 Pilotní experiment adheze vybraných probiotických bakterií na mucin

Podmínky pro pilotní experiment byly inspirovány studií Shi a kol. [90]. Vzorky byly připraveny viz kapitola 3.4.4 a z primárních optimalizačních kroků (tab. 3) byl vybrán jako modelový organismus *L. rhamnosus* a *L. plantarum*, vzorky bakterií a mucinu byly připraveny v poměru 1:1, roztok mucinu byl připravený v PBS pufru a inkubace na temperované třepačce probíhala po dobu 3 h. Adheze probiotických mikroorganismů k mucinu byla počítána oproti kontrolnímu roztoku mucinu podle rovnice:

$$\text{Adheze}[\%] = 100 \cdot \left(1 - \frac{A_{260, \text{neadsorbovaný mucin}}}{A_{260, \text{mucin}}} \right), \quad (6)$$

kde $A_{260, \text{neadsorbovaný mucin}}$ představuje hodnotu absorbance mucinu po inkubaci s příslušnou probiotickou bakterií, $A_{260, \text{mucin}}$ představuje kontrolní hodnotu mucinu měřenou v čase s experimentem.

Při 3h kultivaci nedocházelo k žádné adhezi probiotických mikroorganismů na mucin v PBS pufru (viz tab. 7). Absorpce mucinu při 260 nm se zvyšovala spolu se zvyšující se koncentrací. Pro inkubaci bakteriálních buněk s mucinem byla zvolena teplota 37 °C, při které jsou i probiotické bakterie kultivovány, a při inkubaci po dobu 3 h mohlo docházet k dalšímu dělení bakterií. Tyto bakterie mohly syntetizovat extracelulární proteiny, které se následně dostaly do supernatantu po centrifugaci, kde zvýšily absorbanci. Nebo mohlo v procesu centrifugace dojít k narušení dělení buněk a některé buňky mohly popraskat tak, že jejich buněčný obsah se dostal do supernatantu po centrifugaci čímž se zvýšila absorbance oproti kontrolnímu mucinu.

Tab. 7: Adheze *L. rhamnosus* a *L. plantarum* po inkubaci s mucinem po dobu 3 h.

C MUC [mg/ml]	$A_{260, \text{MUC}}$ [-]	$A_{260, \text{MUC po inkubaci s LR}}$ [-]	Adheze [%]	$A_{260, \text{MUC po inkubaci s LP}}$ [-]	Adheze [%]
0,1	0,036 ± 0,008	0,450 ± 0,009	-	0,156 ± 0,003	-
0,5	0,088 ± 0,006	0,305 ± 0,007	-	0,144 ± 0,003	-
1	0,169 ± 0,006	0,260 ± 0,004	-	0,215 ± 0,004	-
1,5	0,207 ± 0,006	0,328 ± 0,004	-	0,310 ± 0,002	-

MUC – mucin, LR – *L. rhamnosus*, LP – *L. plantarum*, [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu

Z těchto výsledků bylo určeno, že čas inkubace byl moc dlouhý. Je možné předpokládat, že adheze bakterií na mucin by měla proběhnout v kratším časovém intervalu v rámci minut. Byly tedy zvoleny nové časy inkubace a to 10 min, 20 min, 40 min a 60 min. Z experimentálních dat byla také vybrána koncentrace mucinu na 1,5 mg/ml, protože hodnota absorbance vykazovala nejmenší rozdíl s hodnotami absorbance neadsorbovaného mucinu.

4.1.5 Optimalizace metody

Pro optimalizaci metody byly připraveny a proměřeny vzorky podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.7.1. Optimalizace byla uskutečněna pomocí dvou modelových organismů *L. rhamnosus* a *L. plantarum*, při různých časech inkubace, v různém prostředí mucinu

a vzorky obsahující bakterie, mucin byly připraveny v různých poměrech (viz tab. 3). Měření probíhalo prostřednictvím nanofotometru, Implen, P 300. Zvýšení množství mucinu ve vzorku oproti bakteriím bylo stanoveno na základě předpokladu, že i za fyziologických podmínek budou bakterie při adhezi obkloповány zvýšeným obsahem mucinu v GIT. Procentuální adheze bakterií byla stanovována oproti kontrolnímu roztoku mucinu podle rovnice (6).

V destilované vodě (tab. 8) nebyla potvrzena predikce zvýšeného množství mucinu oproti bakteriím a u vybraných modelových bakterií nedocházelo k žádné významné adhezi. Malá adheze byla patrná pouze při vyšších časech inkubace bakterií s mucinem. U většiny zkoumaných pufracích systémů k adhezi docházelo, proto je možné, že bakterie k adhezi na mucin potřebují přítomnost iontů, aby se podpořily různé specifické i nespecifické interakce. Stejně výsledky jako v dH₂O byly získány i v prostředí citrátového pufru (tab. 9) kde navíc velmi malou adhezi prokazoval pouze *L. rhamnosus* a to při vyšších teplotách inkubace. V prostředí PBS pufru (tab. 10) docházelo k mírné adhezi pouze u *L. rhamnosus* s mucinem v poměru 1:4. Tyto výsledky částečně potvrzují výsledky z pilotního experimentu v PBS pufru, kde byly vzorky bakterií s mucinem připravovány pouze v poměru 1:1 a k žádné adhezi nedocházelo. Zvýšení poměru bakterií ku mucinu na 1:4 ovlivnilo i adhezi ve fosfátovém pufru (tab. 11) a fyziologickém roztoku (tab. 12). Ve zmíněných roztocích docházelo kromě adheze *L. rhamnosus* i k adhezi *L. plantarum* k mucinu. Hlavně fyziologický roztok podporoval adhezi *L. plantarum* k mucinu, avšak u *L. rhamnosus* již k nijak významným adhezím za těchto podmínek nedocházelo. Z výsledků adheze v prostředí glycinového pufru (tab. 13) si lze povšimnout, jak množství mucinu přítomného ve vzorku ovlivňuje adhezi. Adheze *L. rhamnosus* i *L. plantarum* se v různých časech kultivace zvýšila při poměru bakterie ku mucinu na 1:4 oproti vzorkům, které byly připraveny v poměru 1:2. Stejný trend u *L. rhamnosus* lze vidět i v prostředí octanového pufru (tab. 14). V prostředí Tris-HCl (tab. 15) docházelo k nejvýznamnější adhezi *L. rhamnosus*, která se pohybovala kolem 40 % v poměru 1:4 při všech zkušebních časech kultivace, avšak u druhé modelové bakterie *L. plantarum* docházelo pouze k malé adhezi na mucin.

Tab. 8: Primární optimalizace pro adhezi bakterií k mucinu v prostředí dH₂O.

Adheze [%] bakterií s mucinem v prostředí dH ₂ O (pH 7)						
t [min]	LR:MUC 1:1	LR:MUC 1:2	LR:MUC 1:4	LP:MUC 1:1	LP:MUC 1:2	LP:MUC 1:4
10	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	4,22 ± 0,01	-	-
60	3,11 ± 0,02	-	-	1,33 ± 0,01	-	-
MUC – mucin, LR – <i>L. rhamnosus</i> , LP – <i>L. plantarum</i> , [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu						

Tab. 9: Primární optimalizace pro adhezi bakterií k mucinu v prostředí citrátového pufru.

Adheze [%] bakterií s mucinem v citrátovém pufru (100 mM, pH 5)						
t [min]	LR:MUC 1:1	LR:MUC 1:2	LR:MUC 1:4	LP:MUC 1:1	LP:MUC 1:2	LP:MUC 1:4
10	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
40	-	2,16 ± 0,03	-	-	-	-
60	-	-	2,84 ± 0,02	-	-	-
MUC – mucin, LR – <i>L. rhamnosus</i> , LP – <i>L. plantarum</i> , [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu						

Tab. 10: Primární optimalizace pro adhezi bakterií k mucinu v prostředí PBS pufru.

Adheze [%] bakterií s mucinem v PBS pufru (pH 7,5)						
t [min]	LR:MUC 1:1	LR:MUC 1:2	LR:MUC 1:4	LP:MUC 1:1	LP:MUC 1:2	LP:MUC 1:4
10	-	-	-	-	-	-
20	-	-	3,60 ± 0,01	-	-	-
40	-	-	3,52 ± 0,01	-	-	-
60	-	-	2,35 ± 0,01	-	-	-
MUC – mucin, LR – <i>L. rhamnosus</i> , LP – <i>L. plantarum</i> , [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu						

Tab. 11: Primární optimalizace pro adhezi bakterií k mucinu v prostředí fosfátového pufru.

Adheze [%] bakterií s mucinem ve fosfátovém pufru (100 mM, pH 7,4)						
t [min]	LR:MUC 1:1	LR:MUC 1:2	LR:MUC 1:4	LP:MUC 1:1	LP:MUC 1:2	LP:MUC 1:4
10	-	-	9,22 ± 0,01	-	-	10,97 ± 0,01
20	-	-	1,15 ± 0,01	-	-	-
40	-	-	13,18 ± 0,01	-	-	-
60	-	-	6,31 ± 0,01	-	-	-
MUC – mucin, LR – <i>L. rhamnosus</i> , LP – <i>L. plantarum</i> , [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu						

Tab. 12: Primární optimalizace pro adhezi bakterií k mucinu v prostředí fyz. roztoku.

Adheze [%] bakterií s mucinem ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl)						
t [min]	LR:MUC 1:1	LR:MUC 1:2	LR:MUC 1:4	LP:MUC 1:1	LP:MUC 1:2	LP:MUC 1:4
10	-	-	-	-	-	15,54 ± 0,01
20	6,39 ± 0,01	4,34 ± 0,01	-	-	-	13,84 ± 0,01
40	-	-	-	-	-	12,57 ± 0,01
60	-	11,24 ± 0,01	1,12 ± 0,01	-	-	11,96 ± 0,01
MUC – mucin, LR – <i>L. rhamnosus</i> , LP – <i>L. plantarum</i> , [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu						

Tab. 13: Primární optimalizace pro adhezi bakterií k mucinu v prostředí glycinového pufru.

Adheze [%] bakterií s mucinem v glycinovém pufru (100 mM, pH 8,6)						
t [min]	LR:MUC 1:1	LR:MUC 1:2	LR:MUC 1:4	LP:MUC 1:1	LP:MUC 1:2	LP:MUC 1:4
10	-	6,25 ± 0,01	19,33 ± 0,01	-	3,86 ± 0,01	6,90 ± 0,01
20	-	-	11,94 ± 0,01	-	2,26 ± 0,01	11,32 ± 0,01
40	-	1,64 ± 0,01	6,56 ± 0,01	-	-	-
60	-	8,51 ± 0,01	5,62 ± 0,01	-	-	-

MUC – mucin, LR – *L. rhamnosus*, LP – *L. plantarum*, [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu

Tab. 14: Primární optimalizace pro adhezi bakterií k mucinu v prostředí octanového pufru.

Adheze [%] bakterií s mucinem v octanovém pufru (100 mM, pH 4)						
t [min]	LR:MUC 1:1	LR:MUC 1:2	LR:MUC 1:4	LP:MUC 1:1	LP:MUC 1:2	LP:MUC 1:4
10	-	7,91 ± 0,01	13,56 ± 0,01	-	-	4,52 ± 0,01
20	-	9,95 ± 0,01	18,04 ± 0,01	8,26 ± 0,02	-	-
40	-	5,72 ± 0,01	9,09 ± 0,02	-	-	-
60	-	3,10 ± 0,01	6,57 ± 0,04	-	-	-

MUC – mucin, LR – *L. rhamnosus*, LP – *L. plantarum*, [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu

Tab. 15: Primární optimalizace pro adhezi bakterií k mucinu v prostředí Tris-HCl pufru.

Adheze [%] bakterií s mucinem v Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4)						
t [min]	LR:MUC 1:1	LR:MUC 1:2	LR:MUC 1:4	LP:MUC 1:1	LP:MUC 1:2	LP:MUC 1:4
10	-	-	41,67 ± 0,02	-	-	-
20	-	-	42,03 ± 0,01	-	-	2,37 ± 0,02
40	-	-	50,36 ± 0,01	-	-	-
60	-	-	46,74 ± 0,01	-	-	1,11 ± 0,01

MUC – mucin, LR – *L. rhamnosus*, LP – *L. plantarum*, [-] – bakterie nevykazovaly adhezi k mucinu

Primární optimalizační podmínky posloužily ke stanovení podmínek pro tuto metodu. Z uvedených výsledků byl stanoven Tris-HCl pufr jako prostředí pro další adhezni experimenty, a to z důvodu nejvyšší procentuální adheze *L. rhamnosus* k mucinu. *L. rhamnosus* byl tedy vybrán i jako modelová bakterie pro další experimenty. Přestože *L. plantarum* vykazoval vyšší adsorpci například ve fyziologickém roztoku, hodnoty nedosahovaly tak vysokých procentuálních adhezí jako v případě *L. rhamnosus* v prostředí Tris-HCl. Pro další měření byl vybrán poměr 1:4 při přípravě bakteriálních vzorků s mucinem. Z výše uvedených výsledků je patrné, že tento zvýšený poměr měl souvislost se zvýšenou adhezí bakterií k mucinu, což potvrdilo počáteční predikci. Čas inkubace bakterií s mucinem byl na základě výsledků stanoven pro další experimenty na dobu 20 min. Ve většině případů, a ani ve vybraném prostředí Tris-HCl pufru, nehrál čas inkubace nijak

významnou roli, ale aby bylo jisté, že k adhezi bude skutečně docházet, byl zvolen delší interval než 10 min. Zároveň bylo z časových důvodů 20 min upřednostněno před 40 a 60 minutami.

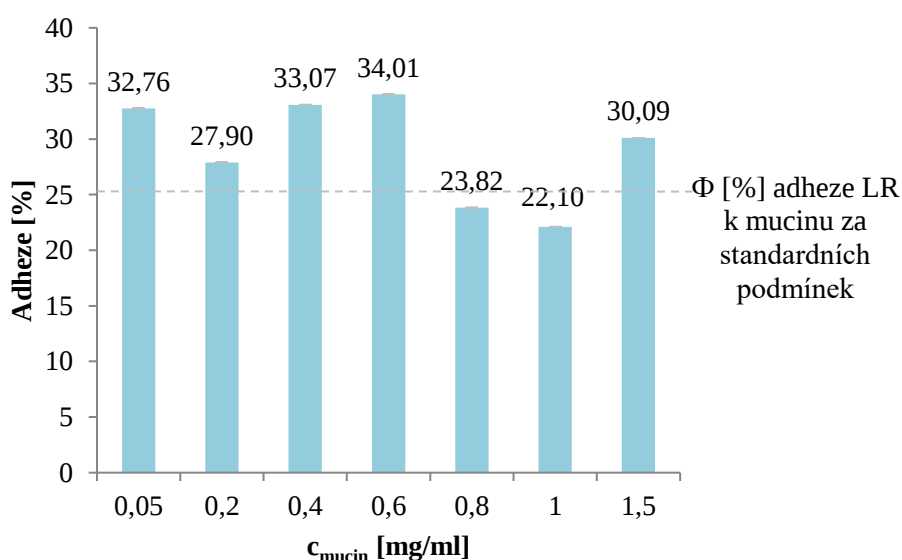
Na základě rozdílných adhezních vlastností obou testovaných bakterií je možné konstatovat, že adheze bude záviset nejen na pH a iontové síle prostředí, ale také na typu pufracího systému, což by mohlo být předmětem dalších experimentů. Navíc je ze získaných experimentálních dat patrné, že povaha a intenzita interakcí bakteriálních buněk s mucinem je silně druhově specifická, protože nebylo pravidlem, že tam, kde docházelo k adhezi *L. rhamnosus*, docházelo také k adhezi i druhé modelové bakterie *L. plantarum*.

4.2 Stanovení možných vlivů působících na adsorbční vlastnosti *L. rhamnosus*

Podmínky metody získané v rámci optimalizace byly použity pro další stanovení. Následující experimenty byly vybrány za účelem objasnění různých vlivů, které by mohly podporovat nebo naopak snižovat adhezi. Dále bylo předmětem vybraných experimentů blíže charakterizovat možné interakce přispívající k mikrobiální adhezi na mucin. Vzorky, včetně kontrolního vzorku mucinu, byly vždy připraveny a proměřeny (nanofotometru, Implen, P 300) na základě postupu uvedeného v kapitole 3.5, avšak za definovaných podmínek uvedených v kapitole 3.4.8.

4.2.1 Vliv mucinu při kultivaci na adhezi *L. rhamnosus* k mucinu

Podle výše optimalizované metody byl sestaven experiment zabývající se otázkou, jestli jsou probiotické bakterie schopny se v průběhu kultivace adaptovat na přítomnost mucinu, a tím následně zvýšit své adhezní schopnosti. Vzorky byly připraveny a proměřeny na základě postupu uvedeného v kapitole 3.5.1 a procentuální adheze *L. rhamnosus* (LR) byla vypočítána podle rovnice (6) oproti kontrolnímu roztoku mucinu viz obr. 19.

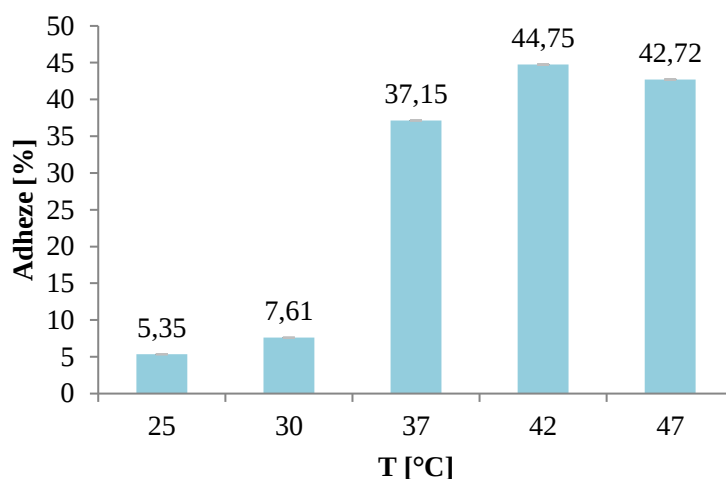


Obr. 19: Vliv mucinu ve fázi kultivace na adhezi *L. rhamnosus* (LR) k mucinu v prostředí Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4).

Na obr. 19 jsou vyneseny hodnoty adheze v přítomnosti různých koncentrací mucinu v kultivaci a pro lepší znázornění byla do grafu vnesena i průměrná adheze *L. rhamnosus*. Průměrná hodnota adheze *L. rhamnosus* byla vypočítána ze všech experimentů měřených prostřednictvím optimalizované metody během diplomové práce. Z výsledků lze usuzovat, že není patrná žádná korelace mezi adhezí a koncentrací mucinu během kultivace. Nicméně obecně se ze získaných výsledků, kde se adheze v přítomnosti mucinu v kultivaci zvýšila oproti průměrné adhezí *L. rhamnosus* zdá, že *L. rhamnosus* se adaptuje na mucin během kultivace, což zmiňovanou adhezí podporuje.

4.2.2 Vliv teploty inkubace *L. rhamnosus* s mucinem na adsorbční vlastnosti

Teplotní profil pro inkubaci *L. rhamnosus* s mucinem byl nadefinován následujícím způsobem. Pro experiment byla jednak zvolena pokojová teplota 25 °C, následně bylo zvoleno 30 °C, což je hraniční nejnižší teplota lidského těla, při které dochází již ke kolapsu organismu. Další studovanou teplotou bylo 37 °C (teplota lidského těla), 42 °C což je horní kritická hranice funkce organismu a 47 °C jakožto demonstrace přesahu komfortních teplot organismu. Procentuální adheze *L. rhamnosus* byla vypočítána podle rovnice (6) oproti kontrolnímu roztoku mucinu (obr. 20). Ze získaných výsledků je patrné, že při nízkých teplotách k žádné významné adhezí nedocházelo, avšak při vyšších teplotách adheze *L. rhamnosus* k mucinu byla procentuálně významná. Je zajímavé, že *L. rhamnosus* při 30 °C žádnou adhezí nevykazoval, avšak při opačné kritické hranici vykazoval adhezí nejvyšší. Pravděpodobně tento výsledek bude důsledkem toho, že na kultivaci probiotických bakterií se standardně používá 37 °C, a tedy bakterie pravděpodobně upřednostňují teplé prostředí. Nicméně ve 47 °C již docházelo k mírnému poklesu adhezí a je pravděpodobné, že při dalším zvyšování teploty by docházelo k inhibici adhezí bakterií. Vlivem vysoké teploty již mohlo dojít k parciální denaturaci proteinů podílejících se na adhezí, které jsou přítomny jak na bakteriích, tak ve struktuře mucinu.

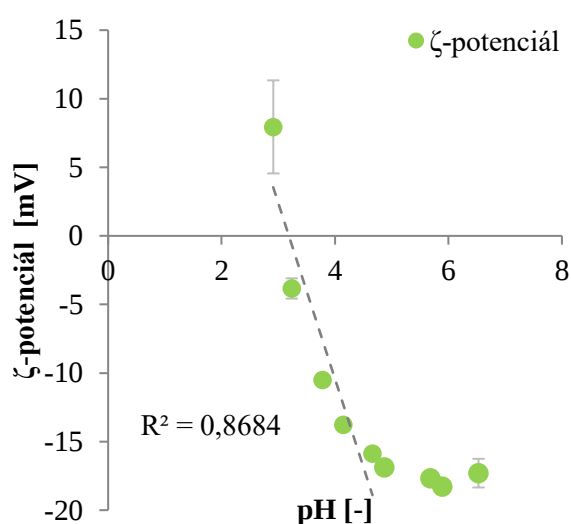


Obr. 20: Vliv teploty inkubace na adhezí *L. rhamnosus* na mucin v přítomnosti Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4).

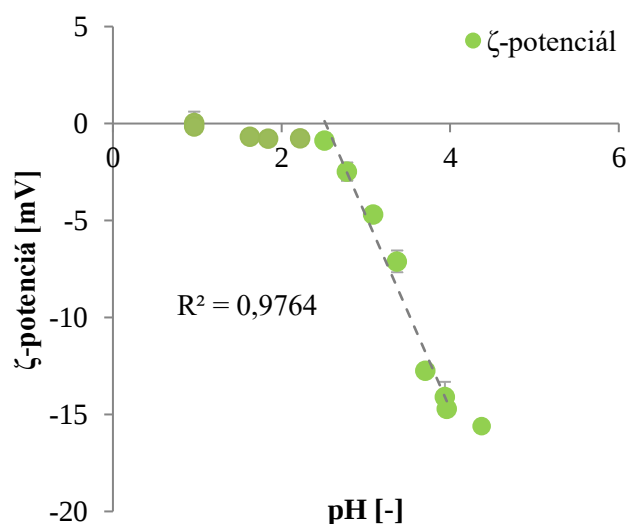
4.2.3 Vliv pH a iontové síly prostředí na adsorbční vlastnosti *L. rhamnosus*

Mezi interakce vyskytující se při adhezi probiotických bakterií k mucinu jsou zahrnuty specifické interakce skrz specializované orgány nebo povrchové struktury a nekovalentní interakce představující elektrostatické interakce, hydrofobní efekt atd.

Elektrostatické interakce je možné charakterizovat pomocí ζ -potenciálu měřeného na Zetasizeru Nano ZS (Malvern Instruments) prostřednictvím metody elektroforetického rozptylu světla. Pomocí této metody byl stanoven i izoelektrický bod (IEP) *L. rhamnosus*. Jedná se o hodnotu pH, při které obaly bakteriálních buněk disponují nulovým efektivním nábojem, tedy počet kladně a záporně nabitých skupin si je rovný. Měření bylo realizováno viz postup uvedený v kapitole 3.8. Pomocí kontinuální titrace (1 M HCl) byl proměřen ζ -potenciál od hodnoty pH cca 6,5 po 2 s krokem titrace 0,5 (obr. 21) Následně byl za účelem bližšího definování IEP zvolen interval pH od 4,5 do 1 s krokem titrace 0,3 (obr. 22).



Obr. 21: Stanovení izoelektrického bodu *L. rhamnosus* s krokem titrace 0,5.

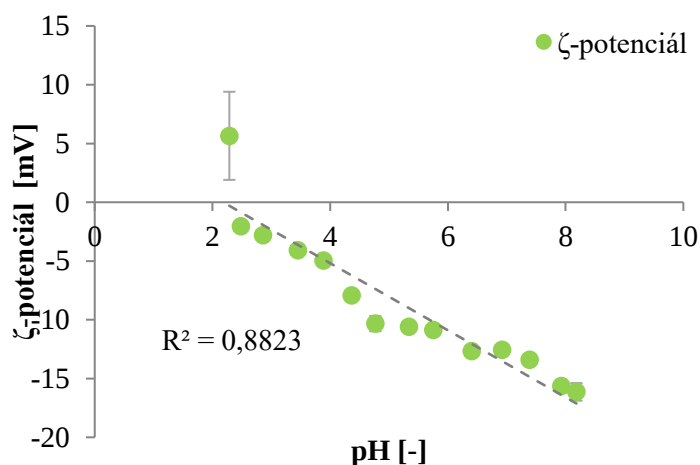


Obr. 22: Stanovení izoelektrického bodu *L. rhamnosus* s krokem titrace 0,3.

Z kontinuální titrace s krokem 0,5 je patrné, že IEP se bude pohybovat kolem hodnoty pH 3, což koreluje s titrací s krokem 0,3, kde IEP bude pravděpodobně v pH 2,5. Při titraci s menším krokem stanovení pH je patrné, že bakterie byla více ovlivňována nárůstem kyselosti prostředí, než tomu bylo při titraci s krokem 0,5. Jedno z možných vysvětlení může být to, že vlivem pomalejších přídavek 1M HCl v prostředí již silně kyselého pH docházelo k ovlivnění buněčné membrány. ζ -potenciál na membráně mohl být nestálý vlivem např. porušením nativních proteinových struktur na buněčné membráně natolik, že nebylo možné přesně zaznamenat IEP. Nebo mohla být bakterie schopná měnit pH ve svém intracelulárním prostoru, což ovlivňovalo povrchovou strukturu regulačních proteinů a následné měření ζ -potenciálu na povrchu.

Zmíněnou metodou a postupem byl taktéž změřen izoelektrický bod mucinu (Mucin z prasečího žaludku Typ II). IEP mucinu byl pomocí softwaru Zetasizeru Nano ZS stanoven na hodnotu 2,47, což koreluje s informacemi [62], že IEP mucinu se vyskytuje v rozmezí pH 2–3 v závislosti na typu mucinu (viz obr. 23). Izoelektrický bod mucinu a *L. rhamnosus*

naznačuje, že ve fyziologickém prostředí (pH 7,4) budou pravděpodobně převládat elektrostatické odpuzivé interakce vlivem velké záporné hodnoty ζ -potenciálu, ale bude i záležet na distribuci náboje v částicích atd.

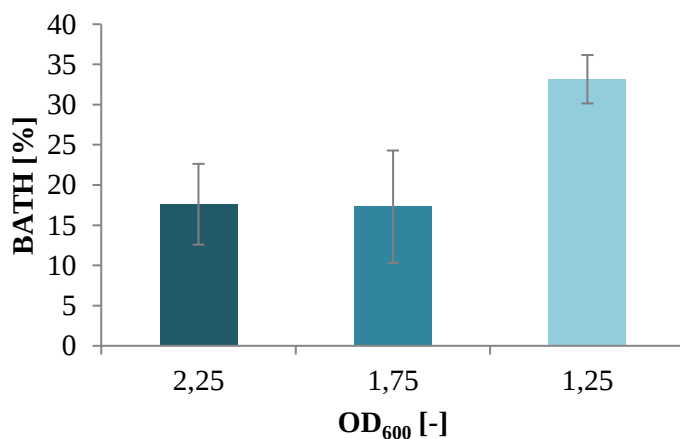


Obr. 23: Stanovení izoelektrického bodu mucinu v Tris-HCl pufru (50 mM).

Následně byla stanovena schopnost hydrofobní sorpce *L. rhamnosus* pomocí BATH (bakteriální adheze k uhlovodíkům) experimentu [14], které charakterizují množství bakterií schopných adsorpce na fázové rozhraní. Experimentálně získaná data z BATH experimentů v závislosti na počátečních optických hustotách měřeného vzorku byla přepočítaná na bakteriální adhezi (BATH [%]) dle rovnice (7).

$$\text{BATH}[\%] = 100 \cdot \left(1 - \frac{\text{OD}_{600,t}}{\text{OD}_{600,0}} \right), \quad (7)$$

Pro stanovení odchylky BATH měření mezi jednotlivými optickými hustotami *L. rhamnosus* byly použity tři počáteční optické hustoty: cca 2,25; 1,75 a 1,25 (viz obr. 24). Vzorky byly připraveny a proměřeny s hydrofobní fází hexadekanem viz kapitola 3.7.

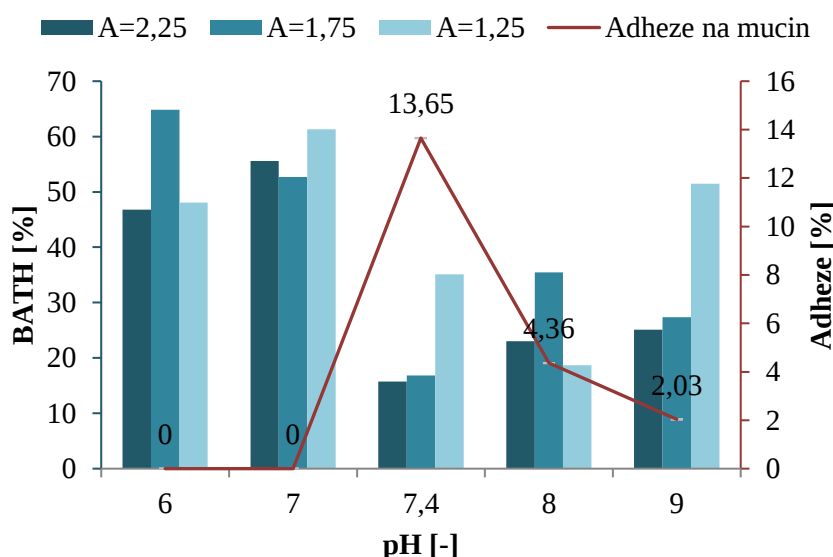


Obr. 24: Stanovení přesnosti BATH měření v Tris-HCl pufru.

Z výsledků je patrné, že adsorpce k hydrofobní fázi byla ovlivněna počáteční optickou hustotou *L. rhamnosus* v Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4). Pravděpodobně bylo měření ovlivněno chybou přístroje, díky poměrně velkým odchylkám mezi získanými měřeními (vždy 3 série vzorků). Nejmenší odchylka mezi jednotlivými měřeními byla při počáteční hustotě 1,25, což souvisí s citlivostí nanofotometru, Implen, P 300. Nicméně nanofotometr měří spolehlivě i nad hodnotu absorbance 1, tudíž je možné, že měření bylo ovlivněné i samotnými bakteriemi, jelikož se jedná o živé systémy, které jsou ovlivnitelné mnoha podmínkami. Proto bude na další data zvolených 3 koncentrací nahlíženo jako na trend, který vykazovala buněčná suspenze, než na konkrétní získané hodnoty.

4.2.3.1 Vliv pH na mikrobiální adhezi k mucinu

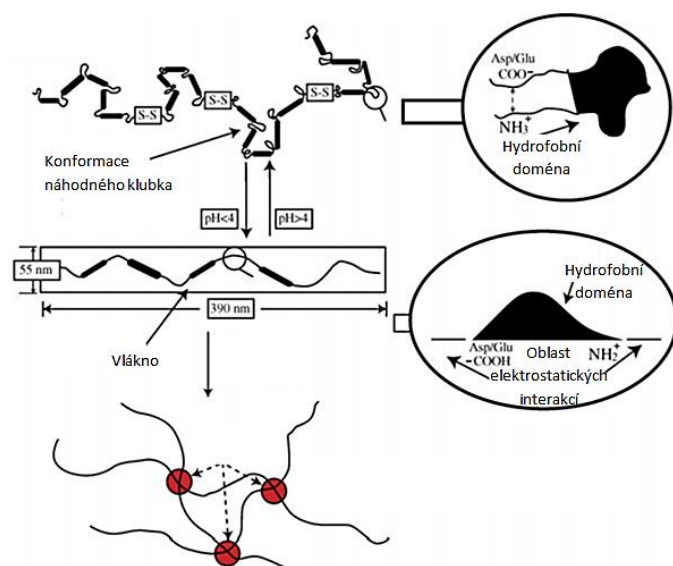
Nejprve byly připraveny a proměřeny vzorky spektrofotometrickou metodou na stanovení adheze k mucinu (viz kapitola 3.5.3) a výsledná adheze byla spočítána pomocí rovnice (6). Následně byla stanovena schopnost hydrofobního efektu *L. rhamnosus* pomocí BATH experimentů – rovnice (7). Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.7 pro pH profil uvedený v tab. 5. Výsledky z BATH experimentů a adheze na mucin jsou graficky vyneseny na obr. 25.



Obr. 25: Vliv pH na adhezi k mucinu a na hydrofobní efekt *L. rhamnosus*.

Adheze *L. rhamnosus* na mucin byla přítomna pouze v pH 7,4 a výše a v této oblasti je patrný trend nejmenšího hydrofobního efektu bakterie na hexadekan. Izoelektrický bod (IEP) *L. rhamnosus* je stanoven na hodnotu pH 2,5–3 a tedy docházelo ke zvyšování hodnoty záporného povrchového náboje se zvyšujícím se pH systému (viz obr. 21 a obr. 22). Stejný trend vykazuje i mucin jehož IEP byl stanoven na hodnotu pH 2,47 (viz obr. 23). Z pohledu nekovalentních interakcí vyplývá, že adhezi *L. rhamnosus* na mucin v prostředí Tris-HCl pufru budou pravděpodobně přispívat elektrostatické síly více než hydrofobní efekt. Hydrofobní efekt souvisí se stabilitou systému, čím vyšší bude ζ -potenciál blíže k hranici ± 25 – 30 mV, tím soustava bude více stabilní a nebude docházet ke koagulaci mezi systémy, tedy k hydrofobnímu efektu, což je patrné i z experimentálních výsledků. Navíc hydrofobní

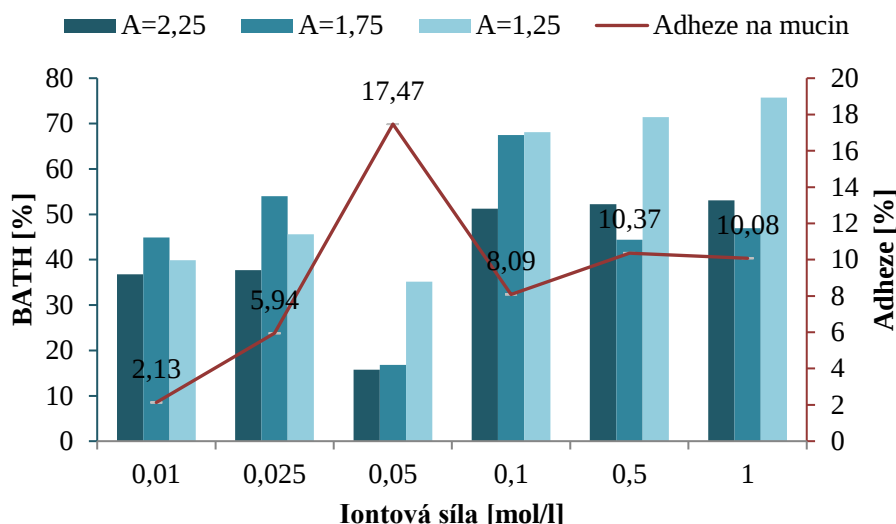
efekt *L. rhamnosus* působící na molekulu mucinu je závislý na jeho konformaci (viz obr. 26). Mucin, jakožto viskoelastická gelová složka hlenu, je spíše hydrofilní s hydrofobními doménami. Při nižším pH dochází k rozpletení náhodného klubka na vlákna, při kterém má přístupnější hydrofobní domény, takže bude pravděpodobně docházet k vyššímu hydrofobnímu efektu než při vyšším pH. *L. rhamnosus* disponuje hydrofobními doménami (pily, fimbrie a jiné povrchové komponenty) na buněčné stěně, kterými se může k hydrofobním doménám mucinu vázat. Nicméně elektrostatické interakce (představující obecně nejsilnější interakce z nekovalentních interakcí.) jsou překonány hydrofobním efektem v závislosti na počtu hydrofobních domén bakterií. *L. rhamnosus* na základě získaných výsledků pravděpodobně nemá dostatečně silný hydrofobní efekt na překonání elektrostatických sil, a proto budou tyto síly při adhezi *L. rhamnosus* s mucinem převažovat. Nicméně adheze *L. rhamnosus* na mucin bude založena i na specifických interakcích (chemických), které mohou být ovlivněny kromě pH i iontovou silou, složením prostředí, vitalitou buněk atd. a nesmí být při charakterizaci interakcí zanedbávány a mohou tyto výsledky ovlivňovat. Nejvyšší adheze na mucin byla při pH 7,4, což koreluje s fyziologickým pH a výsledky naznačují, že budou specifické i nespecifické interakce pravděpodobně citlivé na změnu pH, protože v pH 7 *L. rhamnosus* již nevykazoval adhezi k mucinu.



Obr. 26: Konformace mucinu v závislosti na pH[62].

4.2.3.2 Vliv iontové síly na mikrobiální adhezi k mucinu

Iontová síla je dalším důležitým prametem, který bude ovlivňovat interakce při adhezi probiotických bakterií k mucinu. Vzorky byly připraveny podle stejného postupu jako při studiu vlivu pH na adhezi bakterií (viz kapitola 4.2.3.1), avšak byly proměřeny s měnící se iontovou silou Tris-HCl pufru. Výsledky získané z adheze *L. rhamnosus* na mucin a BATH experimentů jsou vyzobrazeny na obr. 27.

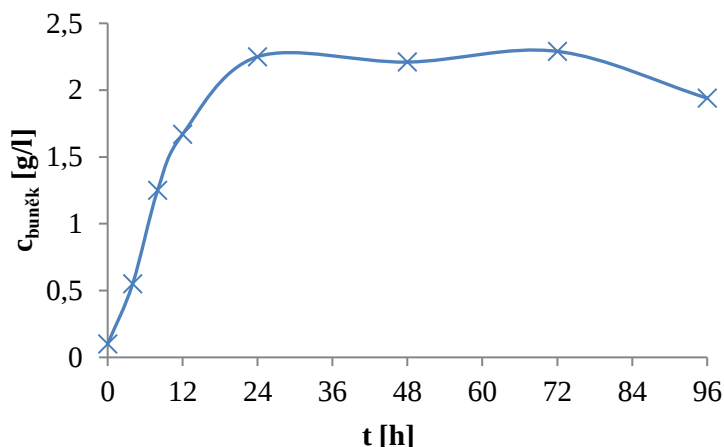


Obr. 27: Vliv iontové síly Tris-HCl pufru na adhezi *L. rhamnosus* k mucinu a hydrofobní efekt.

Z DLVO teorie (viz kapitola 2.2.1) vyplývá, že při vyšších koncentracích elektrolytu, klesá tloušťka elektrické dvojvrstvy, čímž se usnadňuje integrace mezi jednotlivými povrchy, a tak obvykle dochází ke zvýšení adheze bakterií k různým povrchům. Se zvyšující se iontovou silou docházelo ke zvýšení adheze *L. rhamnosus* k mucinu, nicméně je patrná největší adheze (17,47 %) za fyziologických podmínek. Při těchto podmínkách byly pravděpodobně přítomny specifické interakce, které jsou senzitivní na vliv prostředí a zvyšovaly tak adhezi k mucinu. Z BATH experimentů (obr. 27) je patrné, že se zvyšující se iontovou silou docházelo ke snížení elektrostatických interakcí, avšak *L. rhamnosus* se na mucin se zvyšující se iontovou silou stále vázal. Pravděpodobně je tato adheze ovlivněna právě fyziologickým pH 7,4 při kterých jsou aktivní specifické interakce a navíc při vyšší iontové síle může více působit hydrofobní efekt.

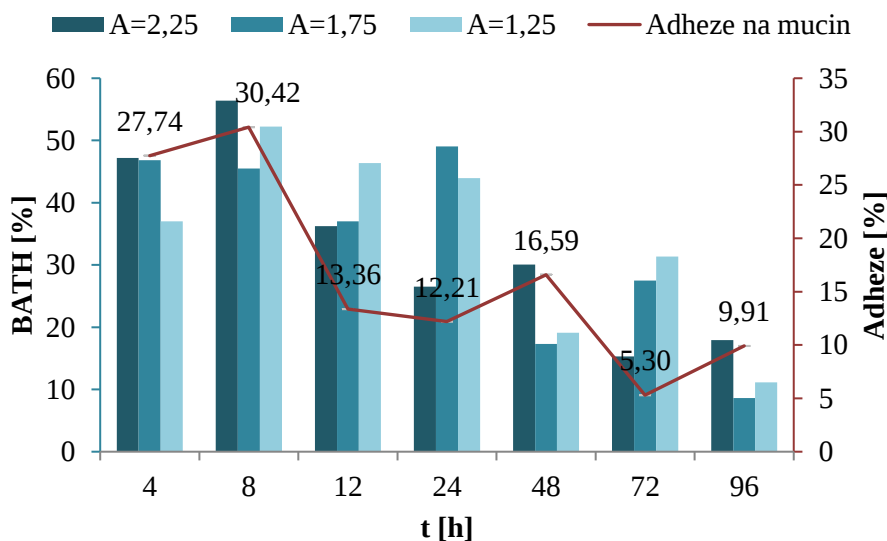
4.3 Stanovení adsorbčních vlastností *L. rhamnosus* v různých fázích růstu

Probiotické bakterie prochází během růstu populace různými fázemi. Klidovou lag fází, při které se bakterie adaptují na příslušné prostředí, následně se bakterie intenzivně množí v exponenciální fází, ve třetí stacionární fází dochází k zastavení dělení buněk a nastává produkce např. kyseliny mléčné a dalších látek do vyčerpání média. Závěrečná fáze je odumírání bakterií, kdy může docházet až k rozkladu bakteriálních buněk. Pro stanovení růstové křivky byla jako modelová bakterie použita *L. rhamnosus* a stanovení probíhalo gravimetricky podle postupu viz kapitola 3.6.1. Získaná závislost koncentrace buněk na čase je graficky znázorněna na obr. 28. Ze závislosti lze vidět, že exponenciální fáze trvala do 24 h kultivace a následně nastupovala fáze stacionární. Při 96 h kultivaci velmi pravděpodobně docházelo k odumírání buněk, avšak počet mrtvých buněk nelze gravimetrickým měřením odlišit od živé populace.



Obr. 28: Gravimetrické stanovení růstové křivky *L. rhamnosus*.

V rámci charakterizace interakcí přispívajících k adhezi probiotických bakterií k mucinu bylo nahlíženo i na jejich vitalitu vysvětlovanou pomocí jejich růstových fází. Jako modelový mikroorganismus byl opět použit *L. rhamnosus* a vzorky včetně měření adheze k mucinu v Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4) byly připraveny viz kapitola 3.6. Za účelem charakterizace hydrofobního efektu *L. rhamnosus* byly vzorky připraveny a proměřeny viz kapitola 3.7 v různých časech kultivace uvedených v tab. 5. Hodnoty z obou experimentů jsou graficky vyneseny na obr. 29.



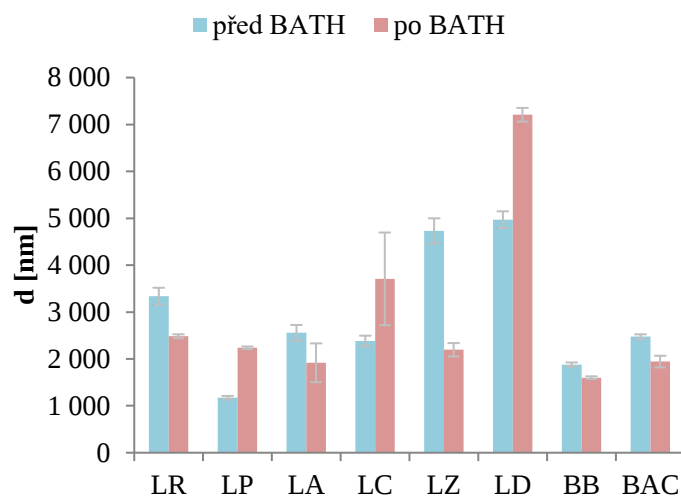
Obr. 29: Vliv fáze růstu *L. rhamnosus* na adhezi k mucinu a hydrofobní efekt.

Z experimentálních hodnot získaných jak z BATH experimentů, tak z experimentu měření adheze na mucin, je patrný trend představující snižování adheze na hexadekan i na mucin se zvyšujícím se časem kultivace. Pokles adheze od 48 h a výše přispívá teorii, že ve vzorcích se již vyskytovalo určité procento mrtvých buněk, které nebyly schopné se naadherovat na mucin nebo se naadsorbovat na rozhraní fází. Naopak při exponenciální fázi (4 a 8 hodin) docházelo ke zvýšení adheze pro oba experimenty. Během kultivace se částečně mění povrch bakterií tím, že se tvoří pily a další hydrofobní komponenty přispívající k adhezi a jejich

distribuce na povrchu buněk je v různých časech kultivace jiná. Proto sorpce na mucin i na hydrofobní fázi v BATH experimentu s časem klesá. Ve stacionární fázi již dochází k produkci kyseliny mléčné a dalších látek, a tedy se mohly přepnout některé metabolické dráhy a adheze pro bakterie nebyla přednostní. Praktickým výstupem je, že probiotické buňky v probiotických výrobcích by v ideálním stavu měly být v růstové fázi, což ale není prakticky možné zajistit. Hlavním problémem je, že růstová fáze trvá jen pár hodin. Proto probiotické přípravky obsahují mikroorganismy odebrané ze stacionární fáze, které jsou schopny produkovat antimikrobiální a jiné látky. Ze získaných výsledků je možné, že právě to je důvod, proč probiotické mikroorganismy mají sníženou dobu záchytu v GIT. Avšak odebírat bakterie pro probiotické přípravky ve stacionární fázi je nezbytné právě kvůli produkční činnosti.

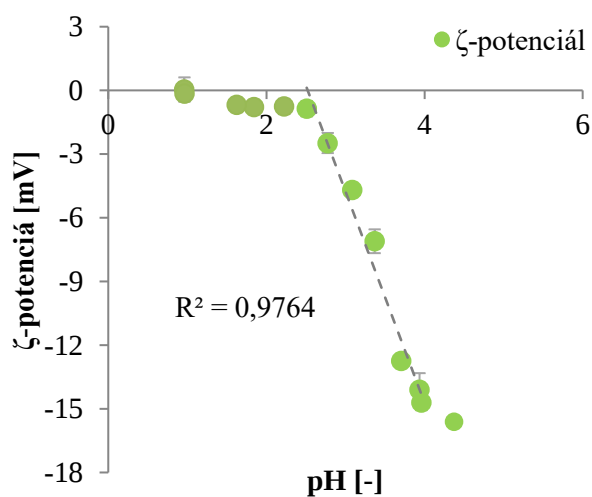
4.4 Charakterizace adsorbčních vlastností vybraných probiotických bakterií

Za účelem charakterizace povrchových vlastností buněčné suspenze byly připraveny a proměřeny probiotické bakterie (viz 3.1.1) prostřednictvím metody elektroforetického rozptylu světla (ELS) a zároveň byla stanovena průměrná distribuce velikosti částic v buněčné suspenzi pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS) na základě postupu uvedeného v kapitole 3.8. Tyto metody se standardně používají pro charakterizaci biomolekul, jako jsou proteiny nebo na charakterizaci stability částic. Průměrná distribuce velikosti částic byla měřena jak při samotných titracích, tak v průběhu BATH experimentu viz kapitola 3.7. Kvůli zachování stejných podmínek v prostředí Tris-HCl pufru (50 mM, pH 7,4), při kterých byla spektrofotometricky stanovena i adheze bakterií na mucin, jsou na obr. 30 zobrazeny hodnoty průměrné distribuce velikosti částic změřené před BATH testem a po BATH testu, které byly také měřeny ve stejném pufru. Mezi velikostí změřenou před smícháním s hexadekanem a po smíchání se zmíněnou hydrofobní fází není patrný žádný trend, což je pravděpodobně ovlivněné tím, že se jedná o planktonické buňky, které tvoří nestálý systém. Navíc metoda přepočítává velikost buněk na kulovité částice, ale vybrané bakterie vykazují tvar tyčinkovitý. Proto nám metoda poskytuje pouze orientační informaci o velikosti buněk v rámci mikrometrů, což je standardní velikost těchto bakterií.

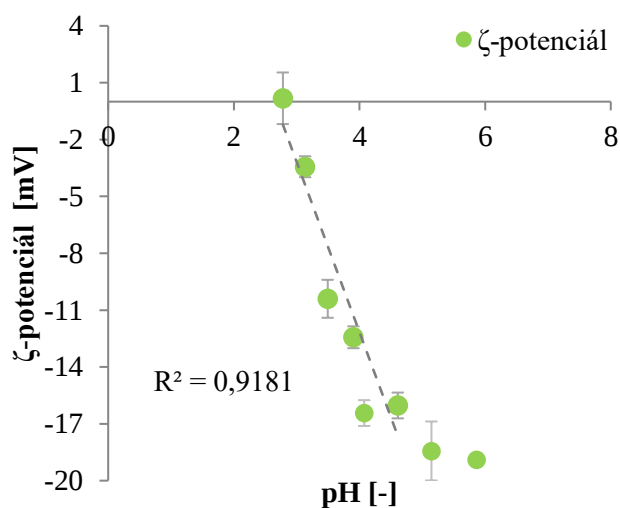


Obr. 30: Průměrná distribuce velikosti částic u vybraných probiotických bakteriálních kmenů v průběhu BATH experimentu (LR – *L. rhamnosus*, LP – *L. plantarum*, LA – *L. acidophilus*, LC – *L. casei*, LZ – *L. zeae*, LD – *L. delbrueckii* subs. *bulgarius*, BB – *Bifidobacterium breve*, BAC – *Bacillus coagulans*).

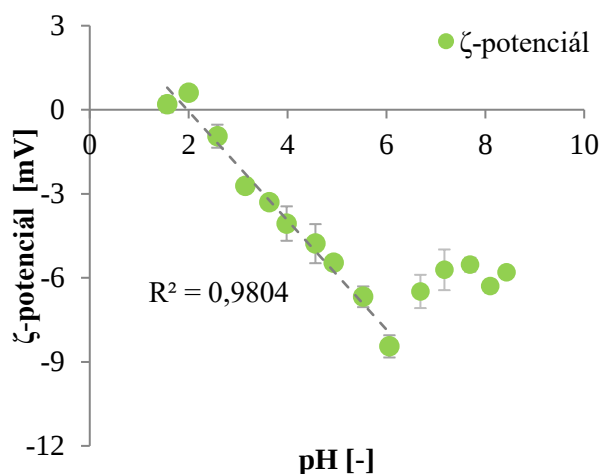
Titrační křivky získané metodou elektroforetického rozptylu světla jsou pro jednotlivé bakterie (viz 3.1.1) graficky znázorněny na obr. 31–obr. 38 a v tab. 16 jsou softwarem stanovené IEP jednotlivých bakterií.



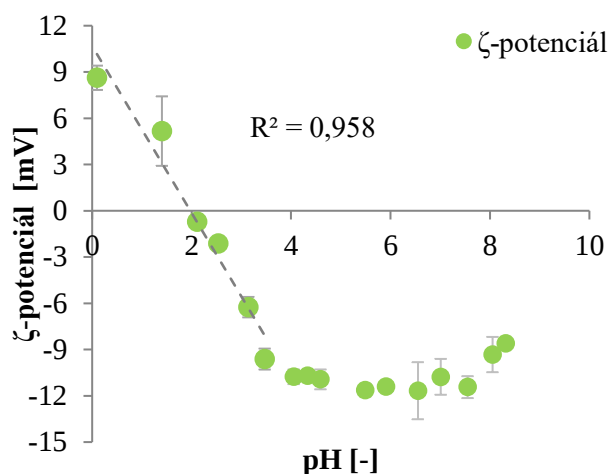
Obr. 31: Stanovení izoelektrického bodu *L. rhamnosus* v Tris-HCl pufru (50 mM).



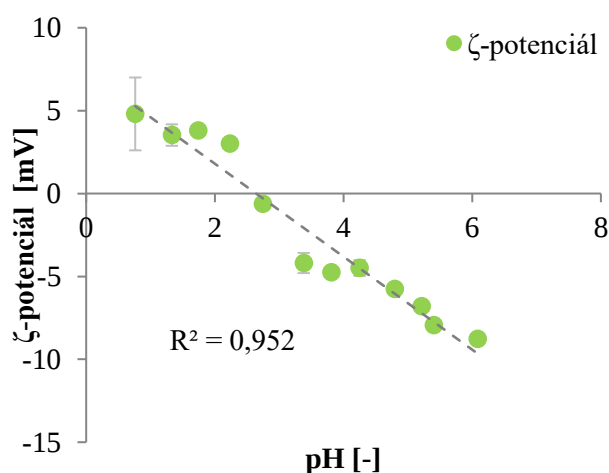
Obr. 32: Stanovení izoelektrického bodu *L. plantarum* v Tris-HCl pufru (50 mM).



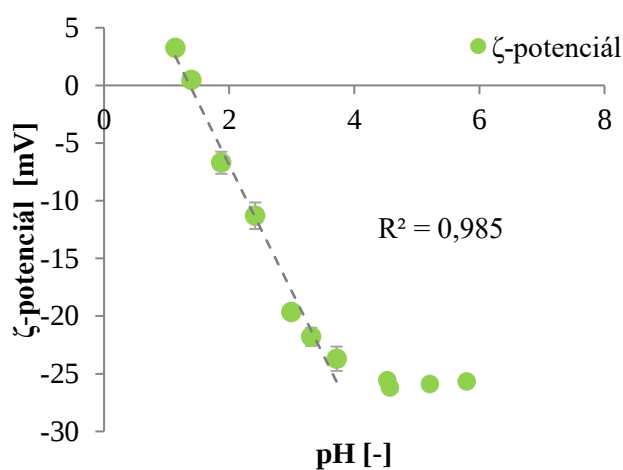
Obr. 33: Stanovení izoelektrického bodu *L. acidophilus* v Tris-HCl pufru (50 mM).



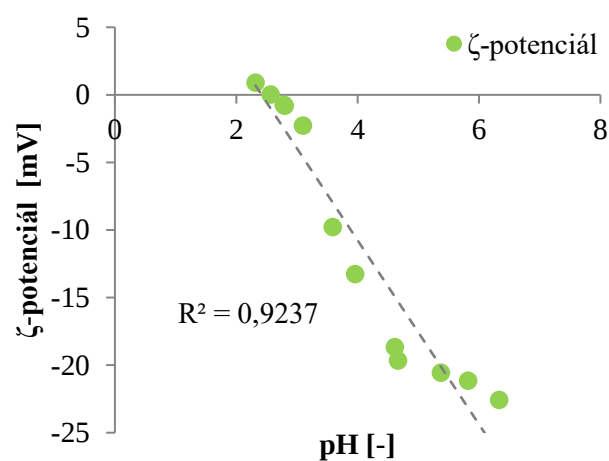
Obr. 34: Stanovení izoelektrického bodu *L. casei* v Tris-HCl pufru (50 mM).



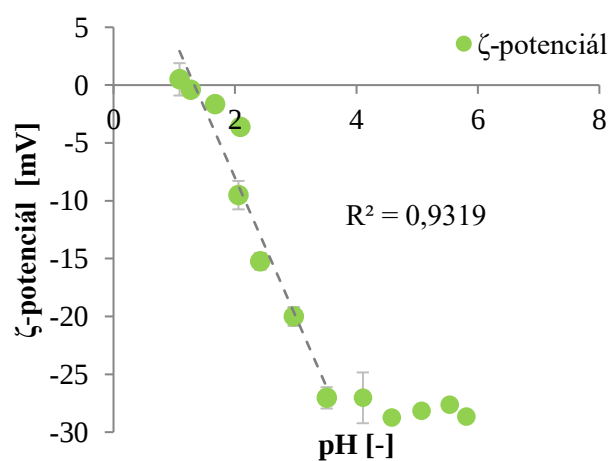
Obr. 35: Stanovení izoelektrického bodu *L. zeae* v Tris-HCl pufru (50 mM).



Obr. 36: Stanovení izoelektrického bodu *L. delbrueckii* v Tris-HCl pufru (50 mM).



Obr. 37: Stanovení izoelektrického bodu *Bifidobacterium breve* v Tris-HCl pufru (50 mM).



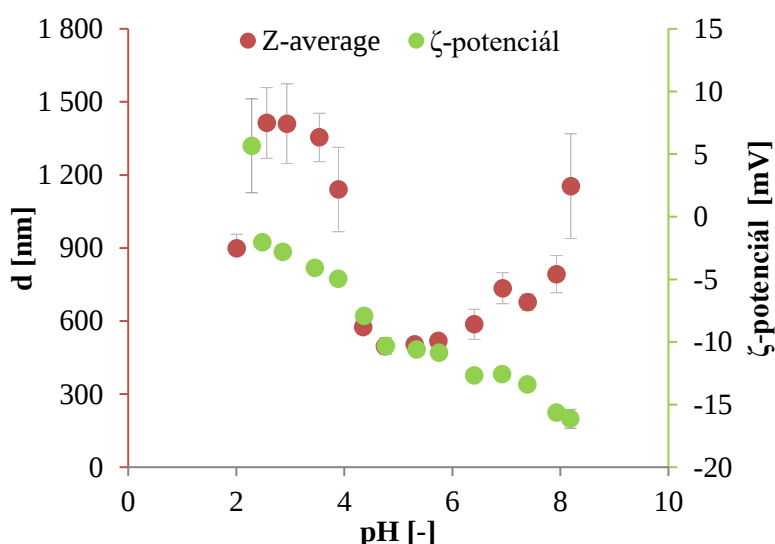
Obr. 38: Stanovení izoelektrického bodu *Bacillus coagulans* v Tris-HCl pufru (50mM).

Tab. 16: Izoelektrické body vybraných bakterií stanoveny metodou ELS.

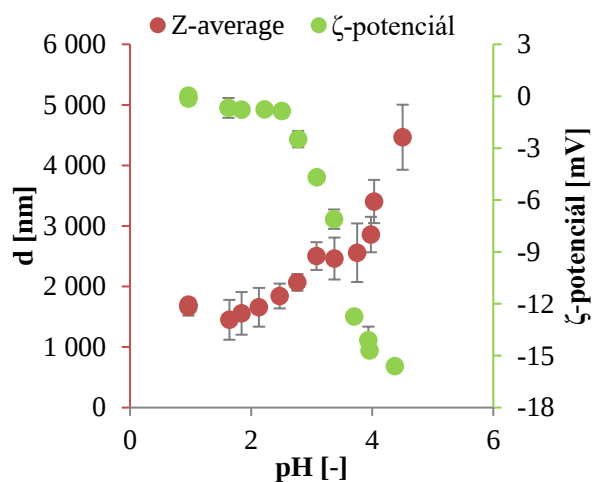
Izoelektrický bod vybraných bakteriálních kmenů [-]							
LR	LP	LA	LC	LZ	LD	BB	BAC
2,50–3,01	2,78	2,23	2,03	2,66	1,43	2,57	2,80
LR – <i>L. rhamnosus</i> , LP – <i>L. plantarum</i> , LA – <i>L. acidophilus</i> , LC – <i>L. casei</i> , LZ – <i>L. zeae</i> , LD – <i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgarius</i> , BB – <i>Bifidobacterium breve</i> , BAC – <i>Bacillus coagulans</i>							

Izoelektrické body všech vybraných probiotických bakterií jsou stanovené pro hodnoty silně kyselého pH. Pravděpodobně tyto výsledky souvisejí s tolerancí bakterií mléčného kvašení (BMK) ke kyselým podmínkám, kterým musí bakterie odolávat v GIT. BMK navíc produkují kyselinu mléčnou, která taktéž snižuje pH prostředí, což automaticky naznačuje, že bakterie nesmí být na kyselé pH příliš senzitivní. Nízká hodnota IEP pravděpodobně umožňuje bakteriím zachovávat své fyziologické vlastnosti při nižších hodnotách pH, což může být klíčové pro schopnost BMK odolávat nízkému pH.

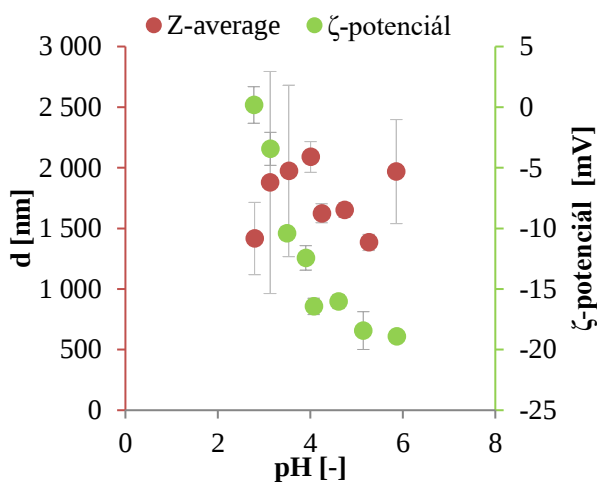
Jak již bylo výše uvedeno, měření průměrné distribuce velikosti mucinu a buněk DLS metodou bylo měřeno paralelně se ζ -potenciálem při kontinuální titraci. Průměrná distribuce velikosti molekul mucinu je zobrazena na obr. 39. Ze získaných dat vyplývá, že se snižujícím se pH docházelo k agregaci molekul mucinu a při nulovém ζ -potenciálu docházelo k největší koagulaci molekul mucinu. Při ostatních hodnotách pH docházelo k zabránění výrazné agregace působením velkého náboje. Nicméně při pH 5 a více docházelo taktéž k nárustu velikosti, což mohla např. ovlivňovat konformace složité glykoproteinové molekuly mucinu. Dále jsou uvedeny výsledky z těchto měření pro buněčné suspenze jednotlivých bakterií na obr. 40–obr. 47.



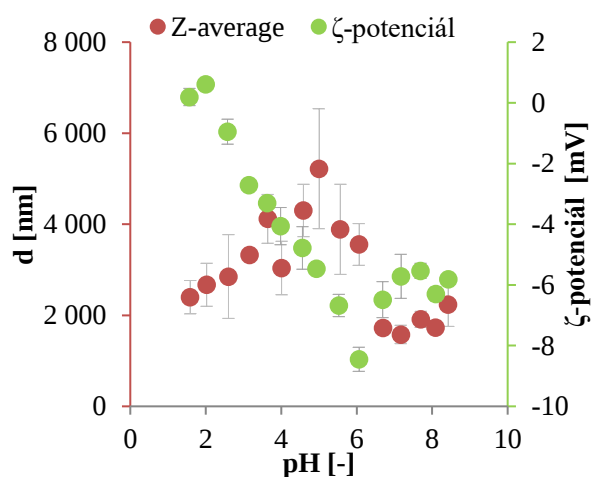
Obr. 39: Agregace molekul mucinu v závislosti na ζ -potenciálu.



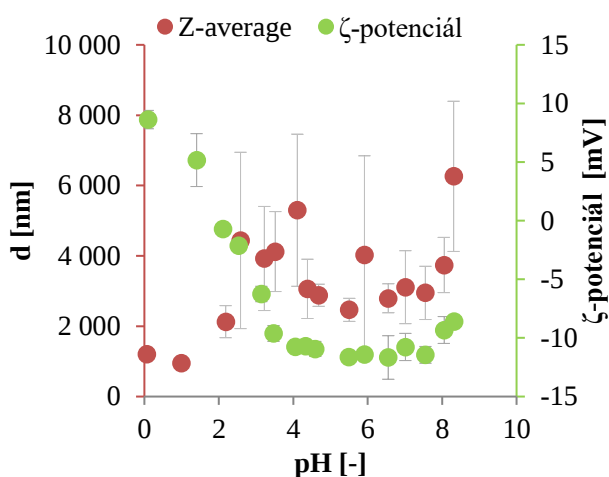
Obr. 40: Agregace buněk *L. rhamnosus* v závislosti na ζ -potenciálu.



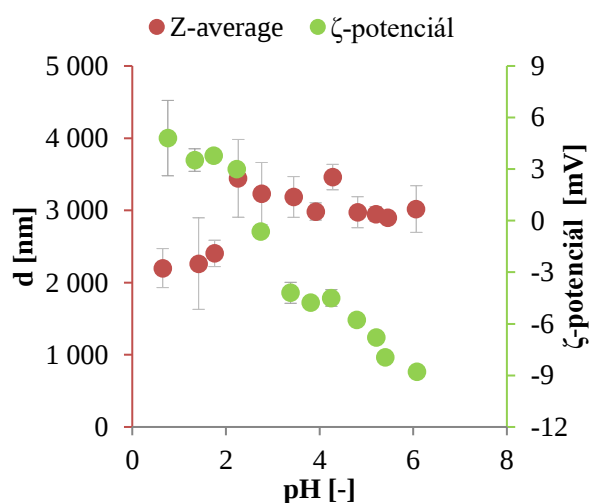
Obr. 41: Agregace buněk *L. plantarum* v závislosti na ζ -potenciálu.



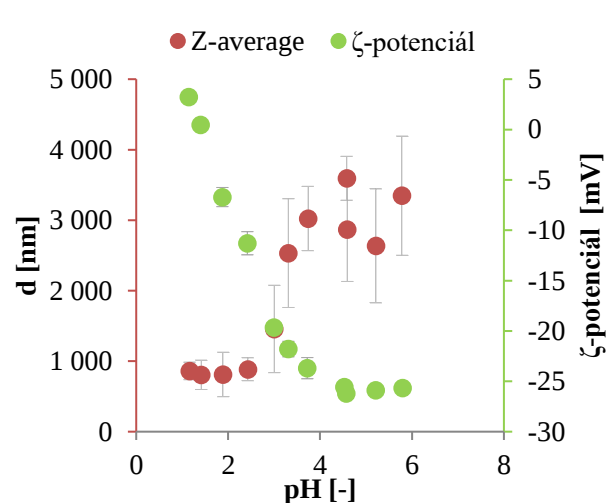
Obr. 42: Agregace buněk *L. acidophilus* v závislosti na ζ -potenciálu.



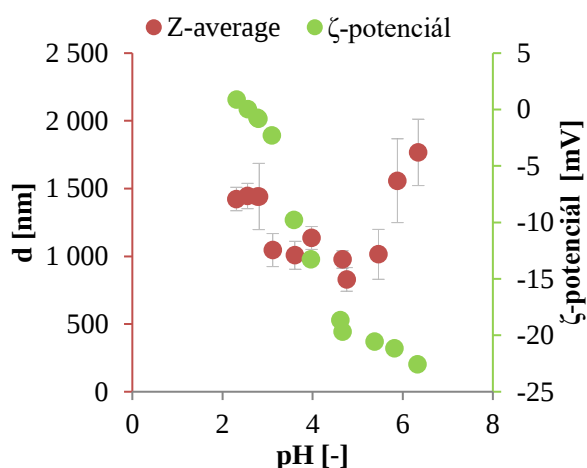
Obr. 43: Agregace buněk *L. casei* v závislosti na ζ -potenciálu.



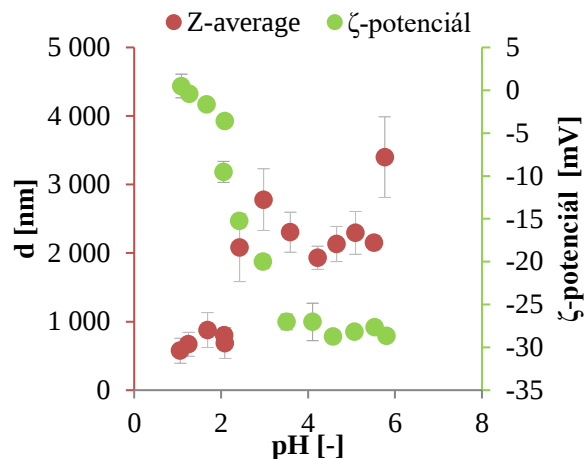
Obr. 44: Agregace buněk *L. zeae* v závislosti na ζ -potenciálu.



Obr. 45: Agregace buněk *L. debrueckii* v závislosti na ζ -potenciálu.



Obr. 46: Agregace buněk *Bifidobacterium breve* v závislosti na ζ -potenciálu.

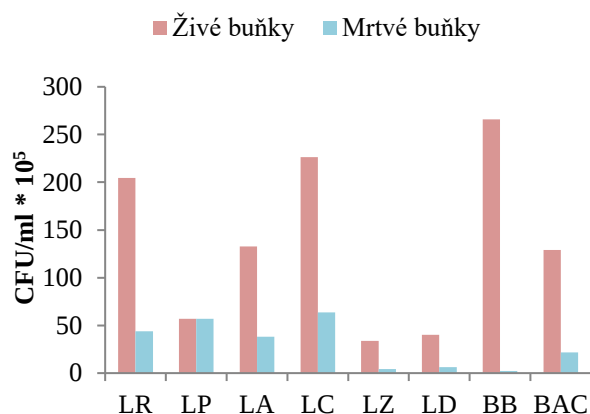


Obr. 47: Agregace buněk *Bacillus coagulans* v závislosti na ζ -potenciálu.

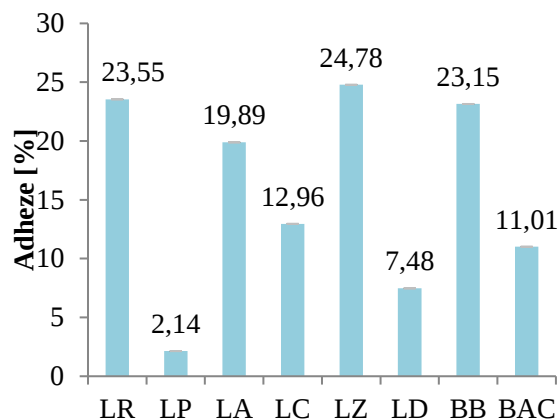
Průměrná distribuce velikosti většiny bakteriálních buněk nevykazovala trend, který byl očekáván jako u molekuly mucinu. Pouze *L. zeae* (obr. 44) a *Bifidobacterium breve* (obr. 46) vykazovaly trend zvyšující se agregace při nulovém ζ -potenciálu. Tyto dvě bakterie vykazovaly nejstabilnější systém planktonických buněk při kontinuální titraci, který potvrzuje korelační koeficient ze všech naměřených hodnot při snižujícím se pH. V ostatních případech docházelo k opačnému trendu a z výsledků je patrné, že při postupném přidávání 1M HCl se systém choval netradičně. ζ -potenciál se musel do určitého bodu ustálit a až poté docházelo ke kontinuálnímu poklesu ζ -potenciálu na zvyšující se iontové síle Tris-HCl pufru. Výsledky jsou provázeny vysokými odchylkami mezi sérii tří paralelních měření, což také nasvědčuje, že systém byl spíše nestabilní. Chyba měření byla pravděpodobně ovlivněna tím, že metoda přepočítává velikost buněk na kulovité částice, ale bakterie mléčného kvašení vykazují tvar tyčinkovitý. Navíc mohlo například docházet k tomu, že bakterie při postupném přidávání 1M HCl měnily pH svého intracelulárního prostoru natolik, že docházelo k zásadním změnám v konformaci proteinů a povrchové struktury bakterií. Pravděpodobně se bude jednat o komplexnější problém, při kterém bude docházet ke změně komplexní povrchové struktury bakterie případně i k narušení některých funkčních skupin a proteinových domén. Povrch bakterií pak na základě těchto změn může vykazovat jiné agragační vlastnosti. Z výsledků je možné, že i tato změna konformace napomáhá bakteriím být rezistentní vůči velmi nízkému pH, protože bifidobakterie jsou obecně méně odolné vůči kyselému pH a u *L. zeae* není tento předpoklad účinného probiotika prozatím detailně prostudován.

Životaschopnost buněk je jedním z hlavních předpokladů úspěšné adheze a k využití bakterie jako probiotika. Byla stanovena viabilita buněk pomocí průtokové cytometrie (Průtokový cytometr, Apogee Flow Systems, Apogee A50). Vzorky byly připraveny a proměřeny viz kapitola 3.4.8 a výsledná viabilita bakteriálních kmenů je znázorněna na obr. 48. Dále byla proměřena adheze vybraných probiotických kmenů na mucin pomocí optimalizované spektrofotometrické metody podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.9 a výsledné adheze vypočtené dle rovnice (6) jsou zobrazeny na obr. 49. Jako poslední experiment pro charakterizaci adheze vybraných bakterií byla proměřena schopnost

hydrofobního efektu těchto bakterií pomocí BATH experimentů na nanofotometru (viz kapitola 3.7). Korelace mezi získanými ζ -potenciály před BATH a po BATH testu pro jednotlivé bakterie a získanými hodnotami BATH [%] proměřenými pomocí nanofotometru a vypočteny na základě rovnice (7) jsou zobrazena na obr. 50.

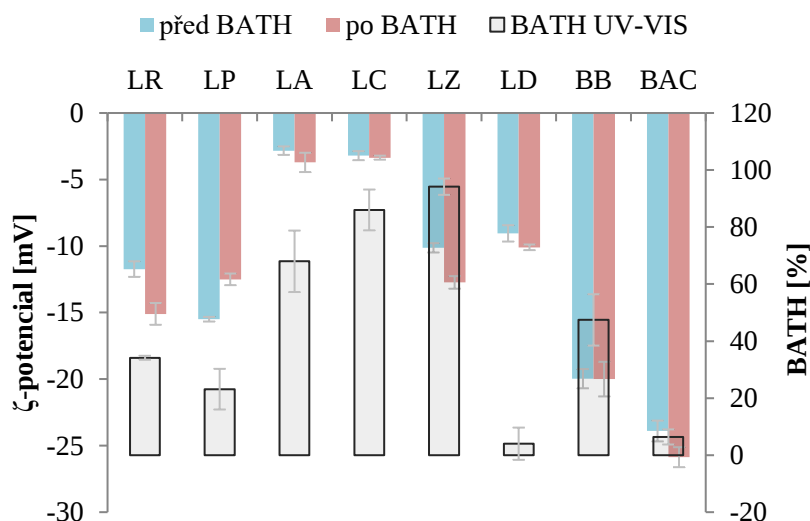


Obr. 48: Viabilita vybraných probiotických kmenů.



Obr. 49: Adheze probiotických bakterií na mucin.

(LR – *L. rhamnosus*, LP – *L. plantarum*, LA – *L. acidophilus*, LC – *L. casei*, LZ – *L. zeae*, LD – *L. delbrueckii* subs. *bulgarius*, BB – *Bifidobacterium breve*, BAC – *Bacillus coagulans*)



Obr. 50: Korelace mezi ζ -potenciálem a hydrofobním efektem pro vybrané probiotické bakterie (LR – *L. rhamnosus*, LP – *L. plantarum*, LA – *L. acidophilus*, LC – *L. casei*, LZ – *L. zeae*, LD – *L. delbrueckii* subs. *bulgarius*, BB – *Bifidobacterium breve*, BAC – *Bacillus coagulans*).

Z průtokové cytometrie byla získána data týkající se viability buněk (obr. 50). Bylo zjištěno, že bakterie odebírané ze stacionární fáze kultivace obsahovaly určité malé množství (od 0–23 %) mrtvých buněk. Buněčná suspenze *L. plantarum* byla zastoupena téměř z poloviny mrtvými buňkami, což je již rarita a takhle velká úmrtnost nebyla očekávána.

Na identifikaci mrtvých buněk bylo použito interkalační činidlo propidium jodid, které se váže na DNA. Toto činidlo je schopné snadno inkorporovat do mrtvé buňky, která má silně narušenou buněčnou stěnu, a jelikož nemá již funkční kanály a metabolismus, tak buňka není schopná transportovat barvivo z intracelulárního prostoru do extracelulárního. Do živé buňky se barvivo také často dostane, avšak je schopná většinu transportovat zpět do extracelulárního prostoru, avšak některé buňky mohou mít transportní kanály oslabené nebo mohou bakterie být v nedokonalé kondici, a tak nejsou schopné barvivo dokonale transportovat, protože propidium jodid představuje velkou molekulu. Proto musíme brát v úvahu, že ne přesná polovina bude zaujímat mrtvé buňky, ale že mrtvé buňky budou tvořit pravděpodobně polovinu buněčné suspenze. Jedním z důvodů proč bakteriální suspenze obsahovala tolik mrtvých buněk je, že bakteriální kmen, který jsme měli k dispozici, byl pravděpodobně senzitivní na delší kultivaci nebo na skladovací podmínky ovlivňující vitalitu zdrojových kultur.

Zmíněná viabilita bakteriálních buněk bude pravděpodobně souviset s adhezí na mucin. *L. plantarum* nevykazoval téměř žádnou adhezi na mucin (2,14 %), což může souviset právě s vyšším zastoupením mrtvých buněk v populaci. Z nejnovějších studií [28, 29] vyplývá, že i mrtvé buňky jsou schopné adheze k různým povrchům, avšak záleží na způsobu usmrcení těchto buněk. Nicméně v rámci těchto experimentů neznáme konkrétní příčinu smrti buněk, a tudíž není možno tvrdit, že se *L. plantarum* neadherovala právě z tohoto důvodu. Z výsledku viability (obr. 48) si lze navíc povšimnout, že množství buněk v populaci nebyl zásadním parametrem určující adhezi na mucin. *L. zae* vytvářel malou populaci buněk, a přesto dosáhl vysokých adhezí na mucin.

Ze získaných experimentálních dat na obr. 49 je patrné, že každá bakterie se k mucinu v prostředí Tris-HCl pufru adherovala odlišně. Dále je zřejmé, že na adhezi probiotických bakterií k mucinu se bude podílet mnoho faktorů, jako je sensitivita k prostředí, ve kterém dochází k adhezi, bude záležet na použitém bakteriálním druhu i kmeni (druhově i kmenově specifické) a v neposlední řadě bude záviset na interakcích, které jednotlivé bakteriální kmeny využívají. Nishiyama a kol. (2016) [96] shrnuli nejnovější poznatky ze studií interakcí probiotických bakterií. Gram-pozitivní bakterie disponují silnou peptidoglykanovou membránou obsahující velké množství sacharidů a proteinů umožňující specifické i nespecifické interakce s mucinem. Zejména buněčné povrchové proteiny jsou hlavními adhezními faktory a dle lokalizace jsou rozděleny na dva typy. První typ je kovalentně zakotven (prostřednictvím LPTXG) v buněčné stěně sortázami umožňující např. adhezi *L. rhamnosus* nebo *L. acidophilus*. Druhým typem jsou multifunkční nekovalentně zakotvené proteiny na buněčné stěně, které jsou zastoupeny např. ve kmenech *L. plantarum* a některých kmenech *L. acidophilus*. *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *L. acidophilus* a *L. zae* vykazují vysoké procentuální adheze k mucinu v prostředí Tris-HCl pufru, což by nasvědčovalo zprostředkování adheze pomocí více specifických interakcí, avšak to neznamena, že žádné nekovalentní interakce se nebudou při adhezi vyskytovat. Na základě výsledků a dostupných informací [96] je možné, že právě např. u *L. rhamnosus* bude adheze podpořena zakotvením přes LPTXG motiv a tyto interakce budou efektivnější na adhezi k mucinu, než-li je to u vazeb zprostředkovaných nekovalentně vázanými proteiny, kterými

disponuje bakterie *L. plantarum*. Zároveň je nutné mít na paměti, že veškeré interakce budou kmenově specifické a sensitivní na vliv prostředí. Některé probiotické bakterie jsou podávány jako směsné kultury, což bude mít také vliv na adhezi k mucinu, jelikož se bakterie budou pravděpodobně vzájemně ovlivňovat, ale tento vliv nebyl při optimalizované metodě zahrnut.

L. zae není z dostupných informací identifikován jako probiotický druh. V rámci optimalizované metody prokázal vysokou adhezi k mucinu, což by splňovalo první kritický krok pro probiotické bakterie, a proto by se v dalších studiích bylo vhodné *L. zae* zabývat v rámci jiných probiotických vlastností, jelikož by mohlo jít o nový druh zařazený do probiotických mikroorganismů.

Na obr. 50 je patrná korelace mezi hydrofobním efektem bakterií a jejich změřeným ζ -potenciálem v rámci BATH testů. Se snižujícím se ζ -potenciálem se zvyšuje hydrofobnost bakterií, a tedy se pravděpodobně snižují i elektrostatické interakce. Z tohoto trendu vystupuje pouze *L. delbrueckii*, který netradičně vycházel při měření ζ -potenciálu, kdy při kontinuální titraci byl změřen ζ -potenciál v Tris-HCl pufru (50 mM, pH 6) na hodnotu -25 (obr. 36) a při stejných podmínkách během BATH experimentů byl ζ -potenciál stanoven na -10 (obr. 50). To nasvědčuje tomu, že se kultura chovala neobvykle a mohlo se jednat o směsnou nebo kontaminovanou kulturu, protože i při kultivaci zdrojových kultur z lyofilizátu vykazovala netradiční průběh kultivace. Z výsledků (obr. 50) je patrné, že například *Bifidobacterium breve* disponoval silným hydrofobním efektem i vyšší adhezí na mucin. To by mohlo dokazovat kombinaci jak specifických interakcí, tak nekovalentních interakcí – hydrofobního efektu a snížení elektrostatických sil, jelikož *Bifidobacterium breve* oproti již zmiňovanému *L. rhamnosus* (v kapitole 4.2.3.1) pravděpodobně disponuje vyšším počtem hydrofobních domén.

5 ZÁVĚR

Diplomová práce „Charakterizace adsorbčních vlastností probiotických bakterií“ byla zaměřená na studium adsorbčních vlastností převážně u modelové probiotické bakterie *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825. Nicméně získané optimalizované metody byly následně použity i na charakterizaci dalších probiotických bakterií *Lactobacillus plantarum* CCM 7039, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bifidobacterium breve* CCM 7825 a *Bacillus coagulans* CCM 2658. Pro studium adsorbčních vlastností byl vybrán i jeden potencionální probiotický kmen *Lactobacillus zeae* CCM 7069, jehož adhezí vlastnosti, v rámci použitelnosti této bakterie jako účinného probiotického mikroorganismu byly diskutovány.

Za předpokladu, že vybrané bakteriální kmeny adherují na hlavní složku hlenu v gastrointestinálním traktu – mucin, byla v první řadě optimalizována spektrofotometrická metoda stanovení procentuální adheze bakterií na mucin. Tato metoda prošla několika optimalizačními kroky, jejichž výsledkem byla metoda pro studium adheze bakteriálních buněk na mucin. Pro rozpuštění mucinu byl mucin připravován v prostředí Tris-HCl pufru za stálého míchání při 37 °C přes noc. Bakteriální buňky byly inkubovány s mucinem v poměru 1:4 po dobu 20 min při 80 rpm a 37 °C. Po inkubaci mucinu s bakteriálními buňkami byl mucin adherovaný na bakteriální buňky společně s buňkami odseparován šetrnou centrifugací a v supernatantu pak byla spektrofotometricky stanovena (260 nm) koncentrace tzv. volného mucinu pomocí nanofotometru, Implen, P 300. Takto optimalizované podmínky metody byly použity při verifikaci metody dalšími bakteriemi, a taktéž ke studiu jejich adsorbčních vlastností na mucin.

Aby bylo možné detailněji charakterizovat adsorbční interakce bakterií k mucinu, tak byla optimalizována metoda dynamického rozptylu světla (DLS) a elektroforetického rozptylu světla (ELS) a ke studiu hydrofobního charakteru bakterií byla využita metoda bakteriální adheze k uhlovodíkům (BATH [%]). Získaná data z rozptylu světla byla nejvíce diskutována v rámci izoelektrického bodu bakterií a mucinu, který má vypovídající hodnotu o povrchovém náboji. Za účelem objasnění různých vlivů, které by mohly podporovat nebo naopak snižovat adhezi k mucinu byla vybrána modelová bakterie *L. rhamnosus*. Nicméně závěry z těchto experimentů je možné obecně využívat pro stanovení adsorbčních vlastností probiotických bakterií v předložené práci, protože se jedná o gram-pozitivní bakterie mléčného kvašení, které sdílí podobnost v morfologii včetně velikosti.

Adheze probiotických bakterií k mucinu je ovlivňována přítomností mucinu při kultivaci bakterií. Bylo stanoveno, že není patrná žádná korelace mezi adhezí a koncentrací mucinu během kultivace, avšak adheze bakterií k mucinu se u většiny stanovených koncentrací zvýšila oproti adhezí *L. rhamnosus* za standardních podmínek. Dalším faktorem ovlivňující adhezi je teplota, při které probíhala inkubace bakterií s mucinem. Při nižších teplotách inkubace (25 a 30 °C) nedocházelo k žádné významné adhezí, avšak při vyšších teplotách již k adhezí docházelo. Bakterie jsou kultivovány při 37 °C, to nasvědčuje tomu, že bakterie preferují teplé prostředí, což je pravděpodobně důvod, proč byla při těchto teplotách (37 a 42 °C) vyšší adheze. Nicméně při vyšší teplotě inkubace docházelo k mírnému poklesu

adheze k mucinu, což by mohlo mít za následek parciální denaturaci proteinů zodpovídajících za adhezní interakce.

Významný vliv na adhezi probiotických bakterií má pH. V rámci studie elektrostatických interakcí přispívajících k adhezi k mucinu byl pomocí metody ELS stanoven izoelektrický bod (IEP) *L. rhamnosus* na hodnotu 2,5–3 a IEP mucinu byl stanoven na hodnotu 2,47. Ve fyziologickém prostředí budou tedy pravděpodobně převládat odpudivé interakce, nicméně bude záležet na distribuci náboje na povrchu buněk a na molekulární struktuře mucinu. Z BATH experimentu byl stanoven hydrofobní charakter *L. rhamnosus* v prostředí hexadekanu. Z výsledků adhezního experimentu *L. rhamnosus* na mucin a BATH experimentu v prostředí Tris-HCl o pH 6–9 bylo zjištěno, že elektrostatické interakce budou pravděpodobně více přispívat k adhezi, než hydrofobní efekt. Protože se zvyšujícím se pH dochází ke zvyšování záporné hodnoty povrchového náboje, jak bakterií, tak mucinu. Z výsledků je patrné snížení hydrofobního efektu se zvyšujícím se pH, což koreluje se stabilizací systému při vyšší hodnotě ζ -potenciálu. Z těchto výsledků bylo zjištěno, že na adhezi bakterií k mucinu bude mít i pravděpodobně vliv konformace mucinu. Při nižším pH dochází k rozpletení náhodného klubka na vlákna, při kterém dochází k odkrytí hydrofobních domén, a proto bude mucin lépe dostupný pro zmiňovaný efekt. Jak silně se budou bakterie adherovat, závisí především na počtu hydrofobních domén, kterými bakterie disponuje. Ze získaných výsledků *L. rhamnosus* pravděpodobně disponuje menším počtem těchto domén, a proto není schopen překonat elektrostatické interakce. Při nízkém pH vykazují bakterie díky menší hodnotě povrchového náboje slabší odpudivé interakce k mucinu a *L. rhamnosus* tak k tomuto povrchu neadherují, i přestože mucin je v nižším pH lépe dostupný pro hydrofobní efekt.

Iontová síla je dalším důležitým parametrem ovlivňující adhezní interakce probiotických bakterií k mucinu. Z DLVO teorie vyplývá, že při vyšších koncentracích elektrolytu klesá tloušťka elektrické dvojvrstvy, čímž se obvykle zvyšuje adheze bakterií k různým povrchům. Se zvyšující se iontovou silou Tris-HCl pufru (pH 7,4) docházelo ke zvyšování adheze. Nicméně největší adheze byla pozorována za fyziologických podmínek, při kterých byly pravděpodobně nejvíce přítomny specifické interakce skrz specializované organely nebo povrchové struktury vykazující určitou senzitivitu k prostředí.

Bylo zjištěno, že adhezi ovlivňuje i růstová fáze, ve které se probiotické bakterie vyskytovaly. V růstové fázi docházelo ke zvýšení adheze, jak k mucinu, tak k hydrofobní fázi hexadekanu. Je to pravděpodobně dáno tím, že při kultivaci dochází ke změně povrchu bakterií, při které dochází k různým změnám struktury a funkci buněčných komponent přispívajících k adhezi (např. pily). Z tohoto důvodu sropce na mucin i na hydrofobní fázi s časem klesala. V praxi by bylo ze strany adheze tedy nejvýhodnější využívat pro probiotické výrobky probiotické buňky v růstové fázi.

Za účelem charakterizace adsorbčních vlastností probiotických bakterií byly navrženy a optimalizovány experimenty ke stanovení IEP všech vybraných bakterií, stanovení distribuce průměrné velikosti částic, BATH experimenty za účelem získání informací týkajících se hydrofobního efektu, a také byla testována samotná adheze bakterií k mucinu

optimalizovanou spektrofotometrickou metodou. Izoelektrické body všech vybraných bakterií byly stanoveny pro hodnoty silně kyselého pH (1,43–3,01). Pravděpodobně tyto výsledky souvisejí s tolerancí bakterií mléčného kvašení ke kyselým podmínkám, kterým musí bakterie odolávat v GIT, protože si pravděpodobně jsou tak schopny zachovávat své fyziologické vlastnosti i při nízkém pH. Navíc nám IEP poskytují informaci o elektrostatických silách, které budou ve fyziologickém pH poměrně silné, díky vysoké záporné hodnotě povrchového náboje.

Průměrná distribuce velikosti částic nám v případě molekuly mucinu naznačuje, že se snižujícím se pH docházelo k agregaci molekul mucinu a při nulovém ζ -potenciálu docházelo k jeho největší koagulaci. Při ostatních hodnotách pH docházelo k zabránění výrazné agregace působením velkých rozdílných nábojů na glykoproteinové struktuře. Většina bakteriálních buněk nevykazovala trend zaznamenaný u molekuly mucinu. Pouze *L. zae* a *Bifidobacterium breve* vykazovaly trend zvyšující se agregace při nulovém ζ -potenciálu. Tyto dvě bakterie vykazovaly nejstabilnější systém planktonických buněk při kontinuální titraci, který potvrzuje korelační koeficient. V ostatních případech docházelo k opačnému trendu a z výsledků je patrné, že při postupném přidávání 1M HCl se systém choval netradičně, ζ -potenciál se musel do určitého bodu ustálit. Chyba měření byla pravděpodobně ovlivněna tím, že metoda přepočítává velikost buněk na kulovité částice, ale bakterie mléčného kvašení vykazují tvar tyčinkovitý. Navíc mohlo například docházet k tomu, že bakterie při postupném přidávání 1M HCl měnily pH svého intracelulárního prostoru natolik, že docházelo k zásadním změnám v konformaci proteinů a povrchové struktury bakterií, což následně ovlivňovalo agregační vlastnosti, ale pravděpodobně se bude jednat o komplexnější problém. Z výsledků je možné, že i tato změna konformace napomáhá bakteriím se přizpůsobit velmi nízkému pH a být vůči němu rezistentní, což by mohlo být předmětem dalších studií.

Pomocí průtokové cytometrie byly získány data týkající se viability buněk. Bylo zjištěno, že bakterie odebírané ze stacionární fáze kultivace obsahovaly určité malé množství (od 0–23 %) mrtvých buněk. Buněčná suspenze *L. plantarum* byla zastoupena téměř z poloviny mrtvými buňkami, což je již rarita a takhle velká úmrtnost nebyla očekávána, což mohlo být způsobeno tím, že bakteriální kmen, který jsme měli k dispozici, byl pravděpodobně senzitivní na delší kultivaci nebo na skladovací podmínky ovlivňující vitalitu zdrojových kultur. Avšak nemůžeme 100% konstatovat, že malá adheze k mucinu byla ovlivněna právě tímto vlivem, jelikož nevíme jakým způsobem byly buňky usmrceny. Navíc z výsledku viability si lze povšimnout, že množství buněk v populaci nebyl zásadním parametrem určující adhezi na mucin. *L. zae* vytvářel malou populaci buněk, a přesto dosáhl vysokých adhezí na mucin.

Z výsledků adheze vybraných bakteriálních kmenů na mucin je patrné, že každá bakterie se k mucinu v prostředí Tris-HCl pufru adherovala odlišně. Z výsledků je zřejmé, že na adhezi probiotických bakterií k mucinu se bude podílet mnoho faktorů, jako je sensitivita k prostředí, ve kterém dochází k adhezi, bude záležet na použitém bakteriálním kmeni (kmenově specifické) a v neposlední řadě bude záviset na interakcích, které jednotlivé bakteriální kmeny

využívají. Probiotické bakterie disponují kovalentně zakotvenými proteiny (prostřednictvím LPTXG) v buněčné stěně sortázami umožňující např. adhezi *L. rhamnosus* nebo *L. acidophilus* nebo multifunkčními nekovalentně zakotvenými proteiny na buněčné stěně, které jsou zastoupeny např. ve kmenech *L. plantarum*. Z dosažených výsledků je možné, že *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *L. acidophilus* a *L. zae* vykazují vysoké procentuální adheze k mucinu v prostředí Tris-HCl, právě z důvodu kovalentně zakotveného proteinu. Tento protein může vykazovat specifitější a silnější interakce než nekovalentně vázaný protein zprostředkující vazby u *L. plantarum*, který nevykazoval téměř žádnou adhezi na mucin. Jak jsou povrchové adheziny navázány na povrch buňky by mohlo tedy souviset se silou interakcí, kterými se budou bakterie vázat k mucinu. Zároveň je nutné mít na paměti, že veškeré interakce budou kmenově specifické a sensitivní na vliv prostředí. Navíc probiotické bakterie jsou podávány jako směsné kultury, což bude mít také vliv na adhezi k mucinu, jelikož se bakterie budou pravděpodobně vzájemně ovlivňovat, ale tento vliv nebyl při optimalizované metodě zahrnut.

L. zae není z dostupných informací identifikován jako probiotický kmen. V rámci optimalizované metody prokázal vysokou adhezi k mucinu, což by splňovalo první kritický krok pro probiotické bakterie, a proto by se v dalších studiích bylo vhodné *L. zae* zabývat v rámci i jiných probiotických vlastností. Mohlo by též jít o nový kmen zařazený do probiotických mikroorganismů.

Z BATH experimentu je patrná korelace mezi hydrofobním efektem bakterií a jejich změřeným ζ -potenciálem. Se snižujícím se ζ -potenciálem se zvyšuje hydrofobnost bakterií, a tedy se pravděpodobně snižují i elektrostatické interakce. Z výsledků je patrné, že například *Bifidobacterium breve* disponoval silným hydrofobním efektem i vyšší adhezí na mucin. To by mohlo dokazovat kombinaci jak specifických interakcí, tak hydrofobního efektu, jelikož *Bifidobacterium breve* oproti již zmiňovanému *L. rhamnosus* pravděpodobně disponuje vyšším počtem hydrofobních domén.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. Fyzikální chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [2] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [3] KLOUDA, Pavel a Vladimír KARPENKO. Fyzikální chemie. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2002. ISBN 80-863-6906-4.
- [4] *Seminar on Adsorption : Adsorption* [online]. [Http://www.microtrac-bel.com/en/tech/bel/seminar01.html](http://www.microtrac-bel.com/en/tech/bel/seminar01.html). Dostupné z: <http://www.microtrac-bel.com/en/tech/bel/seminar01.html>.
- [5] KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO. Biofyzikální chemie. Praha: Academia, 2000. ISBN 80-200-0791-1.
- [6] MAREČEK, Aleš a Jaroslav HONZA. Chemie pro čtyřletá gymnázia. Vyd. 3. Brno, 2013. ISBN 80-902402-0-8.
- [7] PROCHÁZKOVÁ, Gita, Vladimír JIRKŮ, Lidmila BARTOVSKÁ a Tomáš BRÁNYIK. Použití fyzikálně-chemických nástrojů pro predikci mikrobiální adheze. *Chem. Listy*. 2011, (105), 856-863.
- [8] HERMANSSON, Malte. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14. 1999, 105–119.
- [9] CARPENTIER, Brigitte a O. CERF. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993, 75(6), 499-511. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x. ISSN 00218847.
- [10] POUCHLÝ, Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-X.
- [11] LEAR, Gavin. *Biofilms in bioremediation: current research and emerging technologies*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2016. ISBN 978-1-910190-29-6.
- [12] Five Ways You Can Use the Zetasizer Nano to Optimize Formulation Stability. *AZO materials*. 2017 [online]. Dostupné z: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=13442>
- [13] SHARP, Jeffrey M. a Richard B. DICKINSON. Direct Evaluation of DLVO Theory for Predicting Long-Range Forces between a Yeast Cell and a Surface. *Langmuir*. 2005, 21(18), 8198-8203. DOI: 10.1021/la046765s. ISSN 0743-7463.
- [14] RÜHS, P.A., L. BÖCKER, R.F. INGLIS a P. FISCHER. Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid–liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, 117, 174-184. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.023. ISBN 10.1016/j.colsurfb.2014.02.023. ISSN 09277765.
- [15] GOGINENI, Vijaya K. Probiotics: History and Evolution. *Journal of Ancient Diseases*. 2013, 01(02). DOI: 10.4172/2329-8731.1000107. ISSN 23298731.

- [16] YOO, Ji a Sung KIM. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients*. 2016, 8(3), 173. DOI: 10.3390/nu8030173. ISSN 2072-6643.
- [17] MORADI MOGHADDAM, Omid. Probiotics in Critically Ill Patients: History and Evolution. *Anesthesiology and Pain Medicine*. 2011, 1(2). DOI: 10.5812/kowsar.22287523.2291. ISSN 22287523.
- [18] SOCCOL, Carlos Ricardo. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 2010, 48(4), 413–434. ISSN 1330-9862.
- [19] LEE, Yuan Kun a Seppo SALMINEN. Handbook of probiotics and prebiotics. 2nd ed. Hoboken, N.J, 2009. ISBN 978-0-470-13544-0.
- [20] BINDELS, Laure B., Nathalie M. DELZENNE, Patrice D. CANI a Jens WALTER. *Towards a more comprehensive concept for prebiotics*. 2015, 12(5), 303-310. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.47. ISBN 10.1038/nrgastro.2015.47. ISSN 1759-5045.
- [21] VALCHEVA, Rosica a Levinus A. DIELEMAN. *Prebiotics: Definition and protective mechanisms*. 2016, 30(1), 27-37. DOI: 10.1016/j.bpg.2016.02.008. ISSN 15216918.
- [22] NAGPAL, Ravinder a Anmol KAUR. Synbiotic Effect of Various Prebiotics on In Vitro Activities of Probiotic Lactobacilli. *Ecology of Food and Nutrition*. 2011, 50(1), 63-68. DOI: 10.1080/03670244.2011.539161. ISSN 0367-0244.
- [23] KIVIT, S., E. SAELAND, A. D. KRANEVELD, et al. Galectin-9 induced by dietary synbiotics is involved in suppression of allergic symptoms in mice and humans. *Allergy*. 2012, 67(3), 343-352. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02771.x. ISSN 01054538.
- [24] BOOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHẠM. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. 2000. DOI: doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.002.
- [25] DALIRI, Eric Banan-Mwine a Byong H. LEE. New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellnes*. 2015, 4(2), 56-65. DOI: 10.1016/j.fshw.2015.06.002. ISSN 22134530.
- [26] FRIC, P. Probiotics in Gastroenterology. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 40(3), 197-201. DOI: 10.1055/s-2002-22328. ISSN 00442771.
- [27] SU, P., A. HENRIKSSON, H. MITCHELL, et al. Survival and retention of the probiotic *Lactobacillus casei* LAFTI® L26 in the gastrointestinal tract of the mouse. *Letters in Applied Microbiology*. 2007, 44(2), 120-125. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.02063.x. ISSN 0266-8254.
- [28] OUWEHAND, Arthur C., Seppo J. SALMINEN, A. D. KRANEVELD, et al. The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-viable Bacteria. *International Dairy Journal*. 1998, 8(9), 749-758. DOI: 10.1016/S0958-6946(98)00114-9. ISSN 09586946.
- [29] OUWEHAND, A.C., S. TÖLKKÖ, J. KULMALA, et al. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. 2000, 31(1), 82-86. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2000.00773.x. ISSN 02668254.

- [30] TUOMOLA, Elina M., Arthur C. OUWEHAND and Seppo J. SALMINEN. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, 60(1), 75-81. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00319-6. ISSN 01681605.
- [31] LAHTINEN, Sampo J., Nathalie M. DELZENNE, Patrice D. CANI a Jens WALTER. *Probiotic viability – does it matter?*. 2015, 12(5), 303-310. DOI: 10.3402/mehd.v23i0.18567. ISBN 10.3402/mehd.v23i0.18567. ISSN 1759-5045.
- [32] PIĄTEK, J., M. Gibas-Dorna, A. Olejnik, H. Krauss, K. Wierzbicki, W. Żukiewicz-Sobczak, M. Głowacki. *The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination – in vitro study*. *Ann Agric Environ Med*. 2012; 19(1): 99-102. ISSN 1232-1966.
- [33] LEVINSON, Warren. *Review of medical microbiology and immunology*. 13th ed. New York: McGraw-Hill Education Medical, c2014. ISBN 978-0071818117.
- [34] VUYST, Luc De, Lefteris MAKRAS, Lazlo AVONTS, et al. Antimicrobial potential of probiotic or potentially probiotic lactic acid bacteria, the first results of the international European research project PROPATH of the PROEUHEALTH cluster. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009, 16(2-3), 125-130. DOI: 10.1080/08910600410032303. ISSN 1651-2235.
- [35] LEBEER, S., J. VANDERLEYDEN, S. C. J. DE KEERSMAECKER, et al. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2008, 72(4), 728-764. DOI: 10.1128/MMBR.00017-08. ISSN 1092-2172.
- [36] KLABAN, Vladimír. *Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník*. Hradec Králové: Gaudeamus, 1999. ISBN 80-704-1639-4
- [37] *Význam a použití bakteriocinů*. 2007 [online]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/vyznam-a-pouziti-bakteriocinu/>.
- [38] ZACHAROF, M.P. a R.W. LOVITT. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*. 2012, 2, 50-56. DOI: 10.1016/j.apcbee.2012.06.010. ISSN 22126708.
- [39] KLEMM, Per, Mark A. SCHEMBRI, S. C. J. DE KEERSMAECKER, et al. Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*. 2000, 290(1), 27-35. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80102-2. ISSN 14384221.
- [40] PROFT, T., E. N. BAKER, Patrice D. CANI a Jens WALTER. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009, 66(4), 613-635. DOI: 10.1007/s00018-008-8477-4. ISBN 10.3402/mehd.v23i0.18567. ISSN 1420-682X.
- [41] BOEKHORST, J., M. W. H. J. DE BEEN, M. KLEEREBEZEM a R. J. SIEZEN. Genome-Wide Detection and Analysis of Cell Wall-Bound Proteins with LPxTG-Like Sorting Motifs. *Journal of Bacteriology*. 2005, 187(14), 4928-4934. DOI: 10.1128/JB.187.14.4928-4934.2005. ISSN 0021-9193.

- [42] *Easy biology class* [online]. Dostupné z: <http://www.easybiologyclass.com/wp-content/uploads/2017/05/Difference-between-Flagella-and-Fimbriae.jpg>.
- [43] HARZALLAH, Daoud, Hani BELHADJ, Patrice D. CANI a Jens WALTER. Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*. InTech, 2013, 2013-01-30, 66(4), 613-635. DOI: 10.5772/50732. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 1420-682X.
- [44] CÁRDENAS, Nivia, Javier CALZADA, Ángela PEIROTÉN, Esther JIMÉNEZ, Rosa ESCUDERO, Juan M. RODRÍGUEZ, Margarita MEDINA a Leónides FERNÁNDEZ. Development of a Potential Probiotic Fresh Cheese Using Two *Lactobacillus salivarius* Strains Isolated from Human Milk: period: October 1957-February 1964. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. InTech, 2014, 1965, 11(5), 4745-4767. DOI: 10.1155/2014/801918. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 1660-4601.
- [45] CEBECI, Aysun, Candan GÜRAKAN, Ángela PEIROTÉN, Esther JIMÉNEZ, Rosa ESCUDERO, Juan M. RODRÍGUEZ, Margarita MEDINA a Leónides FERNÁNDEZ. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains: period: October 1957-February 1964. *Food Microbiology*. InTech, 2003, 1965, 20(5), 511-518. DOI: 10.1016/S0740-0020(02)00174-0. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 07400020.
- [46] DOBSON, C Melissa, Bonnie CHABAN, Harry DENEER, Barry ZIOLA, D. M. LOACH, K. MUNRO a T. ALATOSSAVA. *Lactobacillus casei* , *Lactobacillus rhamnosus* , and *Lactobacillus zeae* isolates identified by sequence signature and immunoblot phenotype: period: October 1957-February 1964. *Canadian Journal of Microbiology*. 2004, 1965, 50(7), 482-488. DOI: 10.1139/w04-044. ISSN 0008-4166.
- [47] WALTER, J., G. W. TANNOCK, A. TILSALA-TIMISJARVI, S. RODTONG, D. M. LOACH, K. MUNRO a T. ALATOSSAVA. Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66(1), 297-303. DOI: 10.1128/AEM.66.1.297-303.2000. ISSN 0099-2240.
- [48] HOLZAPFEL, Wilhelm H, Petra HABERER, Rolf GEISEN, Johanna BJÖRKROTH, Ulrich SCHILLINGER, K. MUNRO, T. ALATOSSAVA a Leónides FERNÁNDEZ. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition: period: October 1957-February 1964. *The American Journal of Clinical Nutrition*. InTech, 2001, 1965, 73(2), 365s-373s. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.365s. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 0002-9165.
- [49] FIJAN, Sabina, G. W. TANNOCK, A. TILSALA-TIMISJARVI, S. RODTONG, D. M. LOACH, K. MUNRO a T. ALATOSSAVA. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014, 11(5), 4745-4767. DOI: 10.3390/ijerph110504745. ISSN 1660-4601.

- [50] SONG, Danfeng, Salam IBRAHIM a Saeed HAYEK. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. *Probiotics*. InTech, 2012, 2012-10-03. DOI: 10.5772/50121. ISBN 978-953-51-0776-7.
- [51] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [52] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
- [53] KANKAINEN, M., L. PAULIN, S. TYNKKYNNEN, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106(40), 17193-17198. DOI: 10.1073/pnas.0908876106. ISSN 0027-8424.
- [54] REUNANEN, Justus, Ingemar VON OSSOWSKI, Antoni P. A. HENDRICKX, Airi PALVA a Willem M. DE VOS. Characterization of the SpaCBA Pilus Fibers in the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(7), 2337-2344. DOI: 10.1128/AEM.07047-11. ISSN 0099-2240.
- [55] NISHIYAMA, Keita, Koichi NAKAMATA, Shintaro UENO, et al. Adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* mucus-binding factor to mucin and extracellular matrix proteins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, 79(2), 271-279. DOI: 10.1080/09168451.2014.972325. ISSN 0916-8451.
- [56] KORT, Remco, Nieke WESTERIK, L. MARIELA SERRANO, et al. A novel consortium of *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus thermophilus* for increased access to functional fermented foods: period: October 1957-February 1964. *Microbial Cell Factories*. 2015, 1965, 14(1). DOI: 10.1186/s12934-015-0370-x. ISSN 1475-2859.
- [57] CRIBBY, Sarah, Michelle TAYLOR, Gregor REID, et al. Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics: period: October 1957-February 1964. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. InTech, 2008, 1965, 2008(1), 1-9. DOI: 10.1155/2008/256490. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 1687-708X.
- [58] ZBOŘIL, Vladimír. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0584-2.
- [59] BADET, C. a N. B. THEBAUD. Ecology of *Lactobacilli* in the Oral Cavity: A Review of Literature. *The Open Microbiology Journal*. 2008, 2(1), 38-48. DOI: 10.2174/1874285800802010038. ISSN 18742858.
- [60] ETZOLD, Sabrina a Nathalie JUGE. Structural insights into bacterial recognition of intestinal mucins. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014, 28(2-3), 23-31. DOI: 10.1016/j.sbi.2014.07.002. ISSN 0959440x.
- [61] DERRIEN, Muriel, Mark W.J. VAN PASSEL, Jeroen H.B. VAN DE BOVENKAMP, Raymond SCHIPPER, Willem DE VOS a Jan DEKKER. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 2014, 1(4), 254-268. DOI: 10.4161/gmic.1.4.12778. ISSN 1949-0976.

- [62] BANSIL, Rama, Bradley S. TURNER, Gregor REID, et al. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications: period: October 1957-February 1964. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. InTech, 2006, 1965, 11(2-3), 164-170. DOI: 10.1016/j.cocis.2005.11.001. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 13590294.
- [63] BERGSTROM, K. S. B., L. XIA, Devon KAVANAUGH a Nathalie JUGE. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Frontiers in Genetics*. 2015, 6(19-20). DOI: 10.1093/glycob/cwt045. ISBN 10.1093/glycob/cwt045. ISSN 1664-8021.
- [64] TAILFORD, Louise E., Emmanuelle H. CROST, Devon KAVANAUGH, et al. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome: period: October 1957-February 1964. *Frontiers in Genetics*. InTech, 2015, 1965, 6(2-3). DOI: 10.3389/fgene.2015.00081. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 1664-8021.
- [65] O'TOOLE, Paul W., Jakki C. COONEY, Lisa MURPHY, et al. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota: correlation with in vivo findings. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2008, 2008(2), 1-9. DOI: 10.1155/2008/175285. ISSN 1687-708X.
- [66] OHLAND, Christina L. a Wallace K. MACNAUGHTON. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010, 298(6), G807-G819. DOI: 10.1152/ajpgi.00243.2009. ISSN 0193-1857.
- [67] DUNNE, Colum, Liam O'MAHONY, Lisa MURPHY, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, 73(2), 386s-392s. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.386s. ISSN 0002-9165.
- [68] BLUM, S, R RENIERO, E.J SCHIFFRIN, et al. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Frontiers in Genetics*. InTech, 1999, 1965, 10(12), 405-410. DOI: 10.1016/S0924-2244(00)00028-5. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 09242244.
- [69] JUGE, Nathalie, Jakki C. COONEY, Lisa MURPHY, et al. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus: correlation with in vivo findings. *Trends in Microbiology*. 2012, 1978, 20(1), 30-39. DOI: 10.1016/j.tim.2011.10.001. ISSN 0966842X.
- [70] VAN TASSELL, Maxwell L., Michael J. MILLER, Benoit FOLIGNA©, Voula ALEXANDRAKI, Maria KAZOU, Bruno POT a Effie TSAKALIDOU. Lactobacillus Adhesion to Mucus: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6(3). DOI: 10.3390/nu3050613. ISBN 10.3390/nu3050613. ISSN 1664-302X.
- [71] THOMAS, Carissa M., James VERSALOVIC, Lisa MURPHY, et al. Probiotics-host communication: correlation with in vivo findings. *Gut Microbes*. 2014, 1978, 1(3), 148-163. DOI: 10.4161/gmic.1.3.11712. ISSN 1949-0976.
- [72] DALIRI, Eric Banan-Mwine a Byong H. LEE. New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*. 2015, 4(2), 56-65. DOI: 10.1016/j.fshw.2015.06.002. ISSN 22134530.

- [73] Probiotika a prebiotika - renesance terapeutického principu. *Postgraduální medicína* [online]. 6. 12. 2005. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/probiotika-a-prebiotika-renesance-terapeutickeho-principu-169639>.
- [74] POCHAPIN, M. The effect of probiotics on clostridium difficile diarrhea. *The American Journal of Gastroenterology*. 2000, 95(1), S11-S13. DOI: 10.1016/S0002-9270(99)00809-6. ISSN 00029270.
- [75] DE VRESE, Michael a B. OFFICK. Probiotics and Prebiotics. *Bioactive Foods in Promoting Health*. Elsevier, 2010, 2010, 95(1), 205-227. DOI: 10.1016/B978-0-12-374938-3.00014-1. ISBN 9780123749383. ISSN 00029270.
- [76] FRÍČ, P.: Probiotika a prebiotika – renesance terapeutického principu. I. Teorie a experimentální doklady. *Postgrad medicína 2005* [online]. 7: 472–477. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/probiotika-a-prebiotika-renesance-terapeutickeho-principu-i-teor-168653>.
- [77] LEE, Yuan Kun. What could probiotic do for us? *Food Science and Human Wellness*. 2014, 3(2), 47-50. DOI: 10.1016/j.fshw.2014.06.001. ISSN 22134530.
- [78] DONLAN, R. M. a J. W. COSTERTON. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, 15(2), 167-193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. ISSN 0893-8512.
- [79] MACFARLANE, S. a J.F. DILLON. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102(5), 1187-1196. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03287.x. ISSN 1364-5072.
- [80] SALAS-JARA, María, Alejandra ILABACA, Marco VEGA, Apolinaria GARCÍA a Åsa LJUNGH. Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms*. 2016, 4(4), 35-. DOI: 10.3390/microorganisms4030035. ISBN 10.1007/s12010-013-0596-1. ISSN 2076-2607.
- [81] RIVAS, Mariella a Carlos RIQUELME. Probiotic Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Probiotics*. InTech, 2012, 2012-10-03, 15(2), 167-193. DOI: 10.5772/50124. ISBN 978-953-51-0776-7. ISSN 0893-8512.
- [82] TOYOFUKU, Masanori, Tomohiro INABA, Tatsunori KIYOKAWA, et al. Environmental factors that shape biofilm formation: need for validation and refinement. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. InTech, 2015, 1965, 80(1), 7-12. DOI: 10.1080/09168451.2015.1058701. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 0916-8451.
- [83] AMBALAM, Padma, Kanthi Kiran KONDEPUDI, Ingrid NILSSON, et al. Bile Enhances Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm Formation of Bifidobacteria: need for validation and refinement. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. InTech, 2014, 1965, 172(4), 1970-1981. DOI: 10.1007/s12010-013-0596-1. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 0273-2289.
- [84] PAPADIMITRIOU, Konstantinos, Georgia ZOUMPOPOULOU, Benoit FOLIGNAË, Voula ALEXANDRAKI, Maria KAZOU, Bruno POT a Effie TSAKALIDOU. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic

- and omics approaches. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6(3). DOI: 10.3389/fmicb.2015.00058. ISSN 1664-302X.
- [85] HORGAN, Richard P a Louise C KENNY. □ 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. InTech, 2011, 1965, 13(3), 189-195. DOI: 10.1576/toag.13.3.189.27672. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 14672561.
- [86] FERREIRA, CELIA LUCIA, ŁUKASZ GRZEŚKOWIAK, MARIA CARMEN COLLADO, SEPPO SALMINEN, Maria KAZOU, Bruno POT a Effie TSAKALIDOU. In Vitro Evaluation of Lactobacillus gasseri Strains of Infant Origin on Adhesion and Aggregation of Specific Pathogens: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Journal of Food Protection*. 2011, 74(9), 1482-1487. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-074. ISBN 10.3390/nu3050613. ISSN 0362-028X.
- [87] LAPARRA, J.M., Y. SANZ, MARIA CARMEN COLLADO, SEPPO SALMINEN, Maria KAZOU, Bruno POT a Effie TSAKALIDOU. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Letters in Applied Microbiology*. 2009, 49(6), 695-701. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02729.x. ISBN 10.3390/nu3050613. ISSN 02668254.
- [88] APOSTOLOU, Effie, Pirkka V. KIRJAVAINEN, Maija SAXELIN, et al. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia?. *Journal of Food Protection*. InTech, 2001, 1965, 31(1), 35-39. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2001.tb01583.x. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 09288244.
- [89] KINOSHITA, H., H. UCHIDA, Y. KAWAI, et al. Cell surface Lactobacillus plantarum LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin: a potential risk for bacteremia?. *Journal of Applied Microbiology*. InTech, 2008, 1965, 104(6), 1667-1674. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03679.x. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 1364-5072.
- [90] SHI, Lei, Reza ARDEHALI, Karin D CALDWELL a Paul VALINT. Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2000, 17(4), 229-239. DOI: 10.1016/S0927-7765(99)00121-6. ISSN 09277765.
- [91] ROSENBERG, M. and R. J. DOYLE. Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1990, 1-37.
- [92] CLAUDIA OTERO, María, Virginia S. OCAÑA, María ELENA NADER-MACÍAS, et al. Bacterial Surface Characteristics Applied to Selection of Probiotic Microorganisms: a potential risk for bacteremia?. *Public Health Microbiology*. New Jersey: Humana Press, 2004, 1996, 31(1), 435-440. Advances in Experimental Medicine and Biology. DOI: 10.1385/1-59259-766-1:435. ISBN 1-59259-766-1. ISSN 09288244.
- [93] How to dissolve mucin. ResearchGate [online]. 2013. Dostupné z: https://www.researchgate.net/post/How_to_dissolve_mucin2.

- [94] MUCIN from Bovine Submaxillary Gland. MP Biomedicals [online]. Dostupné z: <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02155742&country=56>.
- [95] SUNOQROT, Suhair, Lina HASAN, Aya ALSADI, Rania HAMED a Ola TARAWNEH. Interactions of mussel-inspired polymeric nanoparticles with gastric mucin: Implications for gastro-retentive drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, 156, 1-8. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.005. ISSN 09277765.
- [96] NISHIYAMA, Keita, Makoto SUGIYAMA a Takao MUKAI. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms*. 2016, 4(3), 34. DOI: 10.3390/microorganisms4030034. ISSN 2076-2607.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

7.1 Seznam použitých zkratek

BAC	<i>Bacillus coagulans</i>
BATH	bakteriální adheze k uhlovodíkům
BB	<i>Bifidobacterium breve</i>
BMK	bakterie mléčného kvašení
CAM	měření kontaktních úhlů
CCM	Česká sbírka mikroorganismů masarykovy univerzity v Brně
CFU	jednotka tvořící kolonie
DC	dendritické buňky
dH ₂ O	destilovaná voda
DLS	dynamický rozptyl světla
ELS	elektroforetický rozptyl světla
EPS	extracelulární polysacharidy
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FOS	frukto-oligosacharidy
FST	zvířecí test nuceného plavání
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GAPDH	glyceralaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GIT	gastrointestinální trakt
GlcNAc	N-acetylglukosamin
GOS	galakto-oligosacharidy
GRAS	všeobecně považované za bezpečné
HA	hemaglutinace
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
HPA	hypotalamus-hypofýza-nadledvina
IBS	syntrom dráždivého střeva
IEC	intestinální epiteliální buňky
IEP	izoelektrický bod
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LC	<i>Lactobacillus casei</i>
LD	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
LP	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LR	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LZ	<i>Lactobacillus zeae</i>
MATH	mikrobiální adheze k uhlovodíkům
MBF	mucin-vázající faktor
MRS	man ragoza sharpe
MUB	mucin-vázající protein
NFκB	nukleární faktor kappa B
SAT	zkouška agregace soli

SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SPR	povrchová plasmová resonance
STP	serin, threonin a prolin doména
TTM	metoda extrakce buněk do kapalné fáze
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie
vdW	Van der Waalsovy interakce
VNTR	variabilní počet tandemových opakování
WHO	Světová zdravotnická organizace

7.2 Seznam použitých symbolů

Symbol	Význam symbolu	[jednotka]
a	adsorbované množství	[mol/kg]
A	absorbance	[-]
c	koncentrace	[mol/l]
d	vzdálenost povrchů	[m]
G	Gibbsova energie	[J]
I	iontová síla	[mol/l]
OD ₆₀₀	optická hustota	[-]
R	univerzální plynová konstanta	[J/K·mol]
T	teplota	[°C]
t	čas	[s]
γ	povrchové napětí	[N/m]
λ	vlnová délka	[nm]
Γ	relativní adsorpce	[mol/m ²]