



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TESTOVÁNÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ RODU LACTOBACILLUS PRODUKUJÍCÍCH BAKTERIOCINY

TESTING OF LACTIC ACID BACTERIA LACTOBACILLUS GENUS FOR BACTERIOCINS PRODUCTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Volecová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0986/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Veronika Volecová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Testování bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* produkujících bakteriociny

Zadání diplomové práce:

- Vypracování literární rešerše na téma
 - produkce bakteriocinů gram pozitivními mikroorganismy rodu *Lactobacillus*
 - využití těchto mikroorganismů v potravinářství
 - metody identifikace genů kódujících produkci bakteriocinů
- Průkaz přítomnosti genů pro produkci bakteriocinů u vybraných bakterií rodu *Lactobacillus*.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Veronika Volecová
Student(ka)

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Antimikrobiální látky, respektive bakteriociny jsou látky produkované probiotickými bakteriemi mléčného kvašení. Mají pozitivní vliv na gastrointestinální trakt člověka a nacházejí významné uplatnění v potravinářském, ale i farmaceutickém průmyslu.

Cílem diplomové práce byla molekulární identifikace bakterií mléčného kvašení do rodu *Lactobacillus* a jejich následné druhové zařazení pomocí metody PCR. Pomocí metody PCR byly testovány geny zodpovědné za produkci bakteriocinů. Pro potvrzení produkce bakteriocinů byla zvolena i mikrobiologická metoda, tzv. agarózový kapkový spot-test. Do předkládané práce byla zařazena i bioinformatická část pro posouzení specifčnosti a nespecifčnosti použitých primerů s využitím Primer-BLAST programu.

ABSTRACT

Antimicrobial substances, or bacteriocins are substances produced by probiotic lactic acid bacteria. They have a positive effect on the gastrointestinal tract of humans and are especially suitable for the food, but also the pharmaceutical industry.

The aim of the thesis was the molecular identification of lactic acid bacteria of the *Lactobacillus* genus, species and their subsequent inclusion PCR method. Using the PCR method were tested also genes responsible for the production of bacteriocins. To confirm the production of bacteriocins has been selected the microbiological method, agarose droplet spot-test. In the present study also included the bioinformatics part to assess the specificity and non-specificity of the primers using in Primer-BLAST program.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bakterie mléčného kvašení, rod *Lactobacillus*, antimikrobiální látky, bakteriociny, izolace DNA, PCR, agarózový kapkový spot-test, Primer-BLAST

KEYWORDS

Lactic acid bacteria, *Lactobacillus* genus, antimicrobial substances, bacteriocins, DNA isolation, PCR, agarose droplet spot-test, Primer-BLAST

VOLECOVÁ, V. *Testování bakterií mléčného kvašení rodu Lactobacillus produkujících bakteriociny*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 65 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární 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.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracovávání této diplomové práce.

V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině, která mě podporovala po čas mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Bakterie mléčného kvašení.....	8
2.2. Fyziologie bakterií.....	9
2.3. Fermentace	9
2.4. Rod <i>Lactobacillus</i>	10
2.5. Antimikrobiální látky produkované bakteriemi mléčného kvašení.....	13
2.5.1. Organické kyseliny	13
2.5.2. Peroxid vodíku	13
2.5.3. Oxid uhličitý	13
2.5.4. Bakteriociny	14
2.5.4.1. Klasifikace bakteriocinů	15
2.5.4.2. Využití bakteriocinů v potravinářském průmyslu	16
2.5.4.3. Rezistence mikroorganismů vůči bakteriocinům.....	18
2.6. Geny zodpovědné za produkci antimikrobiálních látek	19
2.7. Identifikace bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> a bakteriocinů.....	19
2.7.1. Polymerázová řetězová reakce.....	19
2.7.2. Agarózový kapkový spot-test.....	21
2.8. Bioinformatika	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1. Materiál	23
3.1.1. Testované bakteriální kmeny	23
3.1.2. Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly.....	23
3.1.3. Přístroje a pomůcky	23
3.1.4. Chemikálie	24
3.1.5. Roztoky	25
3.1.5.1. Roztoky pro izolaci bakteriální DNA.....	25
3.1.5.2. Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu.....	26
3.1.6. Komponenty pro PCR.....	26
3.2. Metody	26
3.2.1. Kultivace bakterií.....	26
3.2.2. Izolace bakteriální DNA	27
3.2.2.1. Lyze bakteriálních buněk.....	27
3.2.2.2. Fenolová extrakce bakteriální DNA	27

3.2.2.3. Srážení DNA ethanolem	28
3.2.3. Stanovení koncentrace bakteriální DNA pomocí přístroje NanoPhotometer	28
3.2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
3.2.5. Agarózová gelová elektroforéza	32
3.2.6. Agarový kapkový spot-test	33
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	34
4.1. Kultivace bakterií	34
4.2. Stanovení koncentrace bakteriální DNA	34
4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	35
4.3.1. Doména <i>Bacteria</i>	35
4.3.2. Rod <i>Lactobacillus</i>	37
4.3.3 Druh <i>Lactobacillus gasseri</i>	38
4.3.4. Druh <i>Lactobacillus plantarum</i>	40
4.3.5. Testování produkce bakteriocinů	41
4.3.5.1. Bakteriocin gassericin K7B	41
4.3.5.2. Bakteriocin gassericin K7A	43
4.3.5.3. Bakteriocin gassericin T	44
4.3.6. Detekce genetických determinantů gassericinu K7A a gassericinu K7B	46
4.3.6.1. Genetický determinant gassericinu K7A – komplementární, aktivní a imunitní protein	46
4.3.6.2. Genetický determinant gassericinu K7B – komplementární, aktivní a imunitní protein	50
4.4. Agarózový kapkový spot-test	54
4.5. Specifita primerů	56
5. ZÁVĚREČNÉ SHRNUTÍ	57
6. SEZNAM LITERATURY	59
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	63
8. PŘÍLOHA	64

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Bakterie mléčného kvašení jsou známy svou produkcí důležitých antimikrobiálních látek. Mezi tyto látky řadíme organické kyseliny (především kyselinu mléčnou), peroxid vodíku, oxid uhličitý a bakteriociny. Dohromady tyto látky tvoří celek, který působí inhibičně vůči řadě patogenních kmenů. Dříve se bakterie mléčného kvašení přidávaly pouze do mléčných výrobků, nyní je však na trhu mnoho jiných potravin a nápojů, kde se tyto prospěšné bakterie nacházejí.

Bakteriociny jsou látky bílkovinné povahy, které vykazují nejvyšší antimikrobiální účinky. Díky těmto zjištěným poznatkům, nacházejí bakteriociny uplatnění jak v potravinářském, tak i farmaceutickém průmyslu. Aplikací bakteriocinů do potravin, dochází k jejich konzervaci a již není nutné dalších chemických přísad a konzervantů. Svým působením se podílejí na prodloužení životnosti potravin, v důsledku inhibice růstu nežádoucích patogenních mikroorganismů, což má i pozitivní vliv na zdraví spotřebitele.

V posledních pár letech je řešena i otázka ohledně narůstající rezistence vůči antibiotikům a s tím související neschopnost inhibice některých patogenních mikroorganismů. Tento jev je způsobený nezodpovědným, ale i nesprávným užíváním antibiotik. A právě bakteriociny by mohly být určitou alternativou za antibiotika.

Cílem této práce je testování bakterií mléčného kvašení, respektive jejich genů, které jsou zodpovědné za produkci bakteriocinů. Dále jsou v práci shrnuty metody, které k testování byly využity a poznatky o současné aplikaci bakteriocinů v potravinářském průmyslu. Do práce byla začleněna i bioinformatická část, zabývající se specifičností a nespecifičností použitých primerů za využití Primer-BLAST programu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou bakterie, které se běžně vyskytují v gastrointestinálním traktu (GIT) lidského organismu. BMK jsou vhodnými probiotickými kandidáty, jelikož mohou mít zásadní vliv na aktivitu a složení střevní mikroflóry. BMK nejdříve obsadí místa ve střevě, která mohou být napadena koloniemi bakteriálních patogenů a následně začíná produkce bakteriocinů a dalších metabolitů. Pokud již došlo k poškození sliznice bakteriálními patogeny, hrají probiotika významnou roli v hojení sliznice a podporují funkci imunitního systému. Zahraniční literatura zmiňuje i fakt, že BMK vykazují znaky, jako je tolerance vůči nízkému pH, trávicím enzymům a žluči (Ramesh a Mukherjee 2015). BMK jsou považovány za bezpečné, proto dostaly označení zkratkou GRAS (Generally Recognized As Safe) (Parada et al. 2007).

Tradičně byly bakterie mléčného kvašení klasifikovány na základě fenotypových vlastností (například morfologie, způsob fermentace glukózy, růstu při různých teplotách, konfigurace kyseliny mléčné a fermentace různých substrátů). Avšak studie provedená na základě srovnávací sekvenční analýzy 16S ribozomální RNA prokázala, že taxony generované na základě fenotypových rysů neodpovídají navrženému taxonomickému rozdělení. Proto jsou některé druhy BMK těžko rozeznatelné. Toto tvrzení platí zejména pro druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei*. V důsledku tohoto zjištění se v současné době využívá moderních molekulárních metod, včetně polymerázové řetězové reakce (PCR) a jiných genotypových metod, které jsou důležité právě pro identifikaci, popřípadě i k diferenciaci probiotických kmenů (Holzapfel et al. 2001).

Pro své fermentační vlastnosti jsou bakterie mléčného kvašení známy již z dřívějších dob, ale i v současné době našly uplatnění, jako například startovací kultury při výrobě fermentovaných mléčných výrobků (Ramesh a Mukherjee 2015). Hlavními produkty fermentace jsou organické kyseliny, především kyselina mléčná. Mezi nejznámější rody bakterií mléčného kvašení patří: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* z nichž některé jsou hojně využívány v potravinářském průmyslu a v podobě probiotik:

Lactococcus, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus* (Parada et al. 2007).

2.2. Fyziologie bakterií

V rámci výživy a zdroji energie bakterií, dochází k rozdělení do dvou skupin (Rosypal 2003):

1. Bakterie fototrofní – podle zdroje uhlíku rozděleny na:

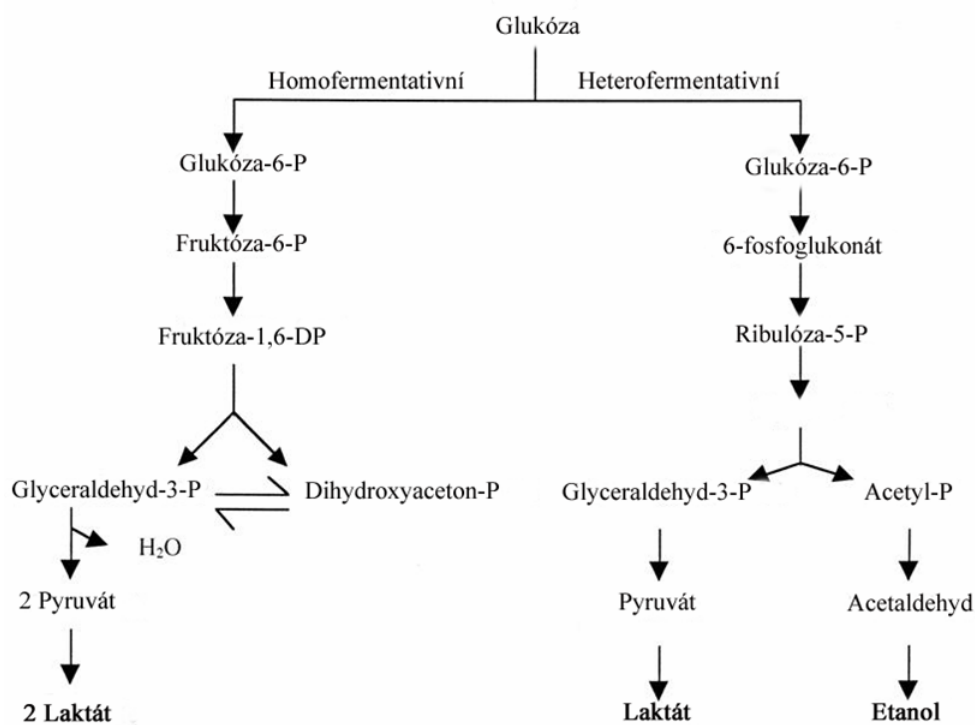
- a) fotoautotrofní či fotolitotrofní bakterie
- b) fotoheterotrofní či fotoorganotrofní bakterie

2. Bakterie chemotrofní – podle zdroje uhlíku rozděleny na:

- a) chemoautotrofní či chemolitotrofní bakterie
- b) chemoheterotrofní či chemoorganotrofní bakterie

2.3. Fermentace

Jedním z biotechnologických procesů, který využívají bakterie je fermentace. Důležité je tedy objasnit rozdíl mezi kvasným a fermentačním procesem. V české literatuře se setkáváme s definicí kvašení – proces, který probíhá za anaerobních podmínek (za nepřístupu kyslíku dochází k odbourávání sacharidů a vzniká oxid uhličitý a některé další metabolity). Mezi tyto procesy řadíme například alkoholové a mléčné kvašení, ale i máselné kvašení. Fermentační procesy jsou pak ty, které probíhají aerobně (za přístupu kyslíku) a dalším zdrojem, který mikroorganismy využívají je uhlíkatý zdroj. Podstatou fermentace jsou procesy, které probíhají v živých organismech (mikroorganismy) pomocí enzymů. Tyto enzymy jsou součástí buďto jednoduchých nebo složitých metabolických soustav (Kadlec et al. 2012).



Obr. č. 1: Schéma fermentace glukózy u bakterií mléčného kvašení (upraveno dle Caplice & Fitzgerald 1999)

2.4. Rod *Lactobacillus*

Fylogeneze (Bernardeau 2006):

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Lactobacillales*

Čeleď: *Lactobacillaceae*

Rod: *Lactobacillus*

U rodu *Lactobacillus* bylo na počátku roku 2013 platně pojmenováno 167 druhů bakterií. Rod je znám především svoji heterogenitou (morfologie, pohyblivost, fermentační schopnosti, nutriční požadavky a tolerance vůči kyslíku). Bakterie jsou řazeny mezi gram-pozitivní, fakultativně anaerobní či mikroaerofilní, kataláza negativní mikroorganismy s málokdy pohyblivými peritrichálními bičíky (Felis & Pot 2014; Turková 2014).

Bakterie rodu *Lactobacillus* se nachází v místech bohatých na sacharidy. Vyskytují se jak v lidském a zvířecím těle, tak v rostlinných částech. Dále to mohou být stanoviště čističek odpadních vod nebo zkažené potraviny. V lidském těle běžně osídlují dutinu ústní, tenké a tlusté střevo a vaginu (Bernardeau et al. 2008).

Z morfologického hlediska se jedná o pravidelné nesporující tyčinky preferující komplexní bohatá média (Turková 2014). Hodnota pH pro optimální růst se pohybuje v rozmezí okolo 4 až 8 a optimální teplota pro růst je 2-53 °C, avšak všechny rozsahy jsou většinou druhově specifické (Felis & Pot 2014).

Na základě výsledných produktů fermentace je možné bakterie z rodu *Lactobacillus* rozdělit do následujících skupin (Sedláček 2007):

1. obligátně homofermentativní

hexózy – fermentace probíhá výhradně na konečný produkt kyselinu mléčnou

2. fakultativně heterofermentativní

hexózy – fermentace za vzniku kyseliny mléčné

– nebo směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a ethanolu

pentózy – fermentace za vzniku kyseliny mléčné a octové

3. obligátně heterofermentativní

hexózy – fermentace za vzniku kyseliny mléčné a octové nebo ethanolu a CO₂

pentózy – fermentace za vzniku kyseliny mléčné a octové

Tabulka č. 1: Rozdělení jednotlivých skupin rodu *Lactobacillus*, na základě produktů fermentace cukrů
(upraveno dle Görner & Valík 2004)

Obligátně homofermentativní	Fakultativně heterofermentativní	Obligátně heterofermentativní
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lb. agilis</i>	<i>Lb. buchneri</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. collinoides</i>
<i>Lb. aviarius</i>	<i>Lb. bifementas</i>	<i>Lb. fermentum</i>
subsp. <i>araffinosus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fructivorans</i>
subsp. <i>aviarius</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. fructosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	subsp. <i>coryniformis</i>	<i>Lb. hilgardii</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	subsp. <i>torquens</i>	<i>Lb. kefir</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. malefermentas</i>
subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. graminis</i>	<i>Lb. oris</i>
subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. hamsteri</i>	<i>Lb. panis</i>
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. homohiochii</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>Lb. intestinalis</i>	<i>Lb. parakefir</i>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lb. murinus</i>	<i>Lb. pontis</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. rauteri</i>
<i>Lb. jensenii</i>	subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. sanfrancisco</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	subsp. <i>tolerans</i>	<i>Lb. suebicus</i>
<i>Lb. kefiranofaciens</i>	<i>Lb. paraplantarum</i>	<i>Lb. vaccinofermentus</i>
<i>Lb. kefirgranum</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. vaginalis</i>
<i>Lb. mali</i>	<i>Lb. plantarum</i>	
<i>Lb. raminis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	
subsp. <i>salivarius</i>		
subsp. <i>salicinus</i>		
<i>Lb. sharpeae</i>		

2.5. Antimikrobiální látky produkované bakteriemi mléčného kvašení

2.5.1. Organické kyseliny

Jak již bylo zmíněno výše, fermentací cukrů bakteriemi mléčného kvašení, vznikají důležité organické kyseliny. V nejhojnějším množství jde pak o kyselinu mléčnou. Produkce těchto kyselin vede k snížení pH. Proces snížení pH je důležitý například při výrobě sýrů, jelikož podporuje činnost enzymů. U dalších mlékárenských výrobků kyselina mléčná a další kyseliny ovlivňují chuť, vůni a konzistenci těchto výrobků. Navíc snížení pH prostředí zcela potlačuje růst nežádoucích mikroorganismů vlivem permeabilizace vnější membrány (Ibrahim et al. 2008).

2.5.2. Peroxid vodíku

Toxické kyslíkové metabolity, mezi které patří například produkce peroxidu vodíku, vykazují ve spojení s laktoperoxidázou-laktátem bakteriocidní účinky na většinu patogenů (Kaur et al. 2002).

Mnohé studie potvrzují, že vhodné pH a složení mikroflóry ve vagině ženy, snižují riziko vzniku bakteriálních vaginóz. Je to dáno právě toxicitou peroxidu vodíku, jelikož má bakteriocidní účinky na organismy, které neprodukují (nebo jen velmi málo) enzymy štěpící H_2O_2 (například katalázy, NADH peroxidázy) (Eschenbach et al. 1989; Hertzberger et al. 2014).

Peroxid vodíku vzniká v přítomnosti kyslíku a je prekurzorem některých volných radikálů (superoxidového O_2^- a hydroxylového OH^- radikálu). Volné radikály jsou označovány zkratkou ROS (reactive oxygen species) a je známo, že narušují buněčné membrány a ničí DNA či RNA (Hertzberger et al. 2014).

2.5.3. Oxid uhličitý

Již několik studií se zaměřilo na testování oxidu uhličitého, jako možného inhibitora patogenních organismů. Při nižší teplotě působí oxid uhličitý spolu s nisinem a chloridem sodným bakteriocidně na možné patogeny. Bakteriocidní účinek se pak dále zvyšuje za sníženého tlaku a ve vakuu a při systematickém zvyšování koncentrace NaCl. Díky těmto skutečnostem se oxid uhličitý začíná využívat v potravinářském průmyslu k balení potravin (Nilsson et al. 1997).

2.5.4. Bakteriociny

Bakteriociny se řadí mezi antimikrobiální látky bakteriálního původu. Jde o produkty ribozomální syntézy, které jsou peptidové nebo bílkovinné povahy a účinně působí proti bakteriálním patogenům. Jsou produkovány jak gram-pozitivními, tak i gram-negativními bakteriemi s bakteriostatickými či bakteriocidními účinky (Singleton & Sainsbury 2006).

Tyto peptidy jsou považovány za přirozené biologické konzervační látky, a proto se jejich potenciálu využívá jak v potravinářském průmyslu, tak i ve farmaceutickém průmyslu (Arqués et al. 2015). Bakteriociny jsou inherentně tolerantní k vysokým teplotám a svoji aktivitu si uchovávají i v širokém rozsahu hodnot pH. Tyto antimikrobiální peptidy jsou bezbarvé, bez zápachu a bez chuti, což zvyšuje jejich potenciální užitečnost (Perez et al. 2014).

V důsledku nesprávného užívání antibiotik, narůstá v posledních letech bakteriální rezistence vůči antibiotikům, což způsobuje nemalé problémy jak v oblastech mikrobiologie, tak i v potravinářském průmyslu. Proto vznikají obavy z neschopnosti zabránění inhibice některých patogenních kmenů antibiotickými léčivy (Parada et al. 2007). Problém nastává i u hospodářských zvířat, která jsou očkována antibiotiky. V roce 1997 Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučila konec používání antibiotik v chovu hospodářských zvířat, jelikož zneužíváním těchto látek mohou nastat zdravotní problémy, které se ještě v současné době dají léčit antibiotiky, ale za pár let už tomu může být jinak (Walker et al. 2005). Díky těmto varovným signálům se do popředí dostává právě studium bakteriocinů, jako určitá alternativa za antibiotika, která by našla uplatnění v medicíně, mikrobiologii, veterinářství a i v potravinářství (Parada et al. 2007).

Bakteriociny se od většiny terapeutických antibiotik liší v bílkovinné povaze látky. Díky tomu jsou rychle štěpeny proteázami v lidském zažívacím traktu. Jsou syntetizovány ribozomálně a tato skutečnost vytváří pole působnosti pro možnost zlepšení jejich vlastností za účelem zvýšení jejich aktivity.

Rozdíly mezi bakteriociny produkované BMK a tradičně užívanými antibiotiky jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Rozdíly mezi bakteriociny a antibiotiky (upraveno dle Perez et al. 2014)

	Bakteriociny	Antibiotika
Použití	potravinářství/klinické obory	klinické obory
Syntéza	ribozomální	produkty sekundárního metabolismu
Účinné množství	nM - μ M	μ M - mM
Proteolytická rozložitelnost	vysoká	střední až žádná
Teplotní stabilita	vysoká	nízká
Aktivita ve škále pH	široká	úzká
Barva/chuť/ zápach	ne	ano
Mechanismus rozvoje rezistence	přizpůsobení ve složení buněčné membrány	deaktivace aktivní sloučeniny
Způsob účinku	inhibice syntézy buněčné stěny	inhibice syntézy buněčné stěny
	zabránění vytvoření pórů v cytoplazmatické membráně	porucha funkce cytoplazmatické membrány
		inhibice syntézy bílkovin
		inhibice syntézy nukleových kyselin
Toxicita na eukaryotické buňky	ne	ano

2.5.4.1. Klasifikace bakteriocinů

Je známo, že více než 99 % bakterií je schopno produkovat alespoň jeden z druhů bakteriocinů, které ještě ani nebyly identifikovány (Yang et al. 2014).

První byl objeven v roce 1928 nisin A, a od té doby byly identifikovány další rozmanité druhy bakteriocinů detekovaných u bakterií mléčného kvašení. V současnosti se nejvíce setkáváme s rozdělením bakteriocinů do čtyř hlavních tříd, které mají ještě své další podtřídy. V některých zahraničních člancích či literaturách je členění do tříd odlišné. Například Todorov (2009) uvádí tři hlavní třídy, z nichž každá má svoji

podtřídu. U Pascual et al. (2008) je pak členění až do pěti hlavních tříd. Můžeme se však setkat i s novými návrhy klasifikace, díky jejich rozrůstajícímu se množství (Sonomoto & Yokota 2011).

Následující odstavce budou zaměřeny především na první dvě hlavní skupiny, jelikož na ty se nejvíce zaměřují studia a výzkum (Sonomoto & Yokota 2011).

I. třída – Lanthibiotika (< 5 kDa)

Do první třídy spadá již zmíněný nisin A. Jedná se o malé peptidy složené z 19 až 38 AK. Tato třída je charakterizována přítomností aminokyselin lanthioninu a β -methyllanthioninu, které jsou posttranslačně upraveny. Na patogenní bakterie působí modifikací pórů v cytolazmatické membráně či inhibicí specifických enzymů (Parada et al. 2007; Sonomoto & Yokota 2011).

II. třída – teplotně stabilní (< 10 kDa)

Malé peptidy, rezistentní k teplotě nad 100°C, nikdy neobsahují lanthionin (neobsahují tedy žádné modifikované aminokyseliny). Druhá třída je ještě dále rozdělena na následující podtřídy:

IIa – bakteriociny skládající se ze dvou domén: N- a C-terminální doména

IIb – dvoupeptidové bakteriociny (5-10 kDa), teplotně stabilní. Do této třídy spadají známé druhy bakteriocinů, a to gassericin K7A a K7B.

IIc – N- a C- konce jsou kovalentně spojeny → kruhová struktura

IId

III. třída – velké molekuly (>30 kDa)

Peptidy této skupiny jsou citlivé na teplo. U patogenních bakterií vyvolávají jejich lýzy a tím dochází k jejich usmrcení. Zástupci jsou pak helvecin J, laktacin B.

2.5.4.2. Využití bakteriocinů v potravinářském průmyslu

V dnešní době je preferována hlavně bezpečnost a nezávadnost potravin. Avšak mnoho chemických přísad, které se přidávají do potravin, mohou způsobovat zažívací potíže, v extrémních případech až toxické stavy. Proto se staly populární právě potraviny bez těchto konzervantů. Bohužel je však nutno zmínit fakt, že velké procento potravin obsahuje konzervační látky, které jsou připraveny chemickou syntézou. Dlouhodobá konzumace těchto potravin pak může mít negativní vliv na lidské zdraví,

protože dochází ke snižování počtu bakterií přirozeně se vyskytujících v trávicím traktu. Tohle vše by měly ale změnit bakteriociny, které jsou považované za bezpečné (proto jsou označovány zkratkou GRAS – Generally Recognized As Safe) (Parada et al. 2007; Yang et al. 2014). Například nisin a pediocin PA-1 jsou jedinými používanými přírodními konzervanty v potravinářském průmyslu a jejich přidávání bylo schváleno po celém světě (Balciunas et al. 2013; Zacharof & Lovitt 2012). Uplatňují se jako konzervační látky u zeleniny, mléčných výrobků, sýrů, masa a dalších potravinářských výrobků, neboť zabraňují kontaminaci mikroorganismů při výrobních procesech (Yang et al. 2014).

Jak již bylo zmíněno v předešlých odstavcích, jednou z největších výhod bakteriocinů je odolnost vůči vysokým teplotám a širokému rozpětí hodnot pH (Perez et al. 2014). A právě díky těmto zjištěným faktům, získávají hlavně význam v potravinářském průmyslu. Studie si kladou za cíl především využití bakteriocinů při prodlužování trvanlivosti potravin. Dále je to pak schopnost bakteriostatických či bakteriocidních účinků pro udržení populace a s tím související i snížení počtu soutěžících o získávání živin a prostoru v prostředí (Yang et al. 2014).

Aplikace bakteriocinů (upraveno dle Balciunas et al. 2013; Zacharof & Lovitt 2012):

- Jedním z nejzákladnějších způsobů je přidání bakteriocinu přímo k potravinářskému výrobku. Problém však nastává ve chvíli, kdy je k potravine přidávána i jiná bakteriální kultura, důležitá pro fermentaci potraviny. Mezi kulturou produkující bakteriociny a kulturou pro fermentaci tak vzniká nesnášenlivost.
- Bakteriociny mohou být vázány na nosič, který slouží jako rezervoár a difuzér. Navíc nosič chrání bakteriociny před jejich inaktivací.
- Bakteriociny nachází uplatnění i v kombinaci s jinými technologiemi – nejdříve dojde k narušení buněčné membrány patogenní bakteriální buňky. Takto poškozená buňka, je pak náchylnější k účinkům bakteriocinů, a tím nedochází ke kontaminaci potraviny.
- U netepelných způsobů přípravy potravin se volí bakteriociny jako doplněk ochrany k zabránění přístupu patogenních baktérií.
- Spolu s octanem sodným nebo laktátem sodným tvoří bakteriociny dvojici, která výrazně zvyšuje inaktivaci nežádoucích patogenních baktérií.

- Důležitou stránkou aplikace bakteriocinů je jejich využití v tzv. bioaktivním balení (potravinářský výrobek je chráněn před nečistoty z vnějšího prostředí). Při balení potravin se vkládá do vnitřního prostoru obalu sáček s bakteriociny, které se postupně uvolňují během skladování potravin (postupné uvolňování bakteriocinů je účinnější, než kdyby se volila metoda nástřiku potravin). Dále se mohou bakteriociny přidávat přímo k polymeru obalu – nisin se tak začleňuje například do biodegradovatelných filmů bílkovin sóji či kukuřičného zeinu. Nebo začlenění probíhá prostřednictvím tepelného lisu. Bakteriociny mohou také být ve formě absorbentů na povrchu polymerů. Příkladem jsou polyethylenové fólie z methylcelulózových vláken s nisinem používající se jako obalový materiál pro drůbeží maso.

2.5.4.3. Rezistence mikroorganismů vůči bakteriocinům

Rezistence na bakteriociny může být způsobena hned několika faktory. Rezistence vzniká v důsledku změn v plazmatické membráně a v buněčné stěně, jakými jsou například elektrický potenciál, tekutost, lipidové složení membrány a tloušťka buněčné stěny. V některých případech jde pak o kombinaci všech těchto faktorů (Balciunas et al. 2013).

Mechanismus rezistence vůči antibiotikům a bakteriocinům, je různý. Buňky rezistentní vůči antibiotikům jsou citlivé na nisin a naopak, buňky rezistentní na nisin jsou citlivé proti antibiotikům (Balciunas et al. 2013). Naghmouchi et al. (2012) popisují synergický účinek bakteriocinů s antibiotiky. Tento účinek byl popsán u *Pseudomonas fluorescens*, kdy z 90 % byla účinná kombinace bakteriocinů z I. třídy a IIa. podtřídy s antibiotiky. Z 60 % pak byla účinná kombinace kolistinu s antibiotiky. Díky tomuto zjištění je v budoucnu možné zahrnout antimikrobiální peptidy do léčebných preparátů a tím snížit užívání antibiotik. Zároveň by se mohlo zamezit vzniku bakteriální rezistence vůči antibiotikům.

Mechanismus rezistence vůči nisinu nebyl dosud plně popsán. Podle Abee (1995) by za vznikem rezistence nisinu u *Listeria monocytogenes* mohlo stát složení mastných kyselin v buněčných membránách, což snižuje koncentraci fosfolipidů a nedochází k tvorbě póru v membránách.

2.6. Geny zodpovědné za produkci antimikrobiálních látek

Gassericin K7A a gassericin K7B patří mezi první popsané bakteriociny, získané z *Lactobacillus gasseri* K7, izolovaného z výkalů plně kojených dětí. U těchto bakteriocinů jsou geny pro produkci bakteriocinů detekovány na chromozomu. Genový klastr pro gassericin K7A je složen ze tří otevřených čtecích rámců kódujících komplementární, aktivní a imunitní peptid a vše je poskládané v jednu transkripční jednotku. U gassericinu K7B má genový klastr o tři otevřené čtecí rámce navíc – domnělý ABC transportér, přídatný a hypotetický protein (Treven et al. 2013). Gen pro produkci imunitního proteinu kóduje protein, který chrání producenta bakteriocinu před jeho účinkem (Todorov 2009).

2.7. Identifikace bakterií rodu *Lactobacillus* a bakteriocinů

2.7.1. Polymerázová řetězová reakce

Poprvé byla polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction – PCR) nastíněná v roce 1971. Uvedena pak do praxe byla až v roce 1985 biochemikem Kary B. Mullisem a o 8 let později mu za tuto metodu byla udělena Nobelova cena za chemii (Sambrook & Russell 2001; Šmarda 2005).

Jedná se o rychlou, jednoduchou a flexibilní metodu, jejímž principem je syntéza nových specifických úseků DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Tyto úseky jsou vybírány příslušnými primery (krátké syntetické oligonukleotidy), které se následně vážou na denaturované úseky DNA (Sambrook & Russell 2001). PCR reakce probíhá v opakujících se cyklech, z nichž každý cyklus je složen ze tří pravidelně se střídajících kroků (Šmarda 2005):

Denaturace (94 °C) – dochází k rozrušení vodíkových můstků v dvouvláknové molekule DNA za vzniku jednovláknových řetězců. První cyklus bývá zpravidla prodloužen, aby byla zajištěná dostatečná denaturace dsDNA.

Annealing (30-65 °C) – připojení příslušných primerů k jednovláknovým řetězcům DNA.

Elongace (65-75 °C) – syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy. Využívá se termostabilních polymeráz (například *Taq* DNA-polymeráza), které jsou získávány z termofilních mikroorganismů. Takovým mikroorganismem může být *Thermus aquaticus* vyskytující se v teplých pramenech Yellowstonekého národního

parku. Schopnosti odolávat vysokým teplotám je využíváno právě v průběhu denaturace DNA. Syntéza nových řetězců probíhá ve směru 5' → 3', kde navazující se vlákno je komplementární k původnímu vláknu. Doba elongace bývá prodloužena, aby došlo k úplnému nesyntetizování nových dsDNA.

Složení reakční směsi pro PCR metodu (Španová & Rittich 2010):

Objem reakční směsi pro PCR metodu bývá obvykle 25-100 µl a obsahuje následující komponenty:

PCR voda – používá se pouze na doplnění požadovaného objemu PCR směsi.

PCR pufr – obsahuje navíc hořčnaté kationty Mg^{2+} , které vytváří optimální prostředí pro správnou funkčnost DNA-polymerázy. Standardní reakční pufr obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 – 8,8); 50 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$.

dNTP (3'-deoxynukleosid-5'-trifosfát) – jedná se o základní výstavbové složky pro syntézu nových řetězců DNA. Složka obsahuje ekvimolární množství jednotlivých nukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Pokud je přítomna vyšší koncentrace dNTP může docházet k vyvazování Mg^{2+} kationtů.

Primery – oligonukleotidy, složené z 18-30 nukleotidů. Látky syntetického původu, které jsou komplementární ke koncovým úsekům templátové DNA. Teplota tání primerů je v rozsahu 55-65 °C. V této složce reakční směsi je vhodný vyvážený poměr jednotlivých párů bází (A/T a G/C – 40-60 %) a navzájem by si neměly být komplementární.

DNA-polymeráza – katalyzuje syntézu nových řetězců DNA ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA templář.

DNA templát – používá se jako matrice pro syntézu nových řetězců DNA. Obsahuje cílová místa pro primery.

Při PCR analýze se vždy provádí tzv. pozitivní a negativní kontrola. Kontroly slouží jednak k ověření čistoty jednotlivých PCR komponent v reakční směsi, ale i k ověření samotné práce laboranta:

Pozitivní kontrola (PK) – obsahuje přídavek vzorku DNA, kde je jistá amplifikace specifického DNA produktu.

Negativní kontrola (NK) – vzorek DNA je v tomto případě nahrazen PCR vodou, a proto by nemělo docházet k amplifikaci.

2.7.2. Agarózový kapkový spot-test

Agarózový kapkový spot-test je mikrobiologická metoda sloužící k průkazu produkce bakteriocinů. V dnešní době se spíše ale přiklání k biotechnologickým metodám typu PCR, jelikož toto odvětví se neustále rozvíjí a také je méně časově náročné, na rozdíl od mikrobiologických metod. U agarózového kapkového spot-test je důležité hlídat kritické body, kterými jsou například teplota používaného média při přelívání Petriho misek. Dále je to samotná kultivace bakteriálních buněk a zamezení kontaminace příslušných médií.

Principem agarózového spot-testu je vyvolání stresu u testovaného bakteriálního kmene (kmen, u kterého je sledována produkce antimikrobiálních látek) a dochází tak k produkci antimikrobiálních látek. Stresovým faktorem je agarózové médium s nízkým obsahem glukózy. Testovaný bakteriální kmen je nakapán na takto připravené médium. Produkce bakteriocinů je potvrzena po přelítí testovaného kmene, kmenem tzv. indikátorovým (bakteriální kmen, jehož růst je inhibován vlivem produkce antimikrobiálních látek testovaného kmene), kdy se kolem spotů testovaného kmene vytvoří inhibiční zóna. Indikátorový kmen zde neroste a čím je zóna intenzivnější, tím je indikátorový kmen citlivější vůči antimikrobiálním látkám. Aplikací enzymů (například trypsin, proteináza K) k inhibičním zónám by mělo dojít k jejich zúžení v případě, že se jedná o mikrobiální látky proteinového původu.

2.8. Bioinformatika

Termín bioinformatika byl poprvé zaveden v roce 1991 a spojuje oblasti biologie, počítačových věd, informační techniky a matematiky. Její součástí je zobrazování, vyhledávání a modelování biologických dat. Prostřednictvím internetu a webových prohlížečů umožňuje rychlý přenos dat a tato data jsou dostupná pro několik tisíc lidí (Šmarda 2005).

K bioinformatické analýze nukleotidových sekvencí se nejvíce využívá programu Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Jeho algoritmus pracuje na základě porovnávání nukleotidových sekvencí se sekvencemi, které jsou již uloženy v genetických databázích (McGinnis & Madden 2004).

Jedním z kritických bodů primerů je jejich specifická. V ideálním případě by měla být dvojice primerů specifická pouze pro jeden cílový organismus. Vzhledem k tomu, že různé části chromozomů nebo transkriptů mohou sdílet některé podobnosti v nukleotidech, není pak neobvyklé, že pár primerů určený pro jeden cílový organismus se také váže i k jinému cílovému organismu. Primery se tak stávají nespecifickými (Ye et al. 2012).

Program Primer-BLAST pomáhá uživatelům navrhovat specifické primery pro danou nukleotidovou sekvenci. Uživatelé si buďto mohou navrhnout nové primery nebo ověřit specifickou již navržených primerů (Ye et al. 2012).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

3.1.1. Testované bakteriální kmeny

Tabulka č. 3: Seznam bakteriálních kmenů

RL 2	Původ: stolice plně kojeneč a zdravých dětí Izolát poskytl: Prof. Ing. V. Rada, CSc. Izolát přečistil: doc. RNDr. A. Španová, CSc.
RL 2P	
RL 22P	
RL 26P	
<i>L. sakei</i> – IM 398	IM Sbirka Institute of Dairy Science and Probiotics (University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Slovenia)
<i>L. sakei</i>	
<i>L. gasseri</i> K7	

3.1.2. Použité bakteriální kmeny pro pozitivní kontroly

Použité bakteriální kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů, CCM, Brno, Česká republika.

Bakterie *L. gasseri* K7 byly získána od prof. Ireny Rogelj, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovinsko.

- *L. gasseri* K7
- *L. plantarum* CCM 7039^T

3.1.3. Přístroje a pomůcky

- Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI
- Centrifuga miniSpin plus 14 500 ot · min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikropipeta Biohit Proline 1-5 ml (Proline, Helsinky, Finsko)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- NanoPhotometer (Implen, München, Německo)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- MiniInkubator Labnet (Labnet international Inc., New Jersey, USA)

- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, Velká Británie)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Transilluminátor TVR- 312A (Spectroline, Albany, USA)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Minicycler TM (BIO-RAD Lab., USA)
- Inkubační box UVC/T-AR, DNA/RNA, UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- Plastový materiál – špičky, zkumavky,...
- Další laboratorní vybavení

3.1.4. Chemikálie

- Agar (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Brno, ČR)
- Ethanol (Lachema, Brno, ČR)
- Ethidiumbromid (5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Lachema, Brno, ČR)
- MRS agar (Oxoid, Londýn, Velká Británie)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)

- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Polyethylenglykol (PEG) 6000 (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- RNáza A (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) (Amresco, Solon, USA)
- Tween 20
- Dále byly použity běžně dostupné chemikálie v kvalitě p.a.

3.1.5. *Roztoky*

3.1.5.1. *Roztoky pro izolaci bakteriální DNA*

Roztok A: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8); 5 mM EDTA (pH 8,0) roztok se připravuje sterilně ze zásobních roztoků (1 M Tris, pH 7,8, a 0,5 M EDTA, pH 8,0)

Roztok B: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8); 5 mM EDTA (pH 8,0); lysozym (3mg/ml); roztok se připravuje vždy čerstvý

Roztok C: předestilovaný fenol, jehož pH bylo upraveno pomocí 1M Tris-HCl na 7,8 (nasycený roztok v TE pufru)

CIZ: směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1.

TE pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8); 1 mM EDTA (pH 8,0); sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut

3M octan sodný (pH 5,2): 40,81 g trihydrátu octanu sodného rozpustit v 80 ml destilované vody. Upravit pH na 5,2 ledovou kyselinou octovou. Doplnit destilovanou vodou do 100 ml. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

20% SDS: 20 g SDS rozpustit v 80 ml destilované vody. Upravit pH na 7,0 několika kapkami koncentrované HCl. Doplnit destilovanou vodou do 100 ml. Nemusí se sterilizovat.

3.1.5.2. *Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu*

TBE pufr (5× koncentrovaný): Tris-base 54 g; kyselina boritá 27,5 g; 0,5 M EDTA (pH 8,0) 20 ml. Uvedená množství se smíchají a doplní do 1000 ml destilovanou vodou. Tento zásobní roztok se před použitím ředí 10× destilovanou vodou. Nesterilizuje se.

Agarózový gel pro gelovou elektroforézu:

- a) pro doménu *Bacteria* – **0,8%:** 0,8 g agarózy/100 ml 0,5× koncentrovaného TBE pufru
- b) pro rodovou a druhovou identifikaci – **1,5%:** 1,5 g agarózy/100 ml 0,5× koncentrovaného TBE pufru

3.1.6. *Komponenty pro PCR*

- Oligonukleotidové primery (Oligo-Biotech, Hradec Králové, ČR)
- DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- dNTP směs (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerázu 1.1 (10× koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- *Taq* DNA polymeráza 1.1 (1U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská L'upča, SR) – dále označována jako PCR voda

3.2. **Metody**

Jednotlivé upravené postupy práce probíhaly dle skript Španová a Rittich (2010) a dle návodů praktik z Molekulárních biotechnologií (nepublikováno).

3.2.1. *Kultivace bakterií*

1. Lyofilizáty bakteriálních kmenů rodu *Lactobacillus* byly naočkovány do 10 ml tekutého MRS média (de Mann, Rogosa, Sharpe) – Oxoid, Hampshire, Velká Británie.
2. Kultivace probíhala aerobně nebo anaerobně při 37°C v termostatu po dobu 24 až 48 hodin.

3. Narostlé bakteriální kultury byly přeočkovány do 10 ml tekutého MRS média 1% inokulem a kultivovány při 37°C po dobu 24 až 48 hodin.
4. Křížovým roztěrem na Petriho misky s MRS agarem byla ověřena čistota bakteriálních kultur a kultivace opět probíhala aerobně při 37°C po dobu 24 hodin.
5. Proběhla kontrola vzhledu (velikost, zbarvení, morfologie) kolonií a misky byly dále uchovávány.

3.2.2. Izolace bakteriální DNA

3.2.2.1. Lyze bakteriálních buněk

1. Přes noc narostlé bakteriální buněčné kultury v MRS médiu, byly centrifugovány (1 ml) při 14 000 ot/5min. Supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal dobře odkapat.
2. Sediment byl resuspendován v 1 ml roztoku A – nejdříve bylo přidáno 100 µl roztoku a suspenze byla dobře promíchána, poté se přidalo zbývajících 900 µl a suspenze byla opět dobře promíchána.
3. Suspenze byla centrifugována při 14 000 ot/5 min. Supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal dobře okapat. K sedimentu bylo přidáno 500 µl roztoku B, který obsahoval lysozym a sediment byl důkladně rozsuspendován.
4. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny a občas byly promíchány.
5. K suspenzi bylo přidáno 12,5 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml). Vše bylo důkladně promícháno.
6. Vzorky byly inkubovány při 55°C do druhého dne. Občas byly promíchány.
7. Následující den bylo k vzorkům přidáno 10 µl RNasy A (100 µl/ml). Směs se promíchala a nechala se inkubovat při 37°C po dobu 30 min.

Takto byly připraveny tzv. hrubé lyzáty bakteriálních buněk, ze kterých se izolovala bakteriální DNA.

3.2.2.2. Fenolová extrakce bakteriální DNA

1. K 500 µl hrubého lyzátu buněk byl přidán stejný objem roztoku C (předestilovaný fenol, hodnota pH 7,8). Jednotlivé Eppendorfovy zkumavky se směsí byly

kývavým pohybem opatrně promíchávány 4 min a následně centrifugovány při 14 000 ot/5 min.

2. Pomocí špičky s ustřiženým hrotem byla odebrána horní vodní fáze s DNA do čisté Eppendorfovy zkumavky (nesmí být odebrána proteinová vrstva).
3. Vodní fáze s DNA byla nejdříve doplněna na objem 500 μ l a následně bylo přidáno 700 μ l CIZ a směs byla opatrně promíchávána kývavým pohybem 4 minuty.
4. Směs byla centrifugována při 14 000 ot/5 min.
5. Vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky.

3.2.2.3. Srážení DNA ethanolem

1. Pomocí automatické pipety byl změřen objem vzorku DNA ve zkumavce a celkový objem byl doplněn do 400 μ l TE pufrem.
2. Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného (20 μ l) a vzorek byl promíchán.
3. Byl přidán 1 ml 96% etanolu, směs byla promíchána a nechala se 1 h vysrážet při -20°C .
4. Směs byla 15 minut centrifugována při 14 000 otáčkách, při teplotě 4°C . Supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal dobře okapat.
5. K sedimentu bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu. Směs byla centrifugována při 14 000 ot/10 min při teplotě 4°C .
6. Opatrně byl slit supernatant a sediment obsahující DNA byl usušen v exikátoru (10 - 15 min).
7. DNA byla rozpuštěna ve 100 μ l TE pufru a uskladněna při 4°C .

U takto připravené DNA byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA a provedena agarózová gelová elektroforéza.

3.2.3. Stanovení koncentrace bakteriální DNA pomocí přístroje NanoPhotometer

1. Vzorek izolované DNA rozpuštěné v TE pufru byl $10\times$ zředěn TE pufrem. Jako blank byl použit TE pufru, ve kterém byla bakteriální DNA rozpouštěna.
2. Byly odečteny hodnoty absorbance při 260 nm (absorpční maximum nukleových kyselin), 280 nm (absorpční maximum proteinů)
3. Čistota DNA byla stanovena z poměru hodnot absorbance A_{260}/A_{280} . Leží-li hodnota poměru absorbancí A_{260}/A_{280} mezi 1,8–2,0, lze DNA považovat za čistou. Přítomnost

RNA ve vzorku se projevila vzrůstem poměru absorbancí nad hodnotu 2,0. Přítomnost bílkovin se projevila poklesem pod hodnotu 1,8.

3.2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla využita při zařazování jednotlivých bakteriálních kmenů do domény *Bacteria*, rodu *Lactobacillus* a druhů *Lactobacillus gasseri*, *plantarum*, *casei/paracasei*. Po zařazení bakteriálních kmenů byla ještě dále použita na prokázání přítomnosti genů produkujících bakteriociny. Pro PCR byla izolovaná bakteriální DNA vyředěna na koncentraci 10 ng/μl.

Tabulka č. 4: Sekvence primerů, velikost produktů PCR a reference primerů použitých při identifikaci kmenů

PCR	Primery	Sekvence (5' → 3')	Produkt PCR [bp]	Reference
Doména <i>Bacteria</i>	Feub Reub	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	466	(Haarman a Knol 2006)
Rod <i>Lactobacillus</i>	LbLBA 1rev R16-1	CTCAAACTAAACAAAGTTTC CTTGACACACCGCCCGTCA	250	(Dubernet et al. 2002)
<i>L. gasseri</i> K7	Gas I Gas II	GAGTGCGAGAGCACTAAAG CTATTTCAAGTTGAGCCCCTCT	400, 200	(Walter et al. 2000)
<i>L. plantarum</i>	Lfpr Plan II	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT TTACCTAACGGTAAATGCGA	400, 200	

Tabulka č. 5: Složení směsi pro PCR a použité primery pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druhové zařazení

Komponenta pro PCR	Primery/[μl]			
	Doména <i>Bacteria</i>	Rod <i>Lactobacillus</i>	Druhy rodu <i>Lactobacillus</i>	
	Feub Reub	LbLMA-1rev R16-1	GasI GasII	Lfpr PlanII
Voda pro PCR	17,5	19,0	15,0	15,5
10x reakční pufr	2,5	2,5	2,05	2,5
dNTP směs (10mM)	1,0	0,5	1,0	1,0
MgCl₂ (25 mM)	-	-	2,5	2,0
primer 1	1,0	0,5	1,0	1,0
primer 2	1,0	0,5	1,0	1,0
Taq DNA polymeráza (1U/μl)	1,0	1,0	1,0	1,0
matrice DNA (10 ng/μl)	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabulka č. 6: Amplifikační programy pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druhové zařazení

	Doména <i>Bacteria</i> (Feub/Reub) rod <i>Lactobacillus</i> (LbLMA-1rev/R16-1)	<i>Lb. plantarum</i> (Lfpr/PlanII) <i>Lb. gasseri</i> (GasI/GasII)
1.	95°C/5 min	95°C/5 min
2.	95°C/30 s	95°C/30 s
3.	55°C/30 s	55°C/30 s
4.	72°C/30 s	72°C/1 min
5.	30x krok 2-4	30x krok 2-4
6.	72°C/5 min	72°C/5 min
7.	4°C/-	4°C/-

Tabulka č. 7: Sekvence primerů, velikost produktů PCR a reference primerů použitých pro detekci genů produkujících bakteriociny

PCR	Primery	Sekvence (5' → 3')	Produkt PCR [bp]	Reference
gassericin K7A	LFA 185 LFA 268	GTTGCAGGATCATGTG TGTTGCAGCTCCGTTA	84	(Canic a Rogelj 2003)
gassericin K7B	K7B c.f. F K7B c.f. R	TGGGAGAAATAATAATTGGGCTG TTTCCGAATCCACCAGTAGC	165	
gassericin T	gaT 950 gaT 1075	GGAGTAGGTGGAGCGACAGT TCCACCAGTAGCTGCCGTTA	126	(Kawai et al. 2000)

Tabulka č. 8: Složení směsi PCR pro detekci genů produkujících bakteriociny

Komponenta pro PCR	Primery [μl]		
	LFA 185 LFA 268	K7B c.f.F K7B c.f.R	gaT 950 gaT 1075
Voda pro PCR	9,8	9,8	8,7
10x reakční pufr	2	2	4,0*
dNTP směs (10mM)	2	2,0	2,0
MgCl₂ (25 mM)	1,2	1,2	1,2
primer 1	1	1,0	1,0
primer 2	1	1,0	1,0
Taq DNA polymeráza (1U/μl)	1,0	1,0	0,1*
matrice DNA (10 ng/μl)	2,0	2,0	2,0

*Pozn.: u vzorků byla použita LA polymeráza (5 U/μl) a k ní příslušný pufr

Tabulka č. 9: Amplifikační programy pro detekci genů produkujících bakteriociny

	Gassericin T	Gassericin K7B	Gassericin K7A
1.	95°C/5 min	95°C/5 min	95°C/5 min
2.	95°C/1 min	95°C/30 s	95°C/30 s
3.	58°C/30 s	56°C/30 s	55°C/30 s
4.	72°C/30 s	72°C/20 s	72°C/20 s
5.	35x krok 2-4	30x krok 2-4	30x krok 2-4
6.	72°C/5 min	72°C/5 min	72°C/5 min
7.	4°C/-	4°C/-	4°C/-

Tabulka č. 10: Sekvence primerů a velikost produktů PCR pro detekci genetického determinantu gassericinu K7A a gassericinu K7B (Treven et al. 2013)

PCR	Primery	Sekvence (5' → 3')	Produkt PCR [bp]
gassericin K7A komplementární protein	GasA_1F GasA_1R	TGCATGGAGAGGTGCACG CCAGCCCACACATTGTAAGTAT	118
gassericin K7A aktivní protein	GasA_2F GasA_2R	GGATCATGTGGTAAAGGTGCAGTA TCCACTAGCAGTTTGTAGAACCAAT	105
gassericin K7A imunitní protein	GasA_3F GasA_3R	CACCAATATAGTAGCTCTAATACAGACAC ATATTTTTGGATTATTTTTACCTGCATAGGC	106
gassericin K7B komplementární protein	GasB_3F GasB_3R	GAAATGCAGTTTGCAGTCCCT TTCTTATCTTTCCGAATCCACCAAGTAG	105
gassericin K7B aktivní protein	GasB_4F GasB_4R	GAATTAAGAAATGTAATGGGTGGAAACAAG TGGTCCGAATCCTCTGCACCAA	102
gassericin K7B imunitní protein	GasB_5F GasB_5R	TTGTAATTGGCCAATTTATGTTTTTGAAGT CCTATTACAAACGATATGGCCAAAATTAGT	116

Tabulka č. 11: Složení směsi PCR pro detekci genetického determinantu gassericinu K7A a gassericinu K7B

Komponenta pro PCR	determinant gassericinu K7A a K7B
voda pro PCR	17,5
10x reakční pufr	2,5
dNTP směs (10 mM)	1,0
primer 1	1,0
primer 2	1,0
LA polymeráza (5 U/μl)	1,0
matrice DNA (10 ng/μl)	1,0

Tabulka č. 12: Amplifikační programy pro detekci genetického determinantu gassericinů K7A a gassericinů K7B

	determinant gassericinů K7A a K7B
1.	95 °C/5min
2.	95 °C/30 s
3.	60 °C/30 s
4.	72 °C/40 s
5.	30x krok 2-4
6.	72 °C/10 min
7.	4 °C/-

3.2.5. Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza prokázala přítomnost a přibližnou koncentraci izolované bakteriální DNA. Pro přítomnost chromozomální DNA byl připraven 0,8% gel, pro přítomnost amplikonů (produktů PCR) byl použit 1,5% gel.

Postup práce:

1. Navážené množství agarózy bylo rozpuštěno v daném objemu 0,5× koncentrovaného TBE pufru. Směs byla následně důkladně rozvařena v mikrovlnné troubě.
2. Obsah baňky se nechal vychladnout na teplotu zhruba 60°C a poté byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem.
3. Gel se nechal přibližně 30 min tuhnout při laboratorní teplotě.
4. Před nanášením vzorků na gel byl opatrně vyjmut hřebínek.
5. K vzorkům byl před samotným nanášením na gel přimíchán nanášecí pufr v poměru 5 : 1.
6. Gel byl umístěn do elektroforetické vany v takové orientaci, aby záporně nabitá DNA putovala k anodě. Gel byl opatrně převrstven 0,5× koncentrovaným TBE puftrem, aby se zamezilo vyplavení vzorků z komůrek.
7. Elektroforéza byla spuštěna zapnutím zdroje nastaveného na 80 V/2 hod. Separace probíhala obvykle tak dlouho, dokud vzorky nedoputovaly do 2/3 agarózového gelu.
8. Po skončení elektroforézy byl gel barven v roztoku ethidiumbromidu (1 µg/ml) přibližně 30 min.
9. Obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru v UV světle (305 nm). Pro dokumentaci byly pořízené fotografie gelů.

3.2.6. Agarový kapkový spot-test

Agarový kapkový spot-test je jednou z dalších možností průkazu bakteriocinů u bakterií mléčného kvašení.

Postup práce:

1. Testované kmeny *Lactobacillus gasseri* K7, RL 2, RL 2P, RL 22P, RL 26P a indikátorový kmen *Lactobacillus sakei* IM 398 byly naočkovány do 10 ml tekutého MRS média (1% inokulum) a kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin.
2. Na předem připravené pevné MRS médium se sníženou koncentrací glukózy (0,2%) byly nakápnuty dvě kapky (2 µl) čerstvě narostlých testovaných kmenů.
3. Petriho misky pak byly kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin.
4. Po kultivaci byly zaznamenány vzniklé inhibiční zóny.
5. Narostlé kapky testovaných kmenů byly opatrně přelity 5 ml rozvařeného polotuhého MRS média (0,75% množství agaru), ochlazeného na 36 °C (kritický bod – vyšší teplota je nebezpečná pro přidávané bakterie, naopak nižší teplota způsobuje tuhnutí agaru a nedostatečné přelití misek). Po ochlazení bylo do média připipetováno 200 µl indikátorového kmene *L. sakei* IM 398.
6. Petriho misky byly ponechány na vodorovné ploše (dokud nedošlo k zatuhnutí) a následně byly aerobně kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin.
7. Po kultivaci byly k jedné kapce připipetovány 3 µl enzymů degradujících proteiny: trypsin (10 mg/ml) a proteináza K (10 mg/ml).
8. Po zaschnutí kapek byly opětovně připipetovány shodné enzymy o stejném objemu a opět se nechaly zaschnout.
9. Misky byly kultivovány aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin.
10. Následující den byly ještě jednou na stejná místa připipetovány shodné enzymy, o stejném objemu, a kultivace probíhala stejně jako v předešlých krocích.
11. Na závěr byla vyhodnocena funkce enzymů.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Kultivace bakterií

Kultivace jednotlivých bakteriálních kmenů probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1. Vzhled bakteriálních kolonií, narostlých na Petriho miskách po křížovém rozřezu, odpovídal vzhledu, který je pro tyto kolonie charakteristický.

Pro další práci byly kmeny uchovávány v 50% glycerolu při -70°C .

4.2. Stanovení koncentrace bakteriální DNA

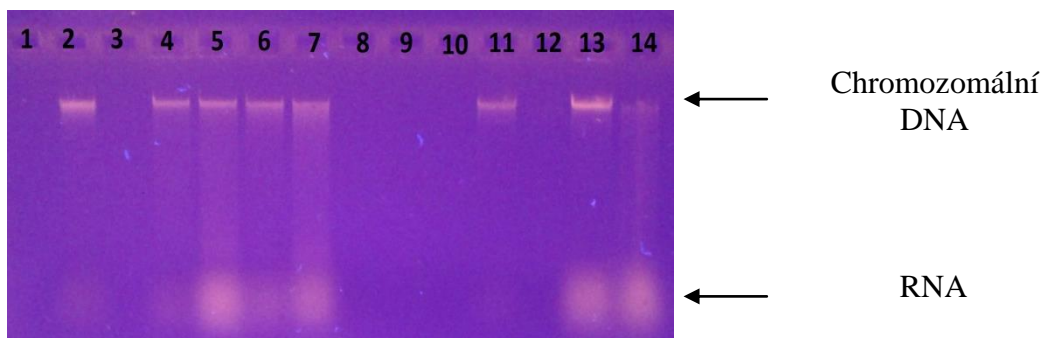
Pro stanovení koncentrace bakteriální DNA spektrofotometricky, byla nejdříve DNA vyizolována podle postupu v kapitole 3.2.2.

Z poměru hodnot absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ je patrné, že čistota bakteriální DNA, byla izolována v dostatečné čistotě (poměr hodnot absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ se pohyboval přibližně v rozmezí 1,8-2,0). DNA tedy není kontaminována proteiny ani RNA.

Tabulka č. 13: Koncentrace a čistota izolované bakteriální DNA

	<i>L. gasseri</i> K7	<i>L. sakei</i>	IM 398	RL 2P	RL 22P	RL 26P	RL 2
Koncentrace [ng/μl]	115,3	24,3	6,7	122,75	2,3	87,85	52,45
$A_{260\text{ nm}}$	2,306	0,486	0,140	2,455	0,046	1,757	1,050
$A_{280\text{ nm}}$	1,124	0,281	0,091	1,267	0,027	0,907	0,530
$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	2,05	1,73	1,54	1,94	1,75	1,94	1,98
$A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$	2,28	1,90	1,46	2,28	0,94	2,12	2,09

Dále byla u izolované bakteriální DNA provedena dle kapitoly 3.2.5. agarózová gelová elektroforéza. Z agarózové gelové elektroforézy (Obr. č. 2) je patrné, že DNA byla nedegradovaná, intaktní a obsahovala RNA.



Obr. č. 2: Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

Tabulka č. 14: Schéma nanesení vzorků bakteriální DNA na gel

Běh	Popis	Přítomnost DNA
Běh č. 1	negativní kontrola	-
Běh č. 2	pozitivní kontrola (<i>L. gasseri</i> K7)	++
Běh č. 4-5	<i>L. gasseri</i> K7	++
Běh č. 6	IM 398 (13. 10. 2015)	++
Běh č. 7	<i>L. sakei</i>	++
Běh č. 11	RL 2P	++
Běh č. 13-14	RL 2	++

-DNA nebyla detekována, + DNA byla detekována, ++ DNA byla silně detekována

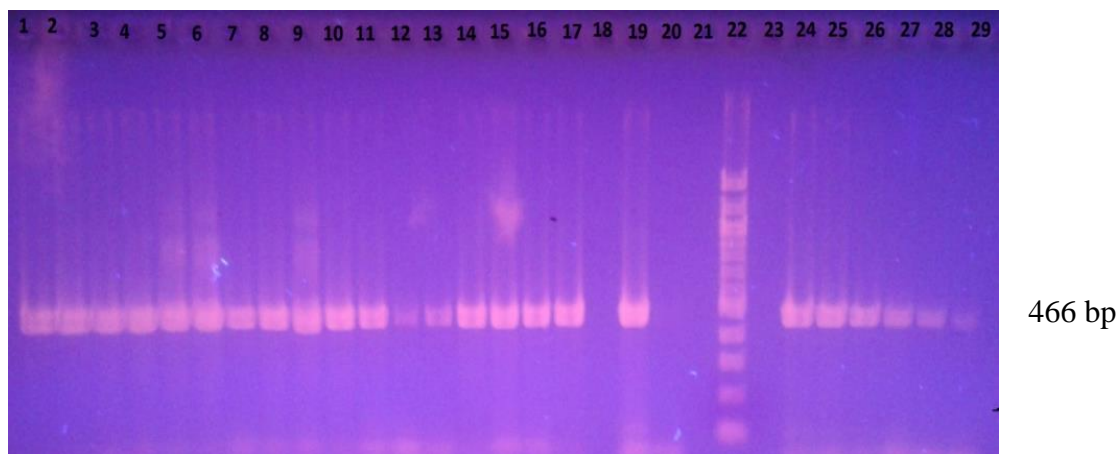
4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro potvrzení domény *Bacteria*, rodu *Lactobacillus* a druhového zařazení (*L. gasseri*, *L. plantarum*) byla využita konvenční polymerázová řetězová reakce. Jednotlivé komponenty pro PCR a jejich množství jsou shrnuty v tabulce č. 5, v kapitole 3.2.4.

Koncentrace izolované bakteriální DNA byla vyředěná na hodnotu 10 ng/μl. Každá PCR obsahovala citlivost, ke které byla použita pozitivní kontrola (ředění v rozsahu 100 ng/μl – 1 pg/μl, resp. 10 ng/μl – 1pg/μl).

4.3.1. Doména *Bacteria*

Bakteriální DNA získána fenolovou extrakcí byla amplifikována pomocí specifických primerů (Feub/Reub (Haarman & Knol 2006)) a detekována elektroforeticky na 1,8% gelu. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek *L. gasseri* K7 (10 ng/μl) a jeho velikost je shodná s ostatními vzorky. Obr. č. 3 znázorňuje přítomnost bakteriální DNA ve všech vzorcích nanesených na gel a velikost ampliconů odpovídá 466 bp, která je charakteristická pro doménu *Bacteria* (Haarman a Knol 2006).



Obr. č. 3: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (466 bp) specifického pro doménu *Bacteria*

Tabulka č. 15: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria* na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	+++
Běh č. 2	RL 26P	+++
Běh č. 3	IM 398 (22.5. 2012)	+++
Běh č. 4	IM 398 (22.5. 2012)	+++
Běh č. 5	RL 22P (13.4. 2013)	+++
Běh č. 6	RL 22P (13.4. 2013)	+++
Běh č. 7	<i>L. gasseri</i> K7	+++
Běh č. 8	<i>L. gasseri</i> K7	+++
Běh č. 9	IM 398 (9.10. 2015)	+++
Běh č. 10	<i>L. sakei</i>	+++
Běh č. 11	IM 398 (19.10. 2015)	+++
Běh č. 12	RL 22P (13.10. 2015)	+
Běh č. 13	RL 22P (19.10. 2015)	++
Běh č. 14	RL 2P	+++
Běh č. 15	RL 2P	+++
Běh č. 16	RL 2	+++
Běh č. 17	RL 2	+++
Běh č. 19	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri</i> K7)	+++
Běh č. 20	Negativní kontrola	-
Běh č. 22	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 24	Citlivost (100 ng/μl)	+++
Běh č. 25	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 26	Citlivost (1 ng/μl)	+++
Běh č. 27	Citlivost (10 pg/μl)	++
Běh č. 28	Citlivost (100 pg/μl)	++
Běh č. 29	Citlivost (1 pg/μl)	+

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

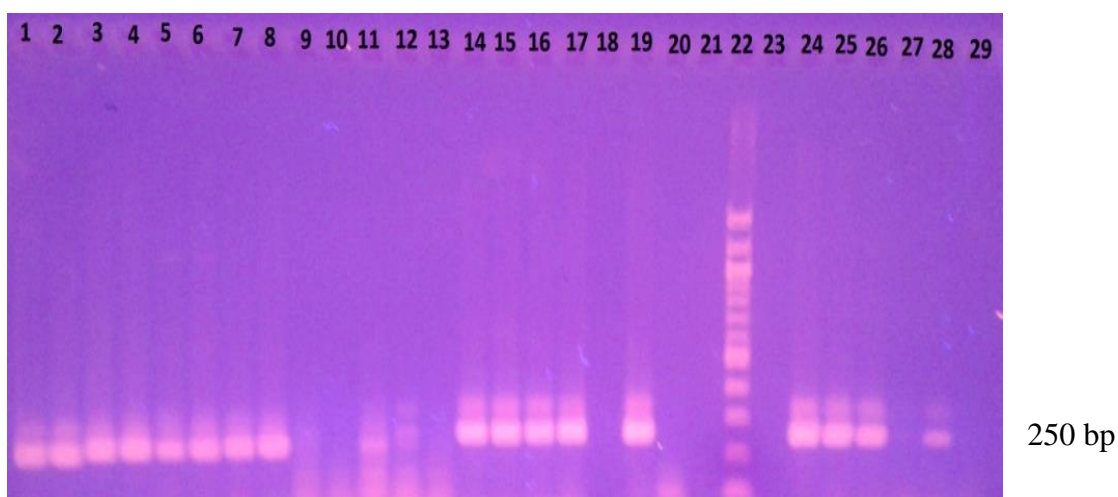
Bylo prokázáno, že vzorky pocházejí z bakteriálních kultur náležících do domény *Bacteria*. Podobnou metodou byla prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorku i jinými autory (Haarman a Knol 2006). Negativní kontrola nebyla kontaminována

a nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. Intenzita produktů PCR je ve většině vzorků stejná (obr. č. 3). V běhu č. 12 a 13 je však koncentrace nepatrně nižší, jelikož její hodnota byla stanovena pod 10 ng/μl. Při kultivaci těchto vzorků byl problém s růstem kultury a z toho důvodu vyizolovaná DNA měla nižší koncentrací než je obvyklé. Citlivost pro danou PCR byla detekována až do koncentrace 1 pg/μl.

4.3.2. Rod *Lactobacillus*

Pomocí specifických primerů (LbLMA 1rev/R16-1 (Dubernet et al. 2002)) byla provedena PCR pro rod *Lactobacillus* (obr. č. 4). Amplikony byly detekovány elektroforeticky na 1,8% gelu. Pozitivní kontrolou byla DNA *L. gasseri* K7 (10 ng/μl).

Nanesené vzorky vykazují pásy v oblasti pro 250 bp, stejně jako pozitivní kontrola.



Obr. č. 4: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (250 bp) specifického pro rod *Lactobacillus*

Tabulka č. 16: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus* na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	++
Běh č. 2	RL 26P	++
Běh č. 3	IM 398 (22.5. 2012)	++
Běh č. 4	IM 398 (22.5. 2012)	++
Běh č. 5	RL 22P (13.4. 2013)	++
Běh č. 6	RL 22P (13.4. 2013)	++
Běh č. 7	<i>L. gasseri</i> K7	++
Běh č. 8	<i>L. gasseri</i> K7	++
Běh č. 9	IM 398 (9.10. 2015)	--
Běh č. 10	<i>L. sakei</i>	--
Běh č. 11	IM 398 (19.10. 2015)	+
Běh č. 12	RL 22P (13.10. 2015)	+
Běh č. 13	RL 22P (19.10. 2015)	--
Běh č. 14	RL 2P	+++

Běh č. 15	RL 2P	+++
Běh č. 16	RL 2	+++
Běh č. 17	RL 2	+++
Běh č. 19	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri</i> K7)	+++
Běh č. 20	Negativní kontrola	-
Běh č. 22	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 24	Citlivost (100 ng/μl)	+++
Běh č. 25	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 26	Citlivost (1 ng/μl)	++
Běh č. 27	Citlivost (10 pg/μl)	-
Běh č. 28	Citlivost (100 pg/μl)	+
Běh č. 29	Citlivost (1 pg/μl)	-

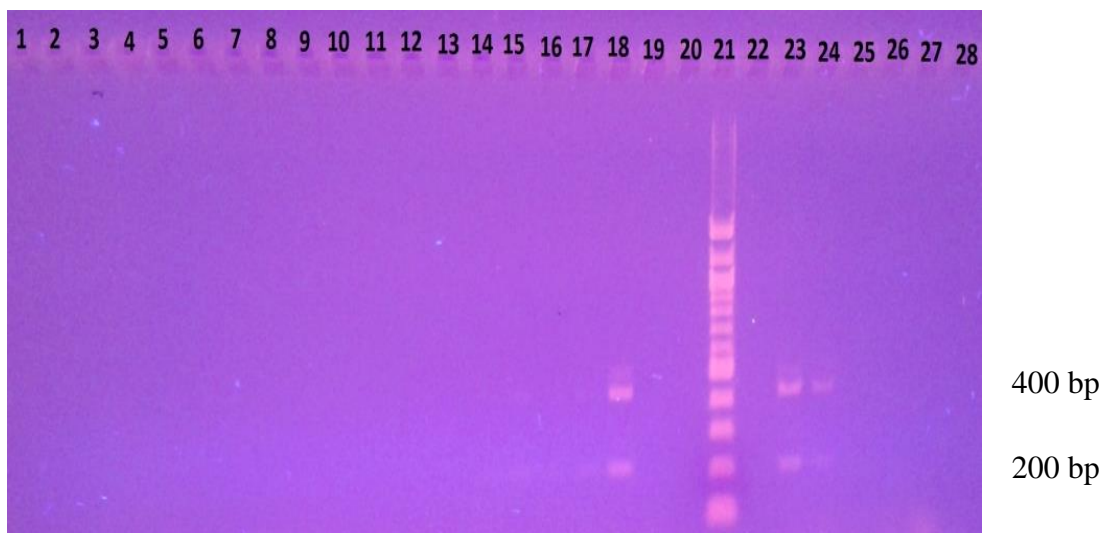
-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

Bylo prokázáno, že vzorky bakteriální DNA pocházejí z kultur rodu *Lactobacillus*. Podobnou metodou byla prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorku i jinými autory (Dubernet et al. 2002). Negativní kontrola nebyla během práce kontaminována a nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. Velikost intenzity produktů některých vzorků se liší (obr. č. 4). Jedná se opět o vzorky (běh č. 9-13), u kterých probíhalo opakované zaočkování, z důvodu nedostatečného nárůstu bakteriální kultury. Z těchto vzorků pak byla vyizolována bakteriální DNA s nižší koncentrací. Ostatní vzorky byly vyizolovány s dostatečnou hodnotou koncentrace. Citlivost prodanou PCR byla detekována až do koncentrace 100 pg/μl.

4.3.3 Druh *Lactobacillus gasseri*

Prokázání jednotlivých druhů rodu *Lactobacillus* bylo provedeno pomocí specifických primerů (pro druh *L. gasseri* – GasI/GasII (Walter et al. 2000)) pro danou PCR (obr. č. 5). Velikost jednotlivých ampliconů byla detekována elektroforeticky na 1,8% gelu. Pozitivní kontrolou byl opět vzorek *L. gasseri* K7 (10 ng/μl).

Nanesené vzorky produktu PCR připraveného amplifikací bakteriální DNA vykazují pásy v oblasti pro 400 a 200 bp, stejně jako pozitivní kontrola.



Obr. č. 5: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (400 a 200 bp) specifického pro druh *L. gasseri*

Tabulka č. 17: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro druh *L. gasseri* na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	-
Běh č. 2	RL 26P	-
Běh č. 3	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 4	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 5	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 6	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 7	<i>L. gasseri</i> K7	+
Běh č. 8	<i>L. gasseri</i> K7	+
Běh č. 9	IM 398 (9.10. 2015)	-
Běh č. 10	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 11	IM 398 (19.10. 2015)	-
Běh č. 12	RL 22P (13.10. 2015)	-
Běh č. 13	RL 22P (19.10. 2015)	-
Běh č. 14	RL 2P	+
Běh č. 15	RL 2P	+
Běh č. 16	RL 2	+
Běh č. 17	RL 2	+
Běh č. 18	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri</i> K7)	+
Běh č. 19	Negativní kontrola	-
Běh č. 21	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 23	Citlivost (100 ng/μl)	++
Běh č. 24	Citlivost (10 ng/μl)	+
Běh č. 25	Citlivost (1 ng/μl)	-
Běh č. 26	Citlivost (100 pg/μl)	-
Běh č. 27	Citlivost (10 pg/μl)	-
Běh č. 28	Citlivost (1 pg/μl)	-

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

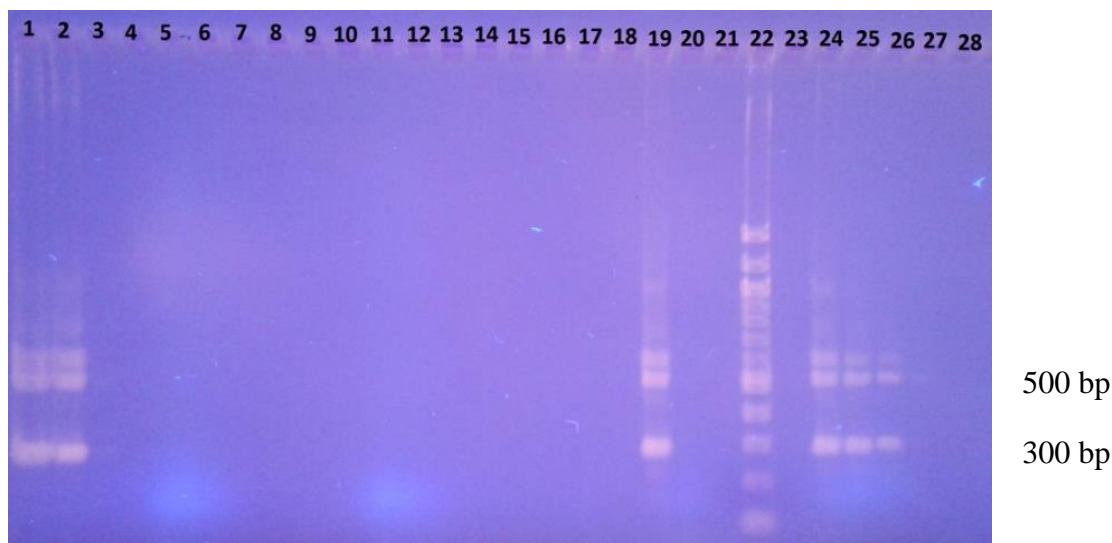
Bylo prokázáno, že vzorky *L. gasseri* K7, RL 2, RL2P a RL 22P pocházejí z kultur rodu *Lactobacillus* a jsou řazeny do druhu *L. gasseri*. Podobnou metodou byla

prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorku i jinými autory (Walter et al. 2000). U negativní kontroly nebyl detekován viditelný pás v běhu, takže nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. U PCR specifické pro *L. gasseri* byla citlivost elektroforézy již nižší (obr. č. 5). Citlivost je detekována pouze do koncentrace 10 ng/μl. Přiblížením fotografie je možné vidět v běhu č. 7-8 a 14-16 pásy v oblasti pro 400 a 200 bp.

4.3.4. Druh *Lactobacillus plantarum*

PCR specifická pro druh *L. plantarum* byla provedena pomocí specifických primerů (Lfpr/Plan II (Walter et al. 2000)) a její výsledek je zaznamenán na obr. č. 6. Velikost produktů PCR reakce se nachází v oblasti 500 a 300 bp. Amplikony byly detekovány elektroforeticky na 1,8% gelu. Pozitivní kontrolou byl vzorek bakteriální DNA *L. plantarum* CCM 7039^T (10 ng/μl).

Nanesené vzorky (produkty PCR) v běhu č. 1 a 2 vykazují viditelné pásy v oblasti pro 500 a 300 bp, které jsou shodné s pozitivní kontrolou.



Obr. č. 6: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (500 a 300 bp) specifického pro druh *L. plantarum*

Tabulka č. 18: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro druh *L. plantarum* na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	+++
Běh č. 2	RL 26P	+++
Běh č. 3	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 4	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 5	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 6	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 7	<i>L. gasseri</i> K7	-

Běh č. 8	<i>L. gasseri</i> K7	-
Běh č. 9	IM 398 (9.10. 2015)	-
Běh č. 10	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 11	IM 398 (19.10. 2015)	-
Běh č. 12	RL 22P (13.10. 2015)	-
Běh č. 13	RL 22P (19.10. 2015)	-
Běh č. 14	RL 2P	-
Běh č. 15	RL 2P	-
Běh č. 16	RL 2	-
Běh č. 17	RL 2	-
Běh č. 19	Pozitivní kontrola (<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^{d)})	+++
Běh č. 20	Negativní kontrola	-
Běh č. 22	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 24	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 25	Citlivost (1ng/μl)	+++
Běh č. 26	Citlivost (100 pg/μl)	++
Běh č. 27	Citlivost (10 pg/μl)	+
Běh č. 28	Citlivost (1 pg/μl)	-

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

Bylo potvrzeno, že vzorky RL 26P pochází z bakteriálních kultur rodu *Lactobacillus* a jsou řazeny do druhu *L. plantarum*. Podobnou metodou byla prokázána přítomnost bakteriální DNA ve vzorku i jinými autory (Walter et al. 2000). U negativní kontroly nebyl detekován viditelný pás v běhu, takže nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. Citlivost pro danou PCR byla detekována do koncentrace 10 pg/μl.

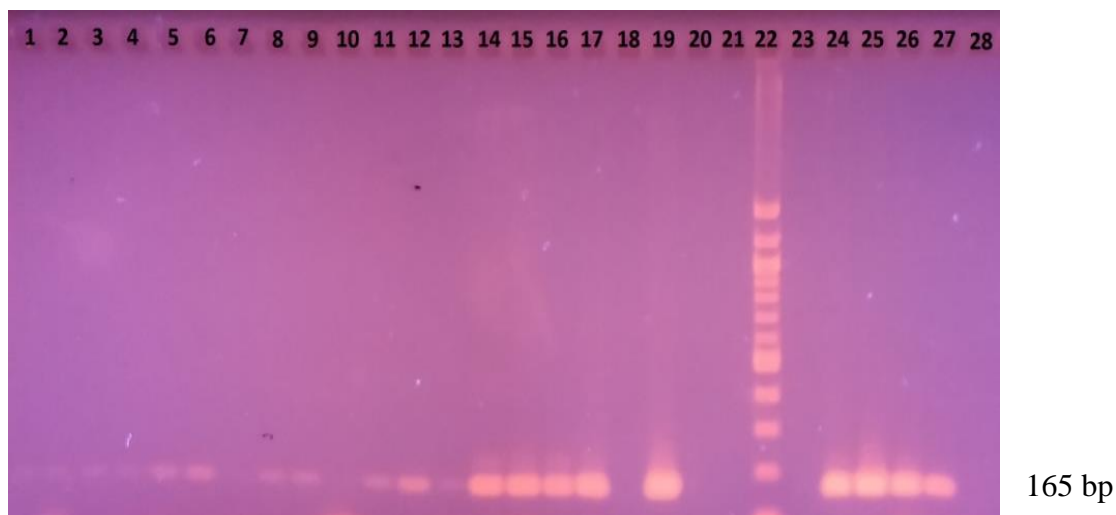
4.3.5. Testování produkce bakteriocinů

Po zařazení jednotlivých vzorků do druhů rodu *Lactobacillus*, následovalo jejich testování na produkci vybraných bakteriocinů.

4.3.5.1. Bakteriocin gassericin K7B

K testování byla zvolena příslušná PCR reakce se specifickými primery pro daný bakteriocin (K7B c.f. F/K7B c.f. R (Canic a Rogelj 2003)) a výsledek je znázorněn na obr. č. 7. Produkty PCR reakce byly detekovány elektroforeticky na 1,8% gelu. Viditelné pásy jednotlivých amplikonů jsou patrné v oblasti pro 165 bp. Pozitivní kontrolou byl vzorek bakteriální DNA *L. gasseri* K7 (10 ng/μl), u kterého je prokázána produkce bakteriocinů.

Nanesené vzorky produktů PCR se stejně jako pozitivní kontrola nacházejí v oblasti pro 165 bp, což je charakteristické pro bakteriocin gassericin K7B (Canic a Rogelj 2003).



Obr. č. 7: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (165 bp) specifického pro bakteriocin gassericin K7B

Tabulka č. 19: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro bakteriocin gassericin K7B na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	+
Běh č. 2	RL 26P	+
Běh č. 3	<i>L. gasserii</i> K7	+
Běh č. 4	<i>L. gasserii</i> K7	+
Běh č. 5	RL 22P (13.4. 2013)	++
Běh č. 6	RL 22P (13.4. 2013)	++
Běh č. 7	IM 398 (9.10. 2015)	-
Běh č. 8	<i>L. gasserii</i> K7	+
Běh č. 9	<i>L. gasserii</i> K7	+
Běh č. 10	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 11	RL 22P (19.10. 2015)	+
Běh č. 12	RL 22P (13.10. 2015)	++
Běh č. 13	RL 22P (19.10. 2015)	+
Běh č. 14	RL 2P	++
Běh č. 15	RL 2P	++
Běh č. 16	RL 2	++
Běh č. 17	RL 2	+++
Běh č. 19	Pozitivní kontrola (<i>L. gasserii</i> K7)	+++
Běh č. 20	Negativní kontrola	-
Běh č. 22	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 24	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 25	Citlivost (1ng/μl)	+++
Běh č. 26	Citlivost (100 pg/μl)	+++
Běh č. 27	Citlivost (10 pg/μl)	++
Běh č. 28	Citlivost (1 pg/μl)	-

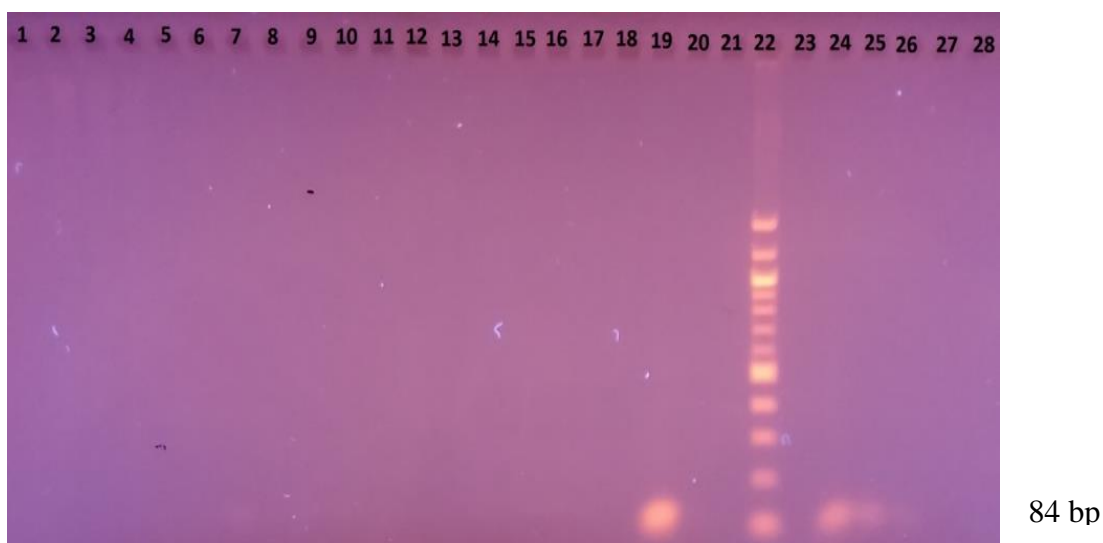
-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

U většiny vzorků byla prokázána přítomnost genů produkujících bakteriociny (obr. č. 7). V běhu č. 10 nebyla prokázána přítomnost těchto genů, jelikož do tohoto běhu byla nanesena bakteriální DNA *L. sakei*. U *L. sakei* je prokázáno, že není producentem

bakteriocinů. Využívá se jako tzv. indikátorový kmen (viz kapitola 2.6.2. Agarózový kapkový spot-test) a antimikrobiální látky na něj působí inhibičně. Intenzita produktů PCR reakce některých vzorků se liší. Jedná se opět o vzorky, u kterých neproběhl dostatečný nárůst bakteriálních kolonií. Falešně pozitivní vzorek nebyl potvrzen, tudíž negativní kontrola nebyla kontaminována. Citlivost pro tuto PCR reakci byla detekována do koncentrace 10 pg/μl.

4.3.5.2. *Bakteriocin gassericin K7A*

K detekci bakteriocinů produkujících bakteriocin gassericin K7A byla zvolena příslušná PCR reakce se specifickými primery pro daný bakteriocin (LFA 185/LFA 268 (Canic a Rogelj 2003)). Výsledek je znázorněn na obr. č. 8. Produkty PCR reakce byly detekovány elektroforeticky na 1,8% gelu. Velikost jednotlivých ampliconů je patrná v oblasti pro 84 bp. Pozitivní kontrolou byl vzorek bakteriální DNA *L. gasserii* K7 (10 ng/μl), u kterého je prokázána produkce bakteriocinů.



Obr. č. 8: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (84 bp) specifického pro bakteriocin gassericin K7A

Tabulka č. 20: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro bakteriocin gassericin K7A na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	-
Běh č. 2	RL 26P	-
Běh č. 3	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 4	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 5	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 6	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 7	<i>L. gasserii</i> K7	+-

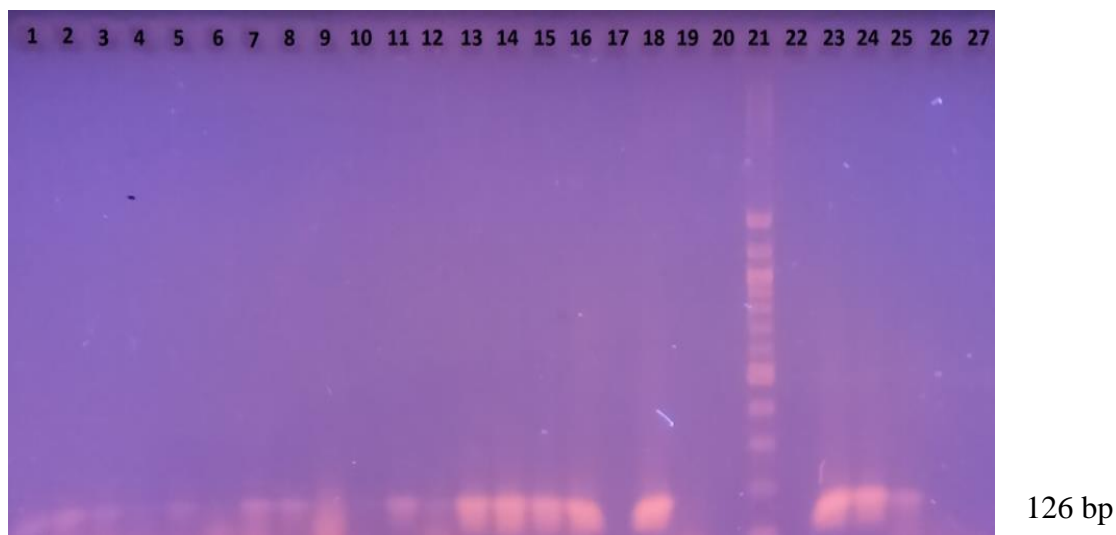
Běh č. 8	<i>L. gasseri</i> K7	+-
Běh č. 9	IM 398 (9.10. 2015)	-
Běh č. 10	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 11	IM 398 (19.10. 2015)	-
Běh č. 12	RL 22P (13.10. 2015)	-
Běh č. 13	RL 22P (19.10. 2015)	-
Běh č. 14	RL 2P	-
Běh č. 15	RL 2P	-
Běh č. 16	RL 2	-
Běh č. 17	RL 2	-
Běh č. 19	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri</i> K7)	+++
Běh č. 20	Negativní kontrola	-
Běh č. 22	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 24	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 25	Citlivost (1ng/μl)	++
Běh č. 26	Citlivost (100 pg/μl)	+
Běh č. 27	Citlivost (10 pg/μl)	-
Běh č. 28	Citlivost (1 pg/μl)	-

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

U většiny vzorků produktů PCR nanesených na gel nebyla prokázána přítomnost genů pro bakteriocin gassericin K7A, jelikož na gelu nejsou viditelné pásy jako u pozitivní kontroly. Pouze u bakteriální DNA *L. gasseri* K7 v běhu č. 7 a 8 byly hůře viditelné pásy produktů PCR po obarvení gelu na transiluminátoru. Negativní kontrola nebyla kontaminovaná a nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. Citlivost pro danou PCR reakci byla detekována do koncentrace 100 pg/μl.

4.3.5.3. *Bakteriocin gassericin T*

PCR specifická pro bakteriocin gassericin T byla provedena pomocí specifických primerů (gaT 950/gaT 1075 (Kawai et al. 2000)) a její výsledek je zaznamenán na obr. č. 9. Velikost produktů PCR reakce se nachází v oblasti 126 bp. Amplikony byly detekovány elektroforeticky na 1,8% gelu. Pozitivní kontrolou byl vzorek bakteriální DNA *L. gasseri* K7 (10 ng/μl).



Obr. č. 9: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (126 bp) specifického pro bakteriocin *gassericin T*

Tabulka č. 21: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro bakteriocin *gassericin T* na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	+
Běh č. 2	RL 26P	+
Běh č. 3	RL 26P	+
Běh č. 4	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 5	RL 22P (13.4. 2013)	+
Běh č. 6	RL 22P (13.4. 2013)	+-
Běh č. 7	<i>L. gasserii</i> K7	+
Běh č. 8	<i>L. gasserii</i> K7	+
Běh č. 9		-
Běh č. 10	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 11	RL 22P (13.10. 2015)	+
Běh č. 12	RL 22P (19.10. 2015)	+-
Běh č. 13	RL 2P	+++
Běh č. 14	RL 2P	+++
Běh č. 15	RL 2	+++
Běh č. 16	RL 2	+++
Běh č. 18	Pozitivní kontrola (<i>L. gasserii</i> K7)	+++
Běh č. 19	Negativní kontrola	-
Běh č. 21	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 23	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 24	Citlivost (1ng/μl)	+++
Běh č. 25	Citlivost (100 pg/μl)	++
Běh č. 26	Citlivost (10 pg/μl)	+
Běh č. 27	Citlivost (1 pg/μl)	-

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

Ve všech vzorcích (s výjimkou běhu č. 10) byly potvrzeny geny kódující produkci bakteriocinů, jelikož velikost PCR produktu se shoduje s pozitivní kontrolou (obr. č. 9). V běhu č. 10 byla na gel nanesena bakteriální DNA *L. sakei*, který bakteriociny

neprodukuje, proto v tomto běhu není viditelný bend, odpovídající produktu PCR. Nejvyšší intenzita produktů PCR je ve vzorcích RL 2 a RL 2P, které byly identifikovány jako *L. gasseri*. U negativní kontroly nebyl detekován viditelný pás v běhu, takže nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. Citlivost pro danou PCR byla detekována do koncentrace 10 pg/μl.

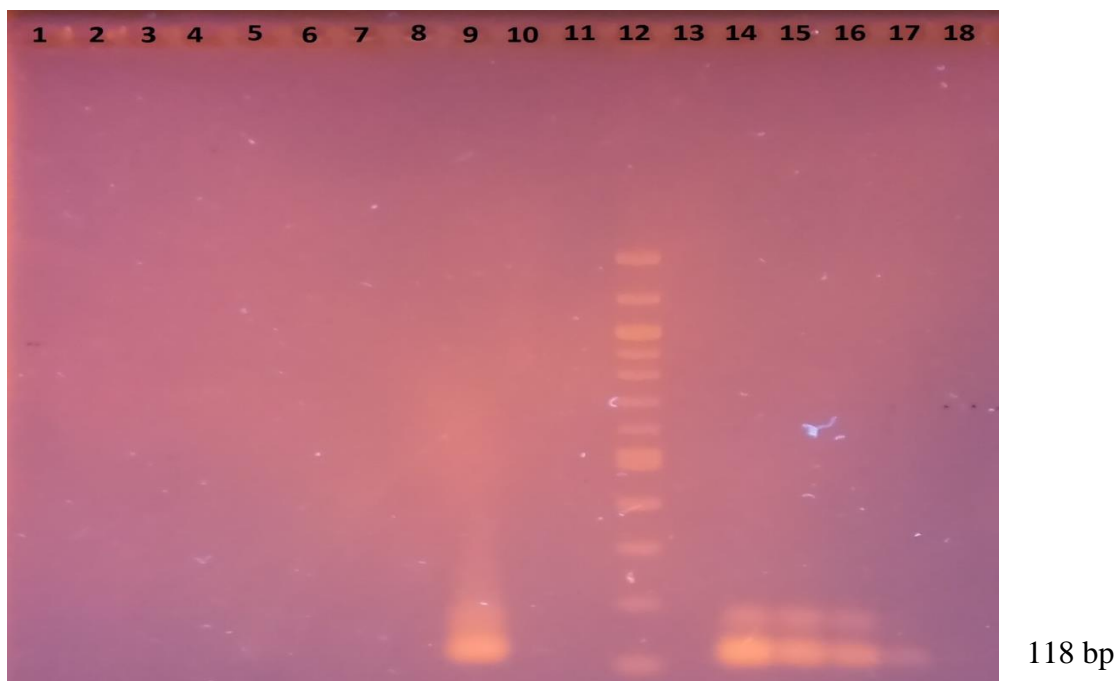
4.3.6. Detekce genetických determinantů gassericinů K7A a gassericinů K7B

U testovaných bakteriálních kmenů se pomocí PCR reakce dále detekovala aktivita genetických determinantů pro gassericin K7A a gassericin K7B.

4.3.6.1. Genetický determinant gassericinů K7A – komplementární, aktivní a imunitní protein

K detekci přítomnosti genetických determinantů genových klastrů pro gassericin K7A – komplementární, aktivní a imunitní protein byly použity specifické primery pro příslušnou PCR reakci uvedené v kapitole 3.2.4. (tabulka č. 9). Výsledky PCR reakce jsou zobrazeny na obr. č. 10, 11 a 12. Velikost produktů PCR reakce se nachází v oblasti 118,105 a 106 bp. Amplikony PCR reakce byly detekovány elektroforeticky na 1,8% gelu. Pozitivní kontrolou byl zvolen vzorek bakteriální DNA *L. gasseri* K7 (10 ng/μl).

Z obrázků jednotlivých PCR reakcí je patrné, že ve vyizolované bakteriální DNA nejsou přítomny geny pro komplementární, aktivní a imunitní protein (obr. č. 10, 11 a 12). Tento fakt by odpovídal i skutečnosti, že při detekci bakteriocinu gassericinů K7A nebyla prokázána přítomnost genů kódujících tento bakteriocin. U negativní kontroly nebyl detekován viditelný pás v běhu, takže nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. Citlivost pro danou PCR byla detekována do koncentrace 10 pg/μl, respektive 1 pg/μl, 100 pg/μl.

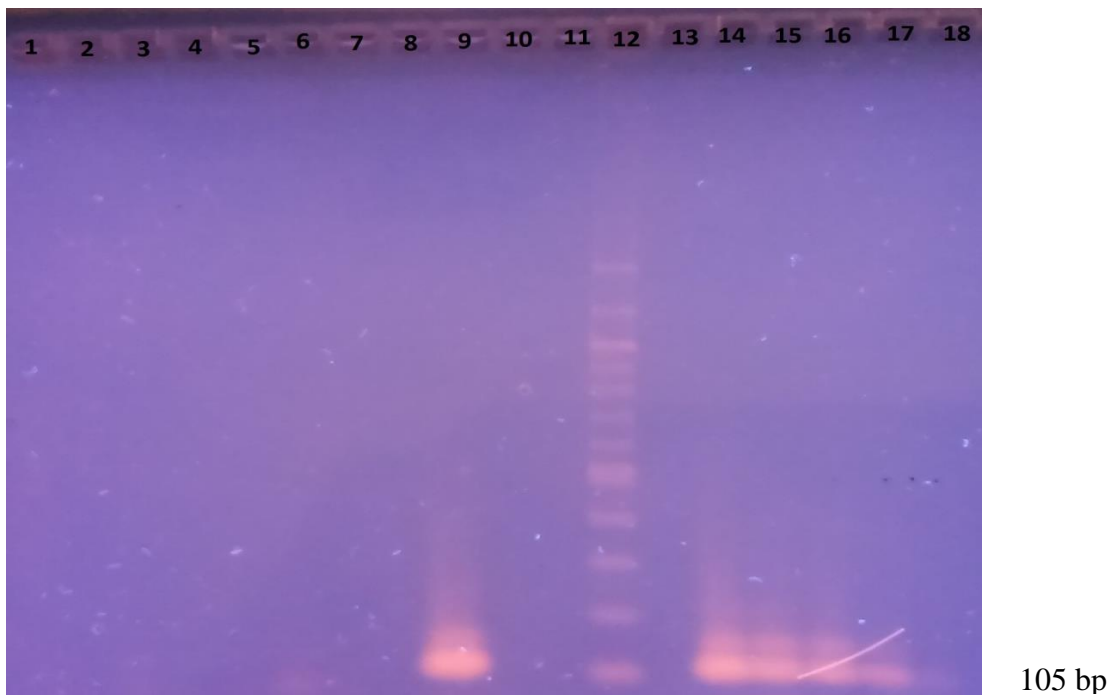


Obr. č. 10: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (118 bp) specifického pro genetický determinant gassericinu K7A – komplementární protein

Tabulka č. 22: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro genetický determinant gassericinu K7A – komplementární protein na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	-
Běh č. 2	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 3	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 4	<i>L. gasseri</i> K7	-
Běh č. 5	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 6	RL 2P	-
Běh č. 7	RL 2	-
Běh č. 9	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri</i> K7)	+++
Běh č. 10	Negativní kontrola	-
Běh č. 12	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 14	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 15	Citlivost (1ng/μl)	++
Běh č. 16	Citlivost (100 pg/μl)	++
Běh č. 17	Citlivost (10 pg/μl)	+
Běh č. 18	Citlivost (1 pg/μl)	-

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

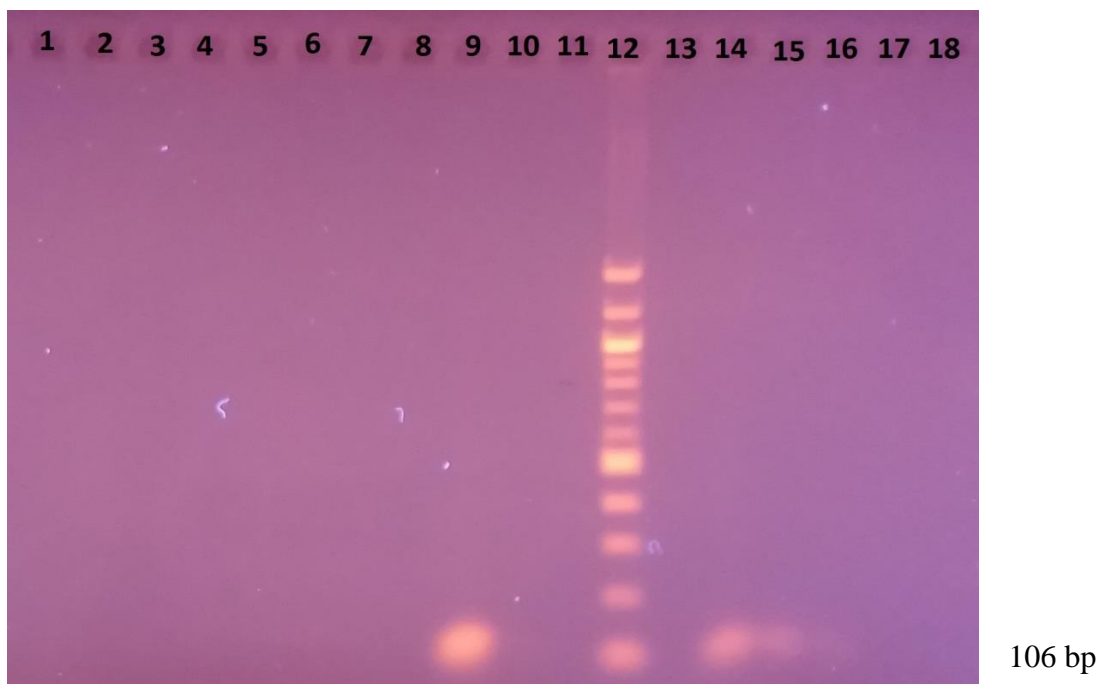


Obr. č. 11: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (105 bp) pro genetický determinant gassericinu K7A – aktivní protein

Tabulka č. 23: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro genetický determinant gassericinu K7A – aktivní protein na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	-
Běh č. 2	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 3	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 4	<i>L. gasseri</i> K7	-
Běh č. 5	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 6	RL 2P	-
Běh č. 7	RL 2	-
Běh č. 9	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri</i> K7)	+++
Běh č. 10	Negativní kontrola	-
Běh č. 12	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 14	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 15	Citlivost (1ng/μl)	+++
Běh č. 16	Citlivost (100 pg/μl)	++
Běh č. 17	Citlivost (10 pg/μl)	++
Běh č. 18	Citlivost (1 pg/μl)	+

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován



Obr. č. 12: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (106 bp) specifického pro genetický determinant gassericinu K7A – imunitní protein

Tabulka č. 24: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro genetický determinant gassericinu K7A – imunitní protein na gel

Běh	Popis	Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	-
Běh č. 2	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 3	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 4	<i>L. gasseri</i> K7	-
Běh č. 5	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 6	RL 2P	-
Běh č. 7	RL 2	-
Běh č. 9	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri</i> K7)	+++
Běh č. 10	Negativní kontrola	-
Běh č. 12	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	-
Běh č. 14	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 15	Citlivost (1 ng/μl)	++
Běh č. 16	Citlivost (100 pg/μl)	+
Běh č. 17	Citlivost (10 pg/μl)	-
Běh č. 18	Citlivost (1 pg/μl)	-

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

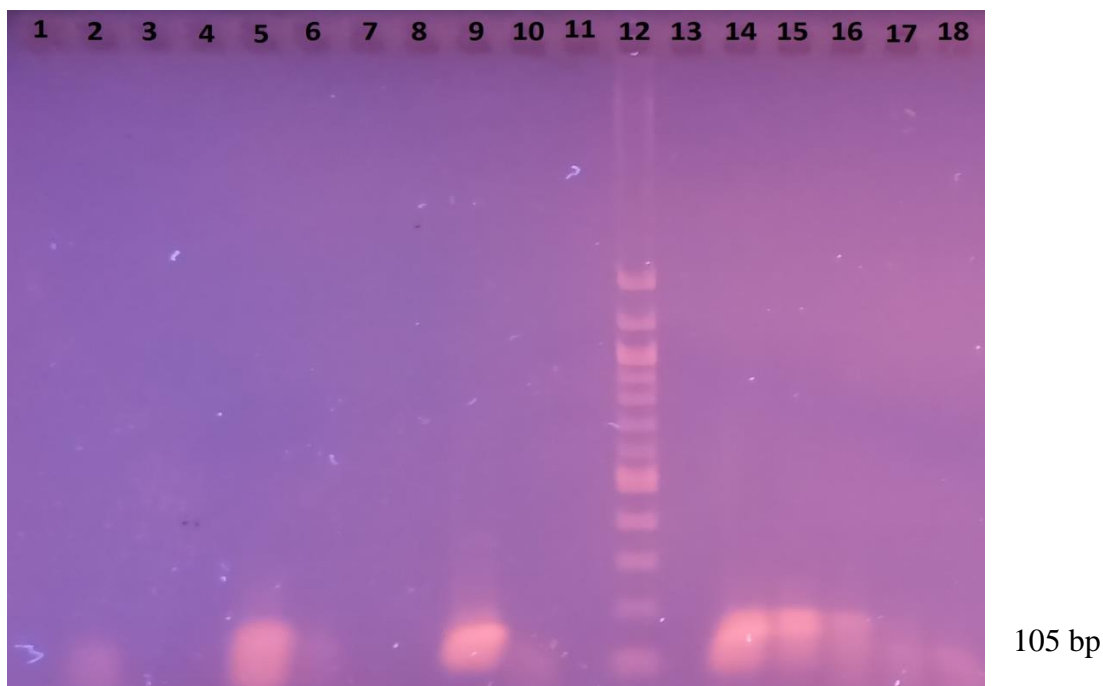
4.3.6.2. Genetický determinant gassericinu K7B – komplementární, aktivní a imunitní protein

K detekci přítomnosti genetických determinantů genových klastrů pro gassericin K7B – komplementární, aktivní a imunitní protein byly použity specifické primery pro příslušnou PCR reakci uvedené v kapitole 3.2.4. (tabulka č. 9). Výsledky jsou zobrazeny na obr. č. 13, 14 a 15. Velikost produktů PCR reakce se nachází v oblasti 105, 102 a 116 bp. Amplikony PCR reakce byly detekovány elektroforeticky na 1,8% gelu. Pozitivní kontrolou byl zvolen vzorek bakteriální DNA *L. gasseri* K7 (10 ng/μl).

U gassericinu K7B – komplementárního proteinu byl produkt PCR reakce prokázán v běhu č. 2, 5 a 6 (obr. č. 13). Nejintenzivnější bend byl patrný v běhu č. 5 s bakteriální DNA *L. gasseri* K7. U negativní kontroly nebyl detekován viditelný pás v běhu, takže nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. Citlivost pro danou PCR byla detekována do koncentrace 1 pg/μl.

Genetický determinant gassericinu K7B – aktivního proteinu byl detekován v běhu č. 7 (obr. č. 14) s bakteriální DNA kmene RL 2, který byl zařazen do druhu *L. gasseri*. U negativní kontroly nebyl detekován viditelný pás v běhu, takže nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek., respektive 100 pg/μl.

U gassericinu K7B – imunitního proteinu byl produkt PCR reakce prokázán v běhu č. 6 a 7 (obr. č. 15), kde byly bendy nejintenzivnější. Genetický determinant byl detekován u kmenů RL 2 a RL 2P, které byly zařazeny do druhu *L. gasseri* K7. U negativní kontroly nebyl detekován viditelný pás v běhu, takže nebyl potvrzen falešně pozitivní vzorek. Citlivost pro danou PCR byla detekována do koncentrace 10 pg/μl.

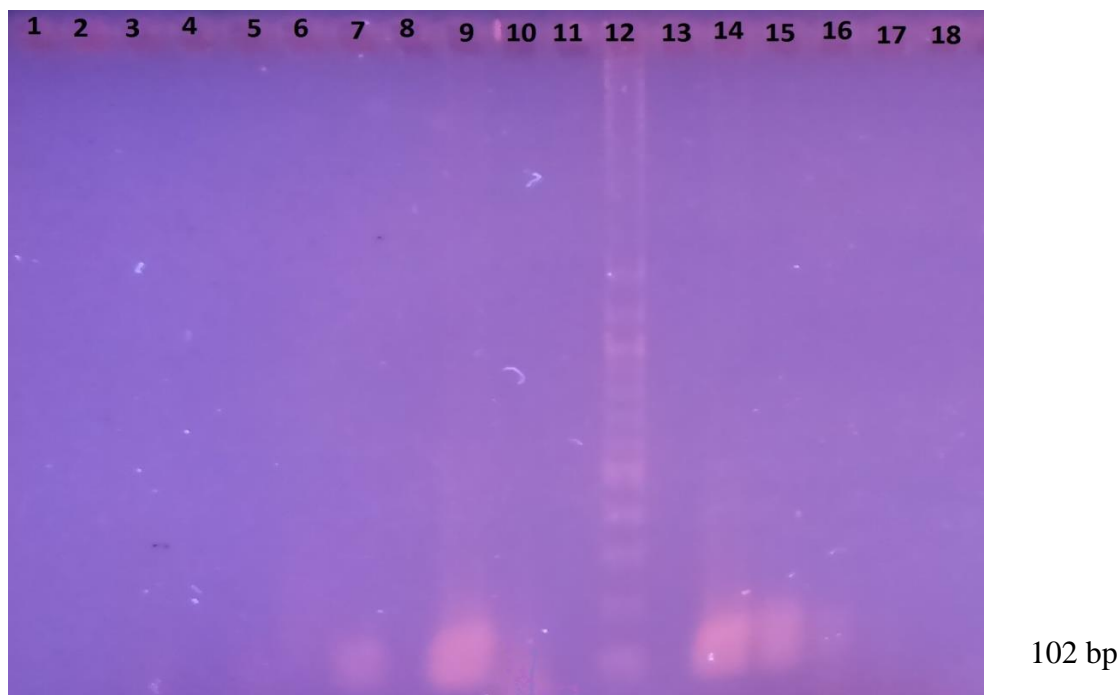


Obr. č. 13: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (105 bp) specifického pro genetický determinant gassericinu K7B – komplementární protein

Tabulka č. 25: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro genetický determinant gassericinu K7B – komplementární protein na gel

Běh	Popis	Přítomnost produkt PCR
Běh č. 1	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 2	RL 26P	+
Běh č. 3	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 4	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 5	<i>L. gasseri K7</i>	+++
Běh č. 6	RL 2P	+
Běh č. 7	RL 2	-
Běh č. 9	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri K7</i>)	+++
Běh č. 11	Negativní kontrola	-
Běh č. 12	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 14	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 15	Citlivost (1ng/μl)	+++
Běh č. 16	Citlivost (100 pg/μl)	++
Běh č. 17	Citlivost (10 pg/μl)	+
Běh č. 18	Citlivost (1 pg/μl)	+

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

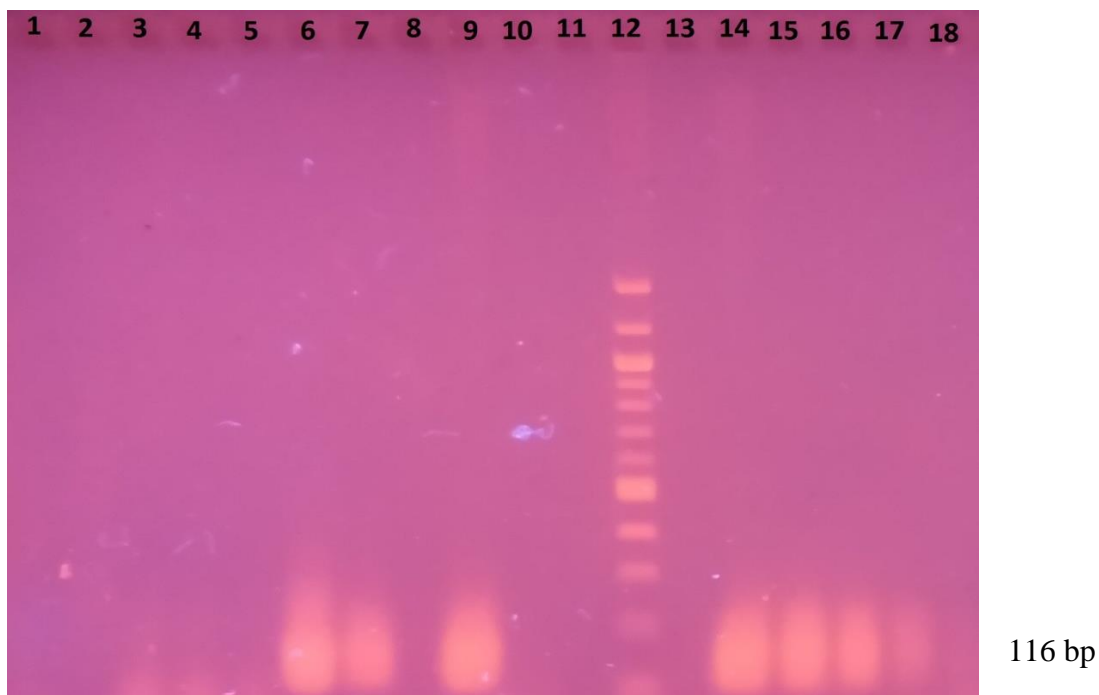


Obr. č. 14: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (102 bp) specifického pro genetický determinant gassericinu K7B – aktivní protein

Tabulka č. 26: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro genetický determinant gassericinu K7B – aktivní protein na gel

		Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	-
Běh č. 2	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 3	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 4	<i>L. sakei</i>	-
Běh č. 5	<i>L. gasseri K7</i>	-
Běh č. 6	RL 2P	-
Běh č. 7	RL 2	++
Běh č. 9	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri K7</i>)	+++
Běh č. 11	Negativní kontrola	-
Běh č. 12	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 14	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 15	Citlivost (1 ng/μl)	++
Běh č. 16	Citlivost (100 pg/μl)	+
Běh č. 17	Citlivost (10 pg/μl)	-
Běh č. 18	Citlivost (1 pg/μl)	-

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován



Obr. č. 15: Agarózová gelová elektroforéza produktu PCR (116 bp) specifického pro genetický determinant gassericinu K7B – imunitní protein

Tabulka č. 27: Schéma nanesení produktů PCR specifických pro genetický determinant gassericinu K7B – imunitní protein na gel

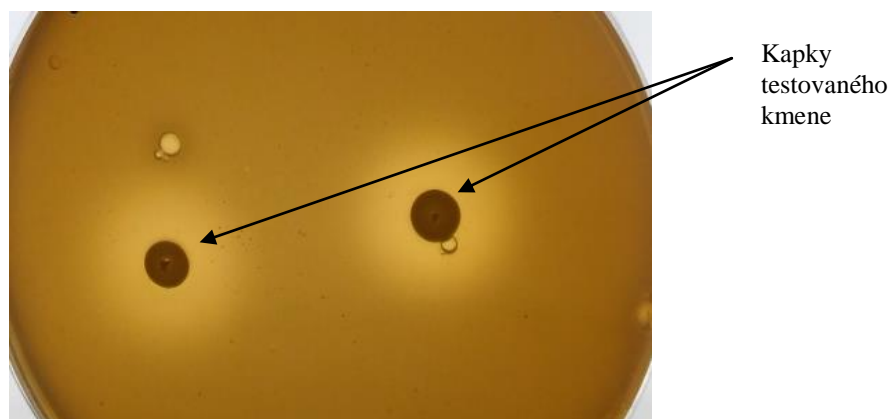
		Přítomnost produktu PCR
Běh č. 1	RL 26P	-
Běh č. 2	IM 398 (22.5. 2012)	-
Běh č. 3	RL 22P (13.4. 2013)	-
Běh č. 4	<i>L.gasseri K7</i>	-
Běh č. 5	<i>L.sakei</i>	-
Běh č. 6	RL 2P	+++
Běh č. 7	RL 2	+++
Běh č. 9	Pozitivní kontrola (<i>L. gasseri K7</i>)	+++
Běh č. 10	Negativní kontrola	-
Běh č. 12	Standard Malamité (žebříček 100 bp)	
Běh č. 14	Citlivost (10 ng/μl)	+++
Běh č. 15	Citlivost (1ng/μl)	++
Běh č. 16	Citlivost (100 pg/μl)	++
Běh č. 17	Citlivost (10 pg/μl)	+
Běh č. 18	Citlivost (1 pg/μl)	-

-produkt PCR nebyl detekován, + produkt PCR byl slabě detekován, ++ produkt PCR byl silně detekován, +++ produkt PCR byl velmi silně detekován

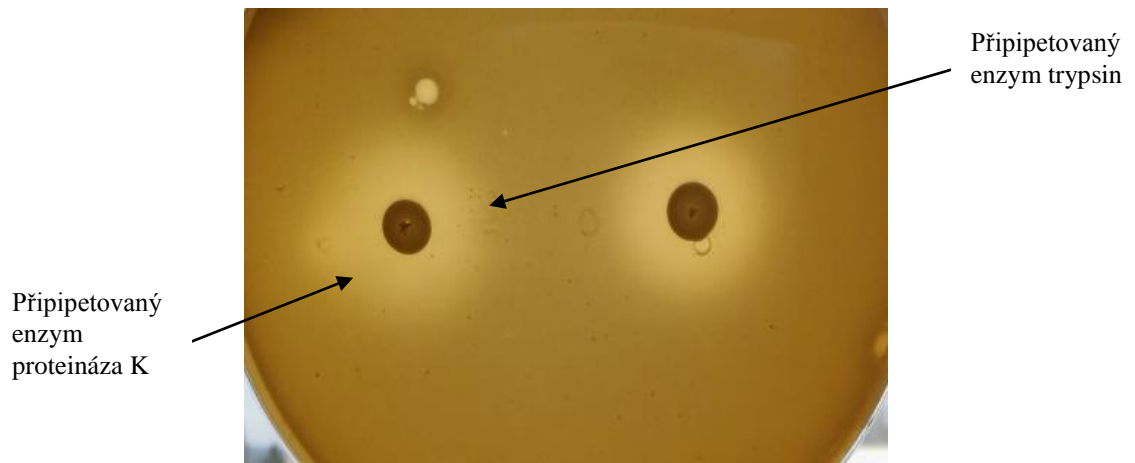
4.4. Agarózový kapkový spot-test

U bakteriálních kmenů (*L. gasseri* K7, RL 2, RL 2P, RL 22P, RL 26P), které by měly produkovat antimikrobiální látky, resp. bakteriociny, byl proveden agarózový kapkový test. Postup práce při přípravě bakteriálních kapek a jeho samotné provedení je popsáno v kapitole 3.2.6.

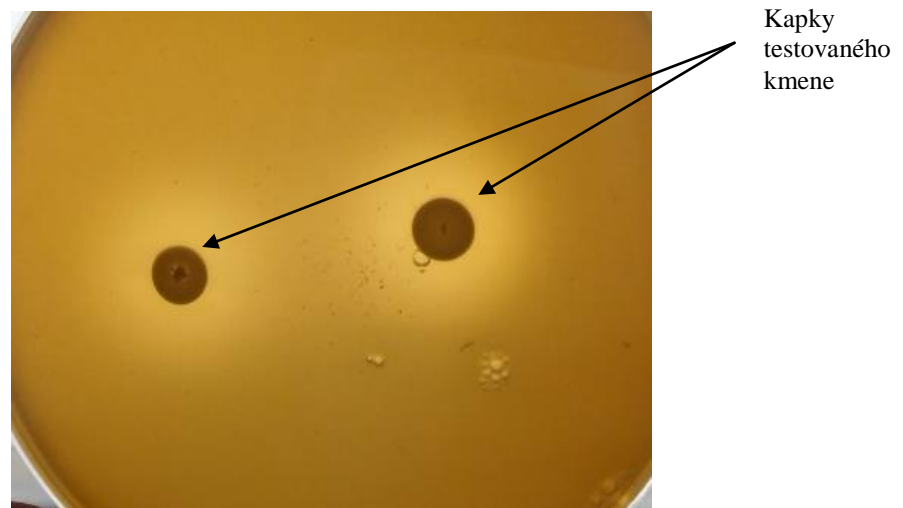
Po přelití bakteriálních spotů indikátorovým kmenem (*L. sakei*), došlo k vytvoření inhibičních zón u všech testovaných bakteriálních kmenů. Jako modelové ukázky byly vybrány kmeny *L. gasseri* K7 a RL 26P (obr. č. 16 a 18). Ke vzniklým inhibičním zónám byly přikapávány enzymy proteináza K (10 mg/ml) a trypsin (10 mg/ml) pro potvrzení, že vyprodukované bakteriociny jsou bílkovinné povahy. Enzymy byly přikapnuty k okraji inhibiční zóny a jejich následným účinkem měla být tato zóna zúžena. K slabému zúžení inhibičních zón došlo po přikapnutí enzymů u všech testovacích kmenů. Můžeme tedy říci, že bakteriociny produkované vybranými kmeny mají bílkovinný charakter. Jako modelové ukázky výsledků kapkového testu byly vybrány kmeny *L. gasseri* K7 a RL 26P (obr. č. 17 a 19).



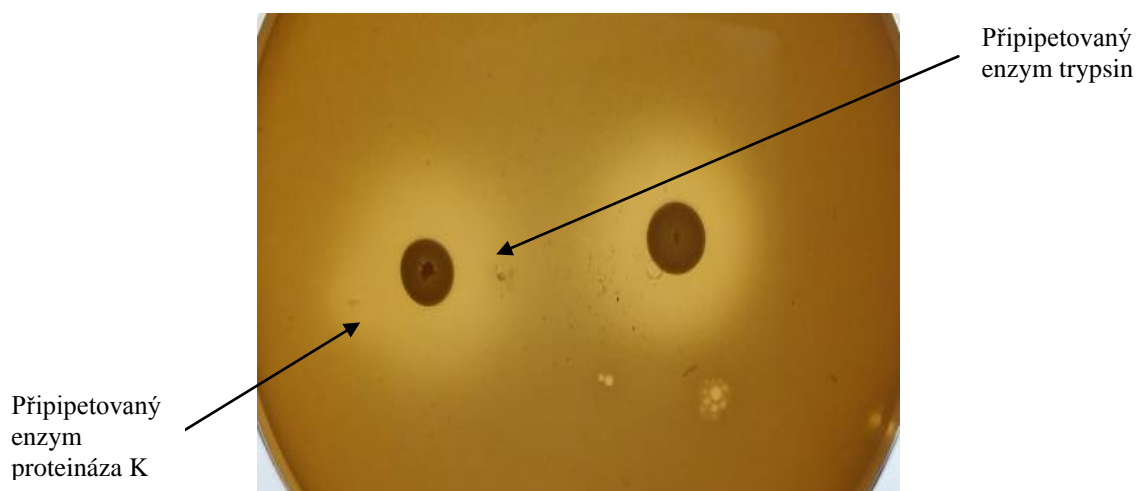
Obr. č. 16 : Testovaný kmen *L. gasseri* K7 – vytvoření inhibičních zón



Obr. č. 17 : Testovaný kmen *L. gasseri* K7 – zúžení inhibičních zón v důsledku aplikace enzymů



Obr. č. 18: Testovaný kmen RL 26P – vytvoření inhibičních zón



Obr. č. 19: Testovaný kmen 26P – zúžení inhibičních zón v důsledku aplikace enzymů

4.5. Specifita primerů

Bioinformatická analýza nukleotidových sekvencí byla provedena pomocí programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který je dostupný na webových stránkách: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

Porovnáváním jednotlivých nukleotidových sekvencí se zjišťovala specifita a nespecifita použitých primerů při specifických PCR reakcích (kapitola 3.2.4., tabulka č. 3).

Tabulka č. 28: Primery specifické pro *L. plantarum*:

Primery	Sekvence (5' → 3')	Reference
Lfpr Plan II	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT TTACCTAACGGTAAATGCGA	(Walter et al. 2000)

Lactobacillus plantarum kmen LZ95, kompletní genom

Lactobacillus plantarum kmen 5-2, kompletní genom

Tabulka č. 29: Primery specifické pro *L. gasseri*:

Primery	Sekvence (5' → 3')	Reference
Gas I Gas II	GAGTGCGAGAGCACTAAAG CTATTTC AAGTTGAGCCCCTCT	(Walter et al. 2000)

Lactobacillus gasseri kmen 130918, kompletní genom

Lactobacillus gasseri kmen ATCC 33323, kompletní genom

Vložení nukleotidových sekvencí primerů použitých při zařazování jednotlivých bakteriálních kmenů do druhů rodu *Lactobacillus* bylo potvrzeno, že tyto primery jsou specifické pro daný mikroorganismus.

5. ZÁVĚREČNÉ SHRnutí

Bakterie mléčného kvašení jsou velmi významnou součástí některých potravinových výrobků. Produkci antimikrobiálních látek nachází uplatnění, jak již bylo zmíněno, v potravinářském průmyslu, kdy se využívají jednak k prodloužení životnosti potravin a dále je to ochrana před vlivy nežádoucích patogenních mikroorganismů. V posledních letech se do popředí dostává využití antimikrobiálních látek, respektive bakteriocinů pro aktivní balení potravin. Důležité místo nacházejí bakteriociny i ve farmaceutickém průmyslu, jelikož se jedná o možnou náhradu za antibiotika.

Bakteriociny jsou velmi rozmanitou skupinou látek a pro jejich plné využití je nutné uskutečnit další studie a testování.

Byly testovány celkem 4 bakteriální kmeny. První část této diplomové práce byla zaměřena na charakterizaci a druhovou identifikaci rodu *Lactobacillus*. Identifikace probíhala pomocí specifické PCR pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus* a druhové zařazení. Výše zmíněná metoda prokázala, že jeden kmen byl identifikován jako *L. plantarum*, zbylé tři kmeny jako *L. gasseri*. Všechny testované kmeny byly tedy identifikovány a zařazeny do druhů.

Amplifikovaná bakteriální DNA byla dále pomocí specifických primerů použita na detekci genů kódujících produkci bakteriocinů (gassericin K7A, gassericin K7B a gassericin T). Byla potvrzena produkce gassericinu K7B a gassericinu T u kmenů *L. gasseri* K7, RL 2, RL 2P, RL 22P a RL 26P. Produkce gassericinu A nebyla prokázána u žádného z testovaných kmenů.

Tabulka č. 30: Druhové zařazení a produkce bakteriocinů u testovaných bakteriálních kmenů

Testované kmeny	Druhové zařazení	Produkce bakteriocinů
RL 2	<i>L. gasseri</i>	gassericin K7B a gassericin T
RL 2P	<i>L. gasseri</i>	gassericin K7B a gassericin T
RL 22P	<i>L. gasseri</i>	gassericin K7B a gassericin T
RL 26P	<i>L. plantarum</i>	gassericin K7B a gassericin T

Další část této práce byla zaměřena na detekci genetických determinantů gassericinu K7A a gassericinu K7B. U obou gassericinů byl testován komplementární, aktivní a imunitní protein. Vzhledem k tomu, že nebyla prokázána produkce bakteriocinu gassericinu K7A, tak ani PCR specifická pro genetický determinant toho bakteriocinu neprokázala jeho přítomnost. Gassericin K7B – komplementární protein byl prokázán u

kmenů *L. gasseri* K7, RL 2P a RL 26P. Aktivní protein byl detekován pouze u kmene RL 2 a imunitní protein u kmenů RL 2 a RL 2P.

Pro potvrzení produkce antimikrobiálních látek byla zvolena i mikrobiologická metoda, tzv. agarózový kapkový spot-test. Indikátorovým kmenem byl *L. sakei* IM 398. Testování proběhlo u kmenů *L. gasseri* K7, RL 2, RL 2P, RL 22P a RL 26P. U všech těchto kmenů byla prokázána produkce antimikrobiálních látek. S využitím enzymů (trypsin a proteináza K) se zjišťovalo, zda se jedná o antimikrobiální látky bílkovinného původu. Enzymy byly připipetovány k vytvořeným inhibičním zónám a v tomto místě došlo i k jejich zúžení (jedná se tedy o antimikrobiální látky bílkovinné povahy).

V poslední části této práce byla zjišťována specifická a nespecifická prumerů použitých při druhové identifikaci. Pomocí programu Primer-BLAST byla potvrzena specifická příslušných prumerů pro daný mikroorganismus.

6. SEZNAM LITERATURY

- **ABEE, T.**, 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 129: 1–9.
- **ARQUÉS, J. L., E. RODRIGUÉZ, S. LANGA, J. M. LANDETE & M. MEDINA**, 2015. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens. *BioMed Research International* vol. 2015: 1–10.
- **BALCIUNAS, E. M., F. A. C. MARTINEZ, S. D. TODOROV, B. D. G. de M. FRANCO, A. CONVERTI & R. P. de S. OLIVEIRA**, 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* vol. 32: 134–142.
- **BERNARDEAU, M. & M. GUGUEN**, 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: Long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS microbiology reviews* vol. 30: 487–513.
- **BERNARDEAU, M., J. P. VERNOUX, S. HENRI-DUBERNET & M. GUÉGUEN**, 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products* vol. 126: 278–285.
- **CANIC, B. & I. ROGELJ**, 2003. Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasser* K7. *Journal of Dairy Research* vol. 70: 199–203.
- **CAPLICE, E. & G. F FITZGERALD**, 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* vol. 50: 131–149.
- **DUBERNET, S., N. DESMASURES & M. GUÉGUEN**, 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters* vol. 214: 271–275.
- **ESCHENBACH, D. A., P. R. DAVICK, B. L. WILLIAMS, S. J. KLEBANOFF, K. YOUNG-SMITH, C. M. CRITCHLOW & K. K. HOLMES**, 1989. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 27: 251–256.
- **FELIS, G. E. & B. POT**, 2014. The family Lactobacillaceae. In: Wilhelm H. HOLZAPFEL a Brian J. B. WOOD, ed. *Lactic Acid Bacteria* vol. 4: 245–247.
- **GÖRNER, F. & E. VALÍK**, 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé centrum. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

- **HAARMAN, M. & J. KNOL, 2006.** Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 72: 2359–2365.
- **HERTZBERGER, R., J. ARENTS, H. L. DEKKER, R. D. PRIDMORE, C. GYSLER, M. KLEEREBEZEM & M. J. T. de MATTOS, 2014.** H₂O₂ Production in Species of the Lactobacillus acidophilus Group: a Central Role for a Novel NADH-Dependent Flavin Reductase. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 80: 2229–2239.
- **HOLZAPFEL, W. H., P. HABERER, R. GEISEN, J. BJÖRKROTH & U. SCHILLINGER, 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* vol. 73: 365S–373S.
- **IBRAHIM, S. A., H. YANG & C. W. SEO, 2008.** Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chemistry* vol. 109: 137–143.
- **KADLEC, P., K. MELZUCH & M. VOLDŘICH, 2012.** *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing. 569 s. ISBN 978-80-7418-145-0.
- **KAUR, I. P., K. CHOPRA & A. SAINI, 2002.** Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 15: 1–9.
- **KAWAI, Y., B. SAITOH, O. TAKAHASHI, H. KITAZAWA, T. SAITO, H. NAKAIMA & T. ITOH, 2000.** Primary Amino Acid and DNA Sequences of Gassericin T, a Lactacin F-Family Bacteriocin Produced by Lactobacillus gasseri SBT2055. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* vol. 64: 2201–2208.
- **McGINNIS, S. & T. L. MADDEN, 2004.** BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* vol. 32: W20–W25.
- **NAGHMOUCHI, K., C. LE LAY, J. BAAH & D. DRIDER, 2012.** Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of Pseudomonas fluorescens and antibiotic-resistant variants. *Research in Microbiology* vol. 163: 101–108.
- **NILSSON, L., H. HENRIK HUSS & L. GRAM, 1997.** Inhibition of Listeria monocytogenes on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *International Journal of Food Microbiology* vol. 38: 217–227.
- **PARADA, J. L., C. R. CARON, A. B. P. MEDEIROS & C. R. SOCCOL, 2007.** Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* vol. 50: 512–542.

- **PASCUAL, L. M., M. B. DANIELE, W. GIORDANO, M. C. PÁJARO & I. L. BARBERIS, 2008.** Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology* vol. 56: 397–402.
- **PEREZ, R. H., T. ZENDO & K. SONOMOTO, 2014.** Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories* vol. 13: S3.
- **RAMESH, A. & S. MUKHERJEE, 2015.** Bacteriocin producing probiotic *Lactobacillus plantarum* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to extracellular matrix (ECM): Quantitative insight and implications in antibacterial therapy. *Journal of Medical Microbiology* vol. 64: 1514–1526.
- **ROSYPAL, S., 2003.** *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia. 797 s. ISBN 80-7183-268-5.
- **SAMBROOK, J. & D. W. RUSSELL, 2001.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344 pp. ISBN 0-87969-577-3.
- **SEDLÁČEK, I., 2007.** *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0.
- **SINGLETON, P. & D. SAINSBURY, 2006.** *Dictionary of microbiology and molecular biology*. Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley. 895 pp ISBN 9780470035450.
- **SONOMOTO, K. & A. YOKOTA, ed., 2011.** *Lactic acid bacteria and bifidobacteria: current progress in advanced research*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 286 pp. ISBN 978-1-904455-82-0.
- **ŠMARDA, J., 2005.** *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- **ŠPANOVÁ, A. & B. RITTICH, 2010.** *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- **TODOROV, S. D., 2009.** Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. *Brazilian Journal of Microbiology* vol. 40: 209–221.
- **TREVEN, P., K. TURKOVA, A. TRMČIĆ, T. OBERMAJER, I. ROGELJ & B. B. MATIJAŠIĆ, 2013.** Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. *Folia Microbiologica* vol. 58: 623–630.
- **TURKOVÁ, K., 2014.** *Studium probiotických bakterií mléčného kvašení produkujících antimikrobiální látky: dizertační práce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí dizertační práce Alena Španová

- **WALKER, P., P. RHUBART-BERG, S. MCKENZIE, K. KELLING & R. S. LAWRENCE, 2005.** Public health implications of meat production and consumption. *Public Health Nutrition* vol. 8: 348–356.
- **WALTER, J., G. W. TANNOCK, A. TILSALA-TIMISJARVI, S. RODTONG, D. M. LOACH, K. MUNRO & T. ALATOSSAVA, 2000.** Detection and Identification of Gastrointestinal Lactobacillus Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 66: 297–303.
- **YANG, S., C. LIN, C. T. SUNG & J. FANG, 2014.** Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* vol 5: 1–10.
- **YE, J., G. COULOURIS, I. ZARETSKAYA, I. CUTCUTACHE, S. ROZEN & T. L. MADDEN, 2012.** Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* vol. 13: 134.
- **ZACHAROF, M. P. & R. W. LOVITT, 2012.** Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *3rd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2012), April 7-8, 2012* vol. 2: 50–56.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BMK	bakterie mléčného kvašení
GIT	gastrointestinální trakt
GRAS	(Generally Recognized As Safe) všeobecně považovány za bezpečné
PCR	polymerázová řetězová reakce
ROS	(Reactive Oxygen Species) volné radikály
PK	pozitivní kontrola
NK	negativní kontrola
WHO	(World Health Organization) Světová zdravotnická organizace
BLAST	(Basic Local Alignment Search Tool)
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CIZ	směs chloroformu a izoamylalkoholu
SDS	(sodium dodecyl sulphate) dodecylsulfát sodný
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
MRS	de Mann, Rogosa a Sharpe medium

8. PŘÍLOHA

Postup práce při zjišťování specifičnosti primerů v programu Primer-BLAST:

1. Do vyhledavače zadat webovou adresu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface. The 'PCR Template' section has a text input field for 'Enter accession, gi, or FASTA sequence' with a red '2.' next to it. Below it are 'Forward primer' and 'Reverse primer' fields. The 'Primer Parameters' section includes fields for 'Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)' and 'Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)', both with red '3.' markers. Other parameters include PCR product size, number of primers to return, and primer melting temperatures.

2. Při ověřování již navržených primerů není potřeba vyplňování sekvence (pozn.: v případě tvorby návrhů nových primerů, však sekvenci vyplňujeme – například ve FASTA formátu)
3. Vložit sekvenci primerů ve směru 5' → 3'

The screenshot shows the 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' section of the Primer-BLAST interface. The 'Search mode' dropdown is set to 'Automatic' with a red '4.' next to it. The 'Database' is set to 'Refseq mRNA'. The 'Organism' dropdown is set to 'Homo sapiens' with a red '5.' next to it. At the bottom, the 'Get Primers' button is highlighted with a red '6.'.

4. V databázích – vybrat položku nr

5. Vybrat cílový organismus – například *Lactobacillus gasseri*,...
6. Odkliknout políčko Get Primers