Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích

Bakalářská práce

ANALÝZA ADHERENCE PROBIOTICKÝCH PROKARYOT NA EUKARYOTNÍ BUNĚČNOU POPULACI V MODELU *IN VITRO*

Blanka Florová

Školitel: Ing. Vítězslav Březina, CSc.

Školitel-specialista: PharmDr. Hana Kiňová Sepová

České Budějovice 2010

Florová, B. (2010): Analýza adherence probiotických prokaryot na eukaryotní buněčnou populaci v modelu *in vitro* [Analysis of the adherence of probiotic prokaryotes to eukaryotic cell population on *in vitro* model]. Bc Thesis, in Czech – 29 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

We evaluated binding and interaction between eukaryotic (HeLa cells) and prokaryotic (*Lactobacillus*, *Enterococcus*) cells and determine the degree of adhesivity of prokaryotic to eukaryotic cells. As eukaryotic cells human cervical cancer cells (HeLa cells) were used and as a prokaryotic agent lactic acid bacteria ***Lactobacillus plantarum*** CCDM 92, ***L. casei*** CCDM 650 and ***Enterococcus faecium*** CCDM 922, gained from Milcom a.s., were used. There were used optical microscopy, microcinematography, scanning electron microscopy and statistical evaluation of difference of two relative values. Strain *E. faecium* CCDM 922 has the strongest ability to adhere to HeLa cells (73.76%), the lowest adhesivity was determined in strain *L. casei* CCDM 650 (45.68%); in the case of *L. plantarum* CCDM 92 it was 46.30%. Statistically significant difference in ability to adhere to surface of HeLa cells was observed between strains *L. casei* CCDM 650 and *E. faecium* CCDM 922, *L. plantarum* CCDM 92 and *E. faecium* CCDM 922. Statistical significant difference in this ability between strains *L. casei* CCDM 650 a *L. plantarum* CCDM 92 was not found. The morphological differences between HeLa cells co-cultivated with bacterial strains and HeLa cells cultivated alone were observed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne .....

Blanka Florová

Poděkování

Děkuji především svému školiteli Ing. Vítězslavu Březinovi, CSc. za odborné rady, pomoc při provádění pokusů a podporu. Velké díky PharmDr. Haně Kiňové Sepové zejména za trpělivost a pomoc. Mé poděkování patří i všem pracovníkům v Centru biologických technologií v Nových Hradech, kteří mi byli nápomocni.

Práce byla řešena v návaznosti na grant MŠMT Gastprobio "Identifikace a charakterizace nových kmenů bakterií s probiotickými vlastnostmi určených pro prevenci civilizačních onemocnění", č. 2B 08068.

Obsah

1 Úvod ... 1
1.1 Probiotické mikroorganismy ... 1
1.2 *Lactobacillus* spp. ... 2
1.3 *Enterococcus* spp. ... 3
1.4 HeLa buňky ... 5
1.5 Adhezivita mikroorganismů ... 5
1.6 Cíle práce ... 8
2 Materiál a metodika ... 9
2.1 Kultivační média, chemikálie a přístrojová technika ... 9
2.1.1 Média ... 9
2.1.2 Chemikálie a složení roztoků ... 9
2.1.3 Přístroje ... 9
2.2 Použité mikroorganismy a tkáňové kultury ... 10
2.2.1 Mikroorganismy ... 10
2.2.2 Tkáňové kultury ... 10
2.3 Bakteriální kultury ... 10
2.3.1 Kultivace *Lactobacillus* spp. a *Enterococcus* spp. ... 10
2.3.2 Příprava bakteriálních suspenzí ... 11
2.4 Kultivace HeLa buněk ... 11
2.5 Skenovací elektronová mikroskopie ... 12
2.5.1 Úvod ... 12
2.5.2 Koinkubace HeLa buněk s laktobacily a enterokoky ... 13
2.6 Optická mikroskopie ... 11
2.6.1 Úvod ... 11
2.6.2 Koinkubace HeLa buněk s laktobacily a enterokoky ... 11
2.6.3 Vyhodnocování preparátů ... 12
2.7 Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou ... 12
2.8 Statistická analýza ... 13
3 Výsledky ... 14
3.1 Kvantifikace schopnosti prokaryotické buňky adherovat na povrch eukaryotické buňky ... 14
3.2 Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou ... 16

3.3 Studium vztahu eukaryotních a prokaryotních buněk a jejich vzájemné vazby..... 18
4 Diskuze..... 20
5 Závěr..... 23
6 Literatura..... 24
7 Seznam zkratek a symbolů..... 29

1 Úvod

1.1 Probiotické mikroorganismy

Slovo „probiotika“ pochází z řečtiny a znamená „pro život“, z řeckého „pro bios“. Potravinářská a polnohospodářská organizace („Food and Agriculture Organization of the United Nations”, FAO) a Světová zdravotnická organizace („World Health Organization“, WHO) (2001) charakterizuje probiotika jako „živé mikroorganismy, které pokud jsou přijímané v adekvátním množství, mají pozitivní vliv na hostitele.“

Probiotické účinky mikroorganismů se vztahují na jednotlivé druhy a kmeny. Zdraví prospěšné účinky vykazují některé kmeny rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactoccocus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* a *Bacillus*. Přípravky obsahující tyto kmeny jsou dostupné v lékárnách, např. Lactobacillus acidophilus cps. 75 (Rougier, s.r.o., Praha), Harmony Line-Enterococcus tob.60 (Ivax Pharmaceuticals, s.r.o., Opava - Komárov), Biopron9 tob. 60 (Valosun a.s., Brno) obsahuje bifidobakterie, laktobacily, streptokoky a laktokoky, Nutrolin-B kapsle želat. tob. 20 (Cipla Ltd., Bombay, India) obsahuje *Bacillus coagulans*, Akut Biotic tob. 30 (Valosun a.s., Brno) obsahuje kromě laktobacilů probiotické kvasinky *Saccharomyces boulardii* a probiotické vlákniny (fruktooligosacharidy, inulin).

Účinky a jejich mechanismus působení se mohou lišit. Nejzřetelnější účinky se týkají změn střevní mikroflory po požití probiotik. Tento jev může být, podle Fullera (1991), způsoben soupeřením o živiny a o místo pro adhezi mezi přijatými mikroorganismy a potenciálními patogeny. Jiný způsob účinku je produkce antimikrobiálních látek. Mohou se také přizpůsobit mikrobiálnímu metabolismu ve střevech, což lze zjistit např. změnou enzymatické aktivity, změnou pH nebo změnou hladiny cholesterolu (Orrhage a kol., 2005).

Existuje několik podmínek, které musí mikroorganismy splňovat, pokud mají být používané jako probiotika (FAO/WHO, 2002; Kim, 1988):

- měly by to být mikroorganismy lidského původu, které jsou součástí trávícího traktu
- schopnost přežít v kyselém prostředí žaludku a alkalickém prostředí dvanáctníku
- schopnost adherovat na sliznici a na lidské epitelové buňky a buňkové linie
- antimikrobiální aktivita vůči potenciálně patogenním bakteriím
- schopnost redukovat adhezi patogenů na povrch buněk

- schopnost hydrolyzovat konjugované žlučové kyseliny
- rezistence vůči spermicidům
- nepatogenní, netoxické
- odolnost vůči technologickému zpracování
- schopnost ovlivňovat lokální metabolické aktivity
- schopnost komunikovat s imunitními buňkami
- vysoká životaschopnost buněk

Jak už bylo zmíněno, probiotické účinky jednotlivých kmenů jsou odlišné. Na základě tohoto poznatku musí být podle FAO/WHO (2001) provedena kmenová identifikace (genová typizace), např. metodou elektroforézy v pulzním elektrickém poli (PFGE). Jako první se doporučuje udělat fenotypové testy, poté genovou identifikaci, např. použitím metody DNA/DNA hybridizace, sekvenování 16S rDNA nebo jiné mezinárodně uznávané metody. Pro potvrzení správné identifikace se používá RDP - Ribosomal Database Project (www.cme.msu.edu/RDP/) nebo GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

1.2 *Lactobacillus* spp.

Rod *Lactobacillus* je největší skupinou mezi mléčnými bakteriemi, který v současnosti zahrnuje více než 120 druhů a 20 poddruhů a jeho počet se zvyšuje každým rokem. Zahrnuje gram pozitivní (G+), fakultativně anaerobní, nepohyblivé, kataláza negativní, nesporulující pravidelné tyčinky. Jsou acidofilní, se složitými nutričními nároky. Některé druhy a kmeny jsou široce používány jako startovací kultury řídící fermentaci potravin a krmiv; zejména mléčných výrobků (jogurty, sýry), fermentovaného masa (salámy, klobásy), fermentované zeleniny (olivy, okurky) nebo kynutého pečiva. Laktobacily jsou přirozenou součástí gastrointestinálního a urogenitálního traktu.

V žaludku se vyskytuje 10^3-10^4 CFU[1]/g laktobacilů spolu se streptokoky a bifidobakteriemi. Kvůli kyselému prostředí v žaludku je množení většiny mikroorganismů zpomalené a prežít jsou schopné zejména mléčné bakterie. Pohyby tenkého střeva zabraňují přemnožení mikroorganismů, ale v distální části střeva výrazně roste počet bakterií. Počet laktobacilů je v této části 10^3-10^7 CFU/g.

[1] CFU (colony forming unit – jednotka tvořící kolonie) – množství životaschopných buněk, ve kterých kolonie představuje soubor buněk získaných z jedné progenitorové buňky.

1.3 *Enterococcus* spp.

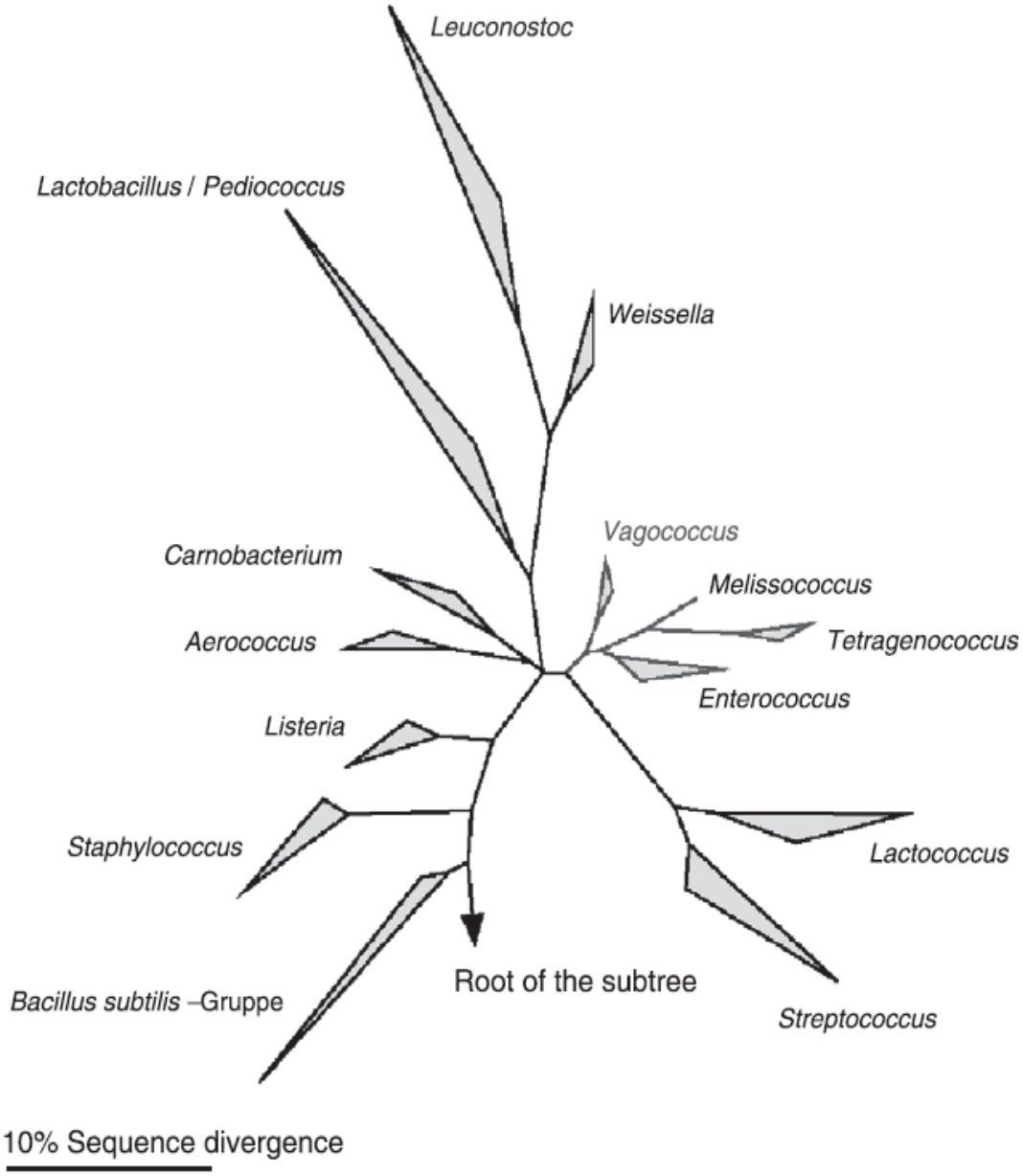
Rod *Enterococcus* patří do skupiny mikroorganismů známých jako bakterie mléčného kvašení. Enterokoky jsou G+, nesporulující, kataláza negativní, fakultativně anaerobní koky, které se vyskytují jednotlivě, v párech, nebo v řetězcích. V současnosti tento rod zahrnuje 28 druhů (Foulquié a kol., 2005). Některé z nich hrají důležitou roli při zrání ovčích a kozích sýrů, kterým dodávají typickou chuť a vůni, mimo jiné se používají jako startovací kultury či doplněk krmiva, jsou přítomné ve fermentovaných výrobcích, např. v uzeninách nebo v olivách. Enterokoky tvoří velkou část autochtonních bakterií spojených se zažívacím traktem savců.

Jakmile se dostanou do životního prostředí prostřednictvím lidských nebo zvířecích výkalů, jsou schopné kolonizovat různá místa díky své výjimečné schopnosti odolat nebo růst v nepříznivém prostředí mimo střeva. To znamená, že enterokoky nejsou spojené pouze s teplokrevnými živočichy, ale vyskytují se i v půdě, v povrchových vodách, na rostlinách a na zelenině. Díky schopnosti přežít nepříznivé podmínky, jako extrémní pH, teplotu či slanost, mohou enterokoky odolat podmínkám při výrobě potravin. Enterokoky mají schopnost produkovat bakteriociny, tzv. enterociny, což jsou malé peptidy s antimikrobiální aktivitou účinkující proti patogenním bakteriím, např. listeriím, čehož je možné využít při biokonzervaci fermentovaných potravin (Foulquié a kol., 2005).

Rod *Enterococcus* byl popsán teprve nedávno, když Schleifer a Kilpper-Bälz (1984) popsali *E. faecium* a *E. faecalis*. Porovnaním sekvencí genů pro 16S rRNA byly z rodu *Streptococcus* vyčleněné tři rody – rody *Enterococcus, Streptococcus* a *Lactococcus* (Obr. 1; Klein, 2003).

Nejdůležitějším faktorem pro hodnocení enterokoků (používaných jako probiotika nebo jako startovací kultury) je rezistence na glykopeptidová antibiotika, jako třeba na vankomycin či teikoplanin. Enterokoky patří mezi nejčastější nozokomiální patogeny a bylo prokázáno, že jsou příčinou endokarditidy, bakteriémie, infekce močových cest či centrálního nervového systému (Endtz a kol., 1999; Franz a kol., 1999). Proti některým nozokomiálním infekcím způsobeným enterokoky u jedinců se sníženou imunitou jsou při léčbě využívány glykopeptidová antibiotika (Woodford a Johnson, 1994).

Enterokoky by mohly hrát užitečnou roli v biokonzervaci nebo jako přídavek ke startovacím kulturám ke zlepšení organoleptických vlastností různých sýrů. Nicméně úplné vysvětlení složitých biochemických a ekologických jevů objasňujících fungování enterokoků v mléčných výrobcích je stále daleko (Giraffa, 2003).



Obr. 1: Fylogenetické postavení rodu *Enterococcus* prokázané 16S rRNA-dendrogramem G+ bakterií, včetně rodů *Lactococcus* a *Streptococcus* (podle Ludwig a kol., 1985). „Sequence divergence" – stupeň rozdílnosti v nukleotidové sekvenci mezi některými genovými skupinami.

1.4 HeLa buňky

HeLa buňky jsou rychle rostoucí buňky lidského původu izolované v padesátých letech dvacátého století z neoplazie.

V roce 1951 v nemocnici v Baltimore George Gey získal malý vzorek, který pocházel z rakoviny děložního čípku mladé černošské ženy přezdívané Henrietta Lacks, 30-ti leté matky. Nádor na děložním čípku roste obvykle pomalu a většina pacientů přežívá alespoň pět let po diagnostice. V tomto případě se podle gynekologa nejednalo o obyčejný nádor - byl purpurový a měkký, což bylo něco neobvyklého. Nereagoval na radioterapii a následně se ukázalo, že se jedná o žlázový nádor, neobvyklý adenokarcinom. Osm měsíců po diagnostikování nádoru Henrietta Lacks zemřela (Masters, 2002).

HeLa buňky se staly laboratorním modelem transformovaných buněk, které mohou být použité na výzkum nádorů. Nepoužívají se však jen pro výzkum neoplastické transformace, ale též v biomedicínských experimentech, zejména ke studiu biochemických pochodů fyziologických i patologických buněk v lidských tkáních, k identifikaci genů a chromozomů v somatických buněčných hybridech kontrolujících kancerogenitu v děložním čípku (Stanbridge a kol., 1981; Lichy a kol., 1992).

Obecně je lidský nádor, který roste v kultuře permanentně, řazen do skupiny buněčných linií, které získaly důležité fenotypové a genotypové změny. Přestože bylo izolováno několik dalších buněčných linií z různých typů lidských nádorů, HeLa buňky jsou stále nejvíce používané lidské buněčné linie (Masters, 2002).

1.5 Adhezivita mikroorganismů

Interakce probiotik s eukaryotními buňkami odkrývá, mimo jiné, i podstatu funkce probiotik, které mají významnou úlohu pro zdraví. Mikrobiální buňky s probiotickými vlastnostmi jsou v nosiči dopraveny potravou do gastrointestinálního traktu, kde svou účastí podporují celou řadu reakcí pozitivně ovlivňujících zdravotní stav. Výběr účinného a technologicky odolného mikroorganismu (např. z rodu *Lactobacillus*) je významným krokem při vývoji probiotického produktu. Při tomto výběru hraje podstatnou roli schopnost prokaryotní buňky adherovat na buňku eukaryotní, neboť pouze interakce mezi těmito buňkami vede k účinnějšímu konečnému efektu.

Adhezivita probiotik na střevní sliznici a epitelové buňky byla dlouho považována za jedno z nejdůležitějších kritérií výběru probiotických mikroorganismů. Adheze na střevní sliznici může zabránit vyplavení probiotických buněk, a proto umožňuje dočasnou

kolonizaci, modulaci imunitního systému a konkurenční vytěsnění patogenů (Bezkorovainy, 2001). Ačkoli je důkazů o přilnavosti probiotik na sliznici *in vivo* dosud málo, nedávné studie ukazují, že tato přilnavost skutečně může nastat a může tedy sloužit jako jeden z mechanismů působení probiotických mikroorganismů (Blum a kol., 1999).

Adhezivní vlastnosti probiotik jsou druhově specifické a faktory, jako jsou vlastnosti buněčné stěny a její složení (Gusils, 2002), případně i specifičnost hostitele, jsou nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími adhezivní vlastnosti. Nicméně existuje několik dalších faktorů ovlivňujících adhezivitu (viz. Tab. I)

Tab. I: Faktory ovlivňující adhezivní vlastnosti probiotických mikroorganismů (podle Lahtinena a Ouwehanda, 2009).

FAKTOR	STUDIE	VÝSLEDKY	LITERATURA
Nízké pH	Adheze probiotik na Caco-2 epitelové buňky	Zvýšená adheze Změny v adhezi kmenově závislé	Blum a kol., 1999; Greene a kol., 1994 Riedel a kol., 2006
Přítomnost žluči	Adheze probiotik na sliznici	Snížená adheze	Gueimonde a kol., 2005; Ouwehand a kol., 2001
Růstová fáze	Adheze kmene *L. fermentum* na keratinizující žaludeční epitel myší Adheze probiotik na Caco-2 epitelové buňky	Adheze vyšší během stacionární fáze v porovnání s exponenciální fází růstu Snížená přilnavost v průběhu logaritmické fáze, zvýšená v průběhu stacionární fáze	Savage, 1992 Blum a kol., 1999
Růstové médium	Adheze potenciálně probiotických kmenů na glykoproteiny získané ileostomií	Kultivační médium ovlivňuje adhezi	Ouwehand a kol., 2001
Získaná rezistence na kyselé prostředí	Adheze bifidobakterií rezistentních na působení kyselého prostředí na sliznici	Může v některých případech zvýšit adhezi	Collado a kol., 2006
Získaná rezistence na žluč	Adheze bifidobakterií rezistentních na působení žluče na sliznici	Může zvýšit adhezi	Gueimonde a kol., 2005
Endogenní	Adheze na sliznici	Endogenní mikroflóra	Ouwehand a kol.,

FAKTOR	STUDIE	VÝSLEDKY	LITERATURA
mikroflóra	v přítomnosti fekální nebo slizniční mikroflóry	neovlivňuje adhezi na sliznici *in vitro*	2004; Ouwehand a kol., 1999
Přítomnost jiných probiotických kmenů	Adheze kombinace probiotických kmenů na glykoproteiny získané ileostomií	Kombinace probiotik může mít synergický vliv na adhezi	Ouwehand a kol., 2000
	Adheze probiotik na prasečí střevní epitelové buňky IPEC-J2	Probiotika mohou snižovat adhezi jiných kmenů soutěžením o určitá adhezivní místa	Larsen a kol., 2007
Enzymy trávícího systému	Adheze probiotik na sliznici	Většinou snížená adheze	Ouwehand a kol., 2001
	Adheze kmene *Propionibacterium acidipropionici* na střevní buňky	Žádný vliv na adhezi	Zarate a kol., 2002
Vazba mykotoxinů	Adheze kmene *L. rhamnosus* GG na Caco-2 epitelové buňky	Snížená adheze, pokud je buňka vázána na mykotoxin	Kankaanpää a kol., 2000
Přítomnost lignanů	Adheze komerčních probiotik na sliznici	U některých kmenů zvýšená adheze	Lahtinen a kol., 2002
Přítomnost Ca^{2+} iontů	Adheze probiotických a lidských izolátů na Caco-2 epitelové buňky	Adheze na Ca^{2+} v některých případech nezávislá, v jiných na Ca^{2+} závislá	Bernet a kol., 1993; Bernet a kol., 1994; Chauviere a kol., 1992; Coconnier a kol., 1992
	Adheze probiotik na prasečí střevní epitelové buňky IPEC-J2	Adheze většiny kmenů s přítomností vápníku vzrostla	Larsen a kol., 2007
Přítomnost Mg^{2+} a Zn^{2+} iontů	Adheze probiotik na prasečí střevní epitelové buňky IPEC-J2	Adheze nebyla přítomností Mg^{2+} a Zn^{2+} iontů ovlivněna	Larsen a kol., 2007

1.6 Cíle práce

1) Sledování kinetiky a dynamiky adherence prokaryotní buňky (*Lactobacillus* spp. a *Enterococcus* spp.*)* k eukaryotní buňce (HeLa buňky)
   - *In vitro* kultivace eukaryotních savčích buněk (HeLa buňky)
   - Kultivace bakteriálních kultur (*Lactobacillus* spp. a *Enterococcus* spp.)
   - Kokultivace eukaryotních a prokaryotních buněčných populací
   - Příprava trvalých preparátů
   - Vyhodnocování pomocí optické mikroskopie
   - Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou

2) Studium vztahu eukaryotních a prokaryotních buněk a jejich vzájemné vazby
   - *In vitro* kultivace eukaryotních savčích buněk (HeLa buňky)
   - Kultivace bakteriálních kultur (zástupci rodů *Lactobacillus* spp. a *Enterococcus* spp.)
   - Kokultivace eukaryotních a prokaryotních buněčných populací
   - Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)

3) Vyhodnocování obrazových záznamů a statistická analýza výsledků

2 Materiál a metodika

2.1 Kultivační média, chemikálie a přístrojová technika

2.1.1 Média

Ke kultivaci laktobacilů byla použita tekutá živná půda MRS (de Man Rogosa Sharpe; Merck, Německo) obohacená o roztok 5% chloridu cysteinu v množství 0,1 ml na 1,0 ml média. Ke kultivaci enterokoků bylo použito médium M17 (Merck, Německo) s 1% obsahem glukózy.

HeLa buňky byly kultivované v obohaceném MEM médiu (Minimal Essential Medium Eagle; PAA, Rakousko). Obohacené MEM: MEM médium neobsahovalo antibiotika a bylo obohaceno o neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum a L-glutamin (vše PAA, Rakousko). V obohaceném MEM médiu byly ředěny bakteriální kultury.

2.1.2 Chemikálie a složení roztoků

- sterilní roztok PBS – fosfátový pufrovaný fyziologický roztok (NaCl 8,0 g/l, KCl 0,2 g/l, $Na_2HPO_4*12H_2O$ 2,89 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l; pH 7,3)
- 3% glutaraldehyd ve fosfátovém pufru (vzniká smícháním 4 dílů roztoku A a 1 dílu roztoku B; pH 7,2)
  - roztok A: $Na_2HPO_4*12H_2O$ 71,56 g/l, $Na_2HPO_4*2H_2O$ 35,6 g/l
  - roztok B: KH_2PO_4 27,2 g/l
- 0,2 mol/l fosfátový pufr (pH 7,2)
- 50% etanol
- 70% etanol
- barvivo May-Grünwald
- barvivo Giemsa-Romanowski
- směs kyseliny octové a metanolu v poměru 1:3
- aceton
- aceton:xylén v poměrech 1:1, 1:2, 1:4
- xylén

2.1.3 Přístroje

- Centrifuga: Jouan BR4, multifunction centrifuge, Thermo Electron Corporation, Francie

- Mikrocentrifuga: MiniSpin, Eppendorf, Německo
- Densitometr: Densi LA meter II, EMO, Česká republika
- Flowbox 1: Labox, Microbiological safety cabinets, Typ Bio 126, Česká republika
- Flowbox 2: Holten LaminAir, model 1,5, Thermo Electron Corporation, Francie
- Vortex 1: Lab dancer, IKA-Werke, Německo
- Vortex 2: MS1 minishaker, IKA Werke, Inc, USA
- Termostat na bakteriální kultury: Liebherr, TS 606, Německo
- Termostat na HeLa buňky: Steri-cycle CO_2 incubator, HEPA class 100, model 381, Thermo Electron Corporation, USA
- Skenovací elektronový mikroskop: Jeol JSM-6300 Scanning Microscope, Japonsko
- Digitální fotoaparát na mikroskopické snímky: Canon PowerShot G6, Canon, Japonsko
- Digitální fotoaparát na mikrokinematografii: Olympus C7070WZ, Olympus, Japonsko

2.2 Použité mikroorganismy a buněčné linie

2.2.1 Mikroorganismy

Bakteriální kmeny byly získány z České sbírky mlékárenských mikroorganismů (Milcom, Praha). Jednalo se o kmeny *Lactobacillus casei* CCDM 650, *L. plantarum* CCDM 92 a *Enterococcus faecium* CCDM 922.

2.2.2 Tkáňové kultury

Ke studiu adhezivity a interakce prokaryot byly použity jako zástupci eukaryotických buněk HeLa buňky, které jsou schopné neustálého dělení, jsou nenáročné na kultivační podmínky a rychle rostou.

2.3 Bakteriální kultury

2.3.1 Kultivace *Lactobacillus* spp. a *Enterococcus* spp.

Laktobacily rostly 48 h ve 3 ml tekuté živné půdy obohacené MRS v množství 0,1 ml bakteriální kultury na 1,0 ml média při 37 °C. Enterokoky byly kultivovány 48 h ve 3 ml média M17 s 1% obsahem glukózy v množství 0,1 ml bakteriální kultury na 1,0 ml média při 37 °C.

2.3.2 Příprava bakteriálních suspenzí

Kultury byly ředěny pomocí denzitometru na počet $1,5*10^8$ CFU/ml v obohaceném MEM médiu.

2.4 Kultivace HeLa buněk

HeLa buňky byly pasážovány po 48 hodinách a kultivovány v obohaceném MEM médiu bez obsahu antibiotik v 5% atmosféře CO_2 při 37 °C. Následně byla v experimentech použita 48 h kultura nasazena do 24 jamkových panelů (Greiner, Německo).

2.5 Optická mikroskopie

2.5.1 Úvod

Míra adhezivity jednotlivých bakteriálních kmenů na povrch HeLa buněk byla vyhodnocována pomocí optické mikroskopie. Na barvení byla použita barviva May-Grünwald a Giemsa-Romanowski. Barvivo May-Grünwald barví jádra a krevní buňky. Jedná se o saturovaný roztok eosinu v methylenové modři přidané do metanolu. Barvivo Giemsa-Romanowski se používá k barvení periferní krve a výtěrů kostní dřeně. Nejdůležitějšími složkami barviva jsou methylenová modř, azur B a eosin Y. Eosin Y barví cytoplazmu buněk oranžovou až růžovou barvou. Methylenová modř a azur B barví jádra různými odstíny modré až fialové. Giemsa-Romanowski se používá ke studiu morfologie červených krvinek. Jedná se o neutrální barvivo, v našem případě barvicí hlavně jádra.

2.5.2 Koinkubace HeLa buněk s laktobacily a enterokoky

Bakteriální kultury byly přidávány k HeLa buňkám v množství $1,5*10^8$ CFU/ml a inkubovány po dobu 24 h. Poté byly buňky dvakrát opláchnuty sterilním roztokem PBS a fixovány převrstvením směsí kyseliny octové a metanolu v poměru 1:3 na 10 min. Směs byla odsáta a sklíčka byla před dalším zpracováním ponechána k oschnutí v šikmé poloze, aby nepřischla ke dnu jamky.

Po oschnutí byly preparáty barveny pomocí barviva May-Grünwald a barviva Giemsa-Romanowski. Sklíčka byla nejprve zatopena přefiltrovaným barvivem May-Grünwald, ponechána 5 min na minishakeru a opláchnuta destilovanou vodou. Barvivo Giemsa-Romanowski bylo naředěno destilovanou vodou v poměru 1:10 a přefiltrováno

přes vatu. Takto naředěné barvivo bylo vneseno pipetou do jamek na buňky, panýlek položen na minishaker na 7 min a opět opláchnut destilovanou vodou. Sklíčka byla sušena v šikmé poloze.

Po usušení byly vzorky odvodňovány v aceton-xylenové řadě: aceton, aceton:xylén v poměrech 1:1, 1:2, 1:4 a nakonec xylén, po dobu 5 min. Po vyjmutí z xylenu byl vzorek ihned nalepen pomocí kanadského balzámu na podložní sklíčko.

2.5.3 Vyhodnocování preparátů

Míra adherence bakteriálních buněk na povrch HeLa buněk byla hodnocena pomocí optické mikroskopie. Pro kvantifikaci bylo počítáno, kolik z 1000 HeLa buněk mělo na svém povrchu naadherovanou alespoň jednu bakteriální buňku. Tyto výsledky byly poté statisticky vyhodnoceny. Pro dokumentaci a ilustraci adherence bakteriálních buněk na povrch HeLa buněk byly preparáty fotografovány.

2.6 Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou

Pro mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou byl použit kmen *L. casei* CCDM 650 a 48 h kultura HeLa buněk.

Do Petriho misky bylo položeno krycí sklíčko se 48 h kulturou HeLa buněk. Poté jsme do Petriho misky nanesli 2 ml obohaceného MEM média bez antibiotik a 1 ml bakteriální suspenze kmene *L. casei* CCDM 650 ($0,5*10^8$ CFU/ml). Snímky byly pořizovány po dobu 24 h každé dvě minuty v optickém mikroskopu.

2.7 Skenovací elektronová mikroskopie

2.7.1 Úvod

Pomocí SEM byla studována morfologie HeLa buněk, bakteriálních kmenů a jejich vzájemná interakce. Jednou z největších výhod elektronové mikroskopie je velká hloubka zaostření, rozsah výšek na vzorku je simultánně zaostřovaný. Při zvětšeních porovnatelných s optickým mikroskopem (např. 1000) má SEM hloubku zaostření 100x větší než optický mikroskop. Dalšími výhodami SEM je vynikající kontrast obrazu a relativně nekomplikovaná příprava vzorků při zobrazování povrchů.

2.7.2 Koinkubace HeLa buněk s laktobacily a enterokoky

Bakteriální kultury *L. casei* CCDM 650 a *E. faecium* CCDM 922 byly přidávány k HeLa buňkám v množství $1,5*10^8$ CFU/ml a inkubovány po dobu 24 h. Buňky byly dvakrát opláchnuty sterilním roztokem PBS a fixovány 3% glutaraldehydem ve fosfátovém pufru nejprve 20 min, poté 60 min. Vzorky byly vypírány třikrát po 10 min 0,2 mol/l fosfátovým pufrem (pH 7,2). Na závěr byly buňky odvodněny třikrát po 10 min 50% etanolem a třikrát po 10 min 70% etanolem. Po posledním proplachu byly preparáty převrstveny dostatečným množstvím 70% etanolu, panel utěsněn parafilmem a vzorky byly zpracovány v Laboratoři elektronové mikroskopie v Českých Budějovicích.

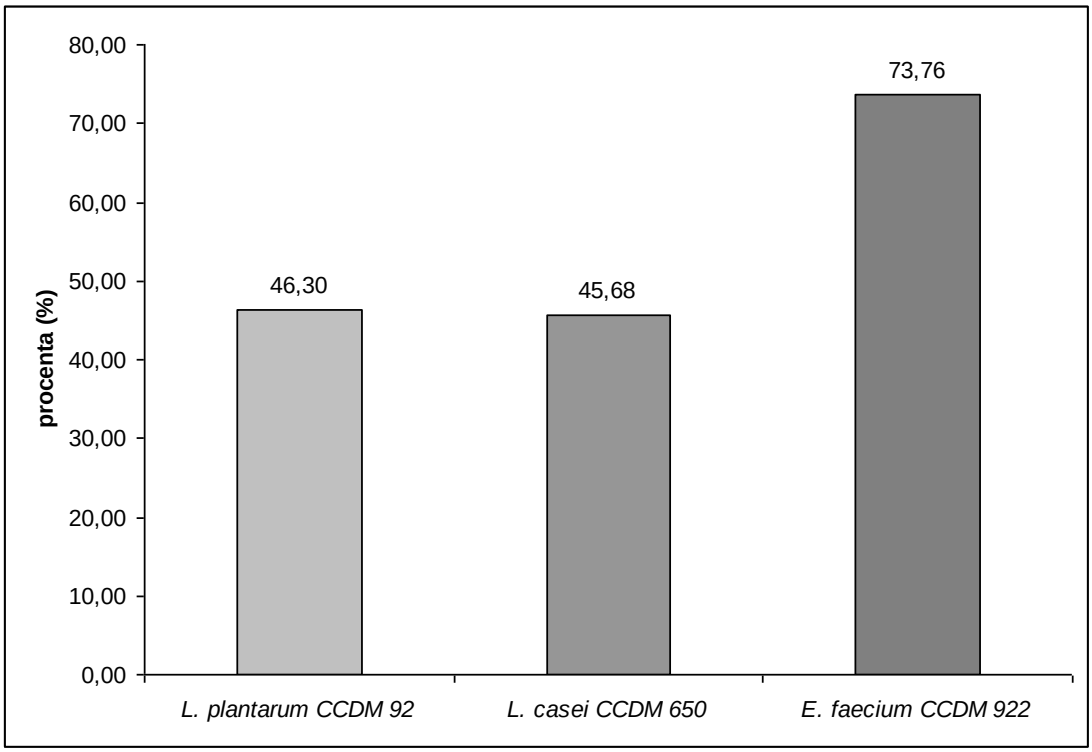
2.8 Statistická analýza

Míra adhezivity kmenů byla porovnávána navzájem pomocí Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot. Použití této metody nám umožnilo vyhodnotit, zda je míra adhezivity statisticky významně odlišná mezi jednotlivými kmeny.

3 Výsledky

3.1 Kvantifikace schopnosti prokaryotické buňky adherovat na povrch eukaryotické buňky

Míru adhezivity kmenů *L. plantarum* CCDM 92, *L. casei* CCDM 650 a *E. faecium* CCDM 922 (prokaryotické organismy) k HeLa buňkám (eukaryotické buňky) jsme hodnotili po 24 h koinkubaci pomocí optické mikroskopie. Za účelem kvantifikace jsme počítali, kolik z 1000 HeLa buněk mělo na svém povrchu naadherovanou alespoň jednu bakteriální buňku. Výsledky jsme pak statisticky zpracovali pomocí Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot. Pro porovnání míry adherence jednotlivých bakteriálních kmenů na povrch HeLa buněk jsme zaznamenané hodnoty vyjádřili procentuálně (Obr. 2). Nejvyšší míru adherence jsme zaznamenali v případě *E. faecium* CCDM 922 (73,76%; Obr. 3). Nižší hodnoty jsme zjistili u *L. plantarum* CCDM 92 (46,30%; Obr. 4) a u *L. casei* CCDM 650 (45,68%).



Obr. 2: Procento HeLa buněk adherovaných s bakteriálním kmenem, porovnání mezi jednotlivými kmeny.

Použitím Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot jsme určili, zda jsou rozdíly ve schopnosti vybraných prokaryotických kmenů adherovat na povrch

eukaryotické buňky statisticky významné nebo nevýznamné. Míra adherence na HeLa buňky se v případě *L. plantarum* CCDM 92 a *L. casei* CCDM 650 statisticky významně nelišila. Naopak v případě *E. faecium* CCDM 922 a *L. plantarum* CCDM 92, stejně jako u *E. faecium* CCDM 922 a *L. casei* CCDM 650, byla míra adherence statisticky významně odlišná (Tab. III).

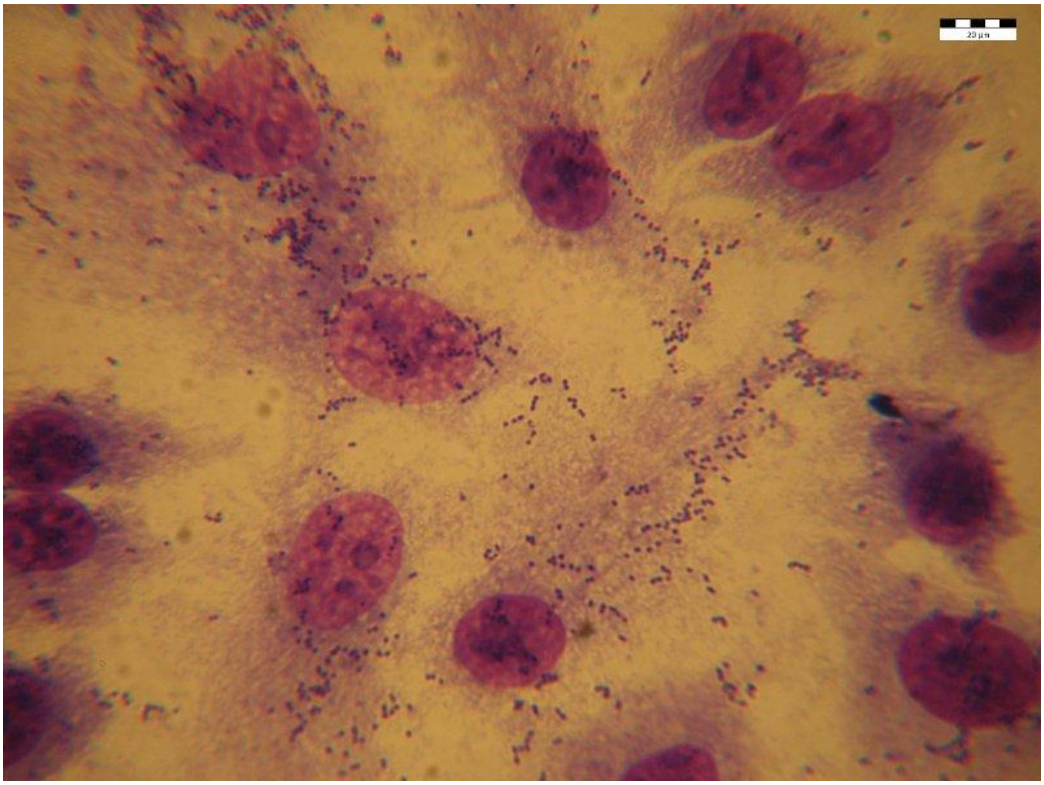
Tab. III: Statistické porovnání (Studentův t-test pro porovnání rozdílu dvoch nezávislých hodnot) rozdílů ve schopnosti bateriálních kmenů adherovat na povrch HeLa buněk. CCDM 92 – *L. plantarum* CCDM 92; CCDM 650 – *L. casei* CCDM 650; CCDM 922 – *E. faecium* CCDM 922.

CCDM 92	CCDM 92		
CCDM 650	ns	CCDM 650	
CCDM 922	**	**	CCDM 922

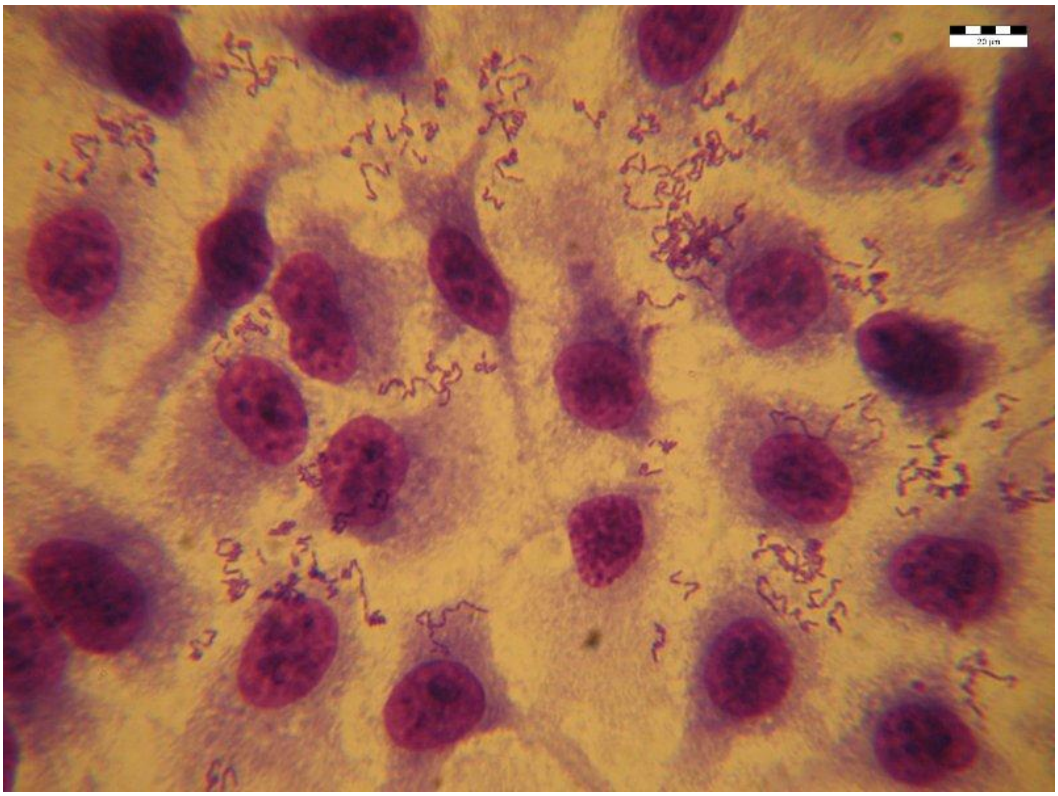
Vysvětlení ke statistickému vyhodnocení:

ns – nesignifikantní rozdíl

** - statisticky vysoko signifikantní údaj ($p < 0,01$)



Obr. 3: Buňky kmene *E. faecium* CCDM 922 naadherované na HeLa buňky. (Měřítko je 20µm).



Obr. 4: Kmen *L. casei* CCDM 650 koinkubovaný s HeLa buňkami. (Měřítko je 20μm).

3.2 Mikrokinematografické zobrazení vazby mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou

Na ilustraci vzniku, trvání a zániku vazby mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou jsme použili mikrokinematografické zobrazení této vazby. K tomuto účelu byl použit bakteriální kmen *L. casei* CCDM 650 a jako zástupce eukaryot HeLa buňky.

Jako příklad uvádíme tři záznamy různých sběrných časů. Vznik vazby mezi bakteriálními buňkami *L. casei* CCDM 650 a povrchem HeLa buňky se začal vyvíjet přibližně po 8 h koinkubace (Obr. 5). Vazba mezi bakterialní buňkou *L. casei* CCDM 650 a HeLa buňkou byla zachycena ve 14 h koinkubace (Obr. 6). Zánik vazby mezi bakteriálními buňkami *L. casei* CCDM 650 a HeLa buňkou nastal přibližně po 20 h kouinkubace (Obr. 7).

Obr 5: Vznik vazby mezi *L. casei* CCDM 650 a HeLa buňkou po cca 8 h koinkubacie. (Zvětšení mikroskopu 10x40).

Obr. 6: Vazba bakterialních buněk *L. casei* CCDM 650 na HeLa buňku ve 14 h koinkubace. (Zvětšení mikroskopu 10x40).

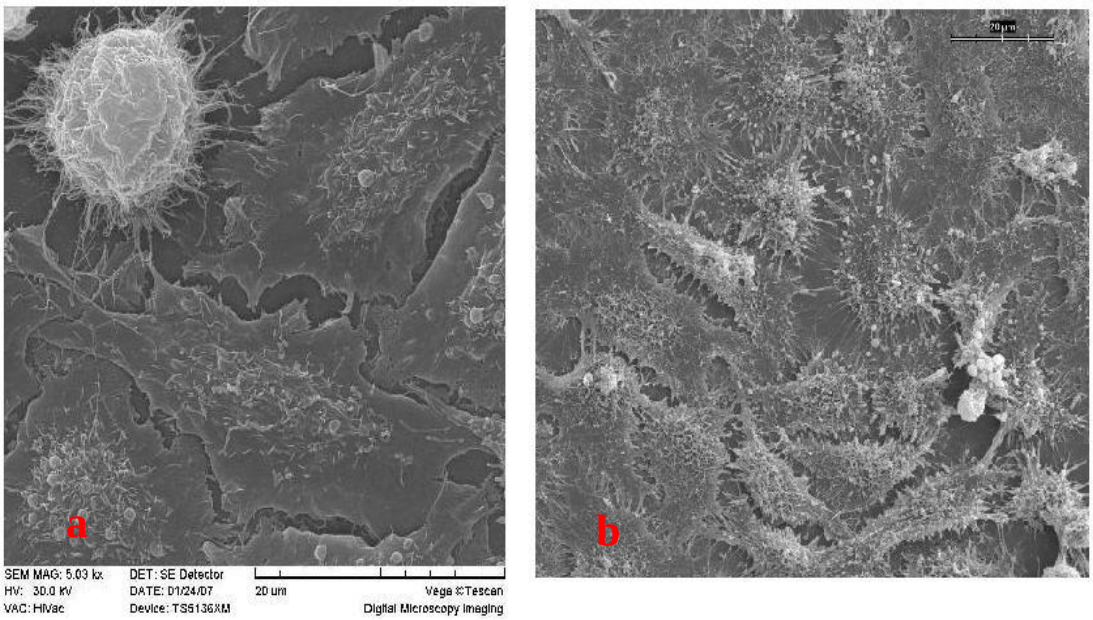
Obr. 7: Zánik vazby mezi bakteriálními buňkami *L. plantarum* CCDM 92 a HeLa buňkou po přibližně 20 h kouinkubace.(Zvětšení mikroskopu 10x40).

3.3 Studium vztahu eukaryotních a prokaryotních buněk a jejich vzájemné vazby

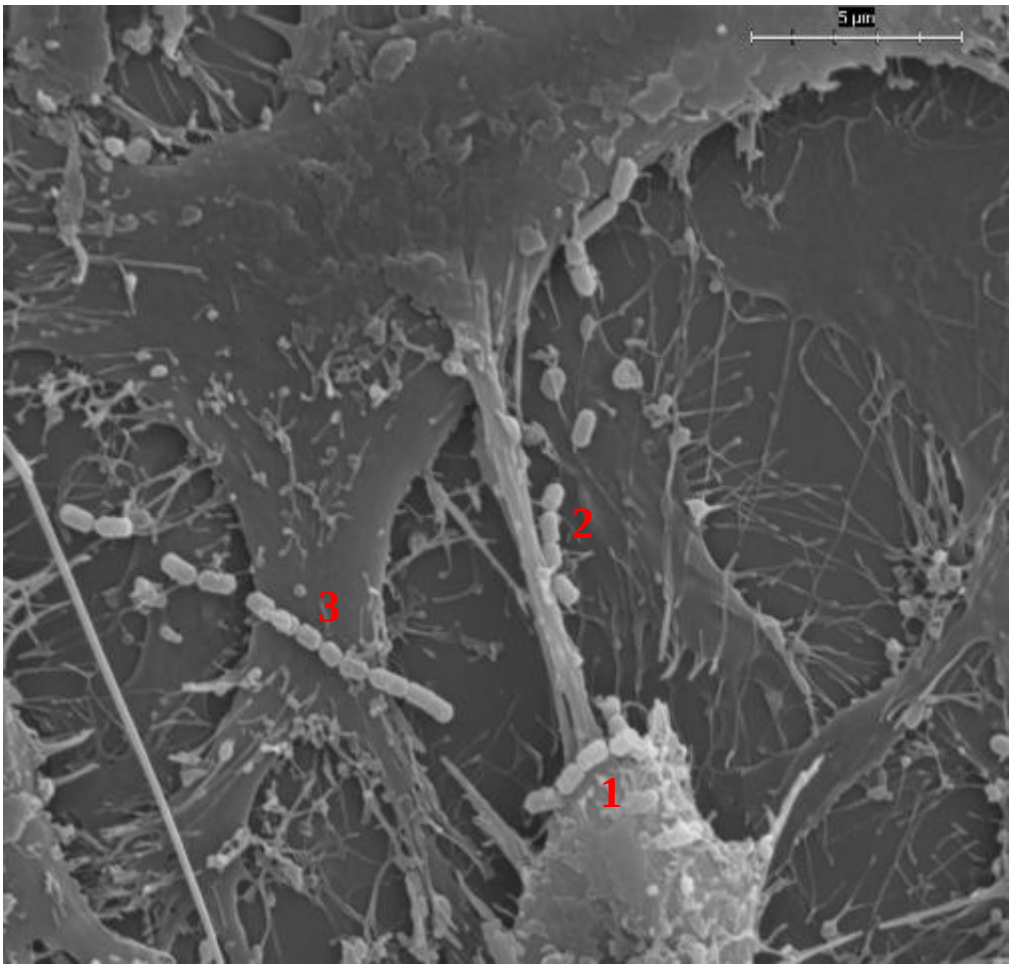
Pomocí skenovací elektronové mikroskopie jsme studovali morfologii HeLa buněk, bakteriálních kmenů a jejich vzájemnou interakci. Použity byly všechny testované bakteriální kultury (*L. casei* CCDM 650, *L. plantarum* CCDM 92, *E. faecium* CCDM 922), které byly inkubovány spolu s HeLa buňkami po dobu 24 h.

Samotné HeLa buňky kultivované v MEM médiu bez laktobacilů či enterokoků (Obr. 8a) byly morfologicky rozdílné od HeLa buněk kokultivovaných s vybranými bakteriálními kmeny (Obr. 8b). HeLa buňky kultivované samotné téměř neměly výběžky (Obr. 8a). Naproti tomu HeLa buňky kokultivované s kmenem *L. plantarum* CCDM 92 vytvářely obrovskou síť dlouhých, tenkých cytoplazmatických můstků a výběžků, pomocí kterých komunikují HeLa buňky navzájem mezi sebou (Obr. 8b). Totéž bylo pozorováno i v případě kokultivace s ostatními kmeny mléčných bakterií.

Bakteriální kmeny mohou adherovat na různé části povrchu HeLa buňky, např. na tělo HeLa buňky, na komunikační kanály, připadně na cytoplazmatické výběžky HeLa buněk (Obr. 9).



Obr. 8: a - HeLa buňka (Březina, nepublikované údaje); **b** - HeLa buňky kokultivované s bakteriálním kmenem *L. plantarum* CCDM 92. (Měřítko je 20µm).



Obr. 9: Typy vazby buněk *L. casei* CCDM 650 na HeLa buňku. **1** - *L. casei* CCDM 650 naadherovaný na cytoplazmatický výběžek HeLa buňky; **2** - *L. casei* CCDM 650 naadherovaný na cytoplazmatický most; **3** – *L. casei* CCDM 650 naadherovaný na tělo HeLa buňky.

4 Diskuze

Rody *Enterococcus* a *Lactobacillus* patří do skupiny mikroorganismů známých jako bakterie mléčného kvašení. Oba výše zmíněné rody jsou G+, nesporulující, fakultativně anaerobní. Enerokoky jsou morfologicky koky, zatímco laktobacily tyčinky a zároveň jsou největší skupinou mezi mléčnými bakteriemi. Někteří zástupci obou rodů vykazují pozitivní účinky na lidský i zvířecí organismus a jsou využívány v probiotických přípravcích.

Probiotické účinky mikroorganizmů jsou druhově a kmenově závislé. Zdraví prospěšné účinky vykazují taktéž některé kmeny rodů *Bifidobacterium, Lactoccocus, Streptococcus, Saccharomyces* a *Bacillus.* V předkládané práci jsme studovaly kmeny mléčných bakterií *Lactobacillus casei* CCDM 650, *Lactobacillus plantarum* CCDM 92 a *Enterococcus faecium* CCDM 922.

Podle FAO/WHO existuje několik podmínek, které musí mikroorganismy splňovat, pokud mají být používané jako probiotika (2002). Musí být provedena kmenová identifikace (genová typizace), např. metodou PFGE a mimo jiné musí být mikroorganismy testovány na schopnost adherovat na povrchy lidských buňkových linií či epitelií (FAO/WHO, 2001). Testy, jako například tolerance na působení kyselin a žluči, produkce antimikrobiálních látek a schopnost adherovat na lidské střevní buňky, by měly být provedeny v závislosti na očekávaných zdravotních přínosech (Collins a spol., 1998; Havenaar a Huis in't Veld, 1992).

Ačkoli je důkazů o přilnavosti probiotik na sliznici *in vivo* dosud málo, určité studie ukazují, že tato přilnavost skutečně může nastat a může tedy sloužit jako mechanismus pro působení probiotických mikroorganismů (Blum a kol., 1999). Vhodné studie *in vitro* by měly prokázat potenciální zdravotní přínosy probiotik před tím, než se přistoupí k testům *in vivo*. Adhezivní vlastnosti probiotik jsou druhově specifické. Faktory, jako jsou vlastnosti buněčné stěny a její složení (Gusils, 2002), případně i specifita hostitele, jsou nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími adhezivní vlastnosti. Při výběru probiotických kmenů hraje podstatnou roli schopnost mikroorganismu adherovat na eukaryotní buňku, neboť pouze interakce mezi těmito buňkami vede k účinnému konečnému efektu. Adhezivitu *in vitro* mohou ovlivňovat různé faktory, například počet bakteriálních buněk přidaných k eukaryotickým buňkám (Greene a Klaenhammer, 1994) či změna podmínek, jako třeba snížené pH (Greene a Klaenhammer, 1994), přítomnost žluči v kultivačním

médiu (Ouwehand a kol., 2001), přítomnost jiných probiotických kmenů (Ouwehand a kol., 2000) či změna kultivačního média (Ouwehand a kol., 2001).

Míru adhezivity kmenů *L. plantarum* CCDM 92, *L. casei* CCDM 650 a *E. faecium* CCDM 922 (prokaryotické organismy) k HeLa buňkám (eukaryotické buňky), které jsme koinkubovali 24 h, jsme hodnotili pomocí optické mikroskopie. Za účelem kvantifikace jsme počítali, kolik z 1000 HeLa buněk mělo na svém povrchu naadherovanou alespoň jednu bakteriální buňku a zjištěné hodnoty jsme vyjádřili procentuálně. Nejvyšší míru adherence prokazoval kmen *E. faecium* CCDM 922 (73,76%). Nižší hodnoty pak prokazovaly kmeny *L. plantarum* CCDM 92 (46,30%) a *L. casei* CCDM 650 (45,68%). Zda jsou rozdíly ve schopnosti bakteriálních kmenů adherovat na povrch eukaryotických buněk statisticky významné či nevýznamné jsme porovnávali pomocí Studentova t-testu pro porovnání dvou nezávislých hodnot. Míra adherence na HeLa buňky se v případe *L. plantarum* CCDM 92 a *L. casei* CCDM 650 statisticky významně nelišila. Naopak v případě *E. faecium* CCDM 922 a *L. plantarum* CCDM 92, stejně jako u *E. faecium* CCDM 922 a *L. casei* CCDM 650, byla míra adherence statisticky významně odlišná.

Ve většině prací se ke zjišťování schopnosti adherence mikroorganismů na eukaryotické buňky využívají Caco-2 buňky, epitelové buňky kolorektálního karcinomu (Greene a Klaenhammer, 1994). Důvodem, proč jsme k experimentům použili HeLa buňky je zejména to, že v použité metodě, která již byla optimalizována v naší laboratoři, bylo nutné, aby buněčně linie rostly v monovrstvě (hodnocení pomocí optické mikroskopie), přičemž Caco-2 buňky tuto podmínku nesplňovaly (růst do prostoru, do „sloupečků“). HeLa buňky jsou taktéž využívané jako modelová buněčná linie a je možné je také využít pro hodnocení míry adhezivity mléčných bakterií (Atassi a kol., 2006). Proto jsme tuto buněčnou linii využili i my.

Na sledování vzniku, trvání a zániku vazby mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou jsme využili mikrokinematografické zobrazení. K tomuto účelu jsme použili bakteriální kmen *L. casei* CCDM 650 a jako zástupce eukaryot HeLa buňky. V průběhu koinkubace trvající 24 h jsme zaznamenali jak vznik, tak trvání i zánik této vazby. Vznik vazby mezi bakteriálními buňkami *L. casei* CCDM 650 a povrchem HeLa buňky se začal vyvíjet asi po 8 h koinkubace, zatímco zánik vazby začal přibližně po 20 h koinkubace. Tento výsledek byl pro nás důležitý, jelikož se nám potvrdilo, že vznik vazby je časově závislý, což vede k dalším návrhům na zkoumání, a to zejména jak se vyvíjí adhezitivta v čase.

Morfologii HeLa buněk, bakteriálních kmenů a jejich vzájemnou interakci jsme sledovali pomocí SEM. Použili jsme výše zmíněné bakteriální kmeny, které byly inkubovány spolu s HeLa buňkami po dobu 24 h. Zjistili jsme, že HeLa buňky kultivované v MEM médiu bez bakteriálních kmenů (Březina, nepublikované údaje) se morfologicky lišily od HeLa buněk kokultivovaných s bakteriálními kmeny. HeLa buňky kultivované samotné téměř neměly výběžky, naproti tomu HeLa buňky kokultivované s kmenem *L. plantarum* CCDM 92 vytvářely obrovskou síť dlouhých, tenkých, cytoplazmatických můstků a výběžků, pomocí kterých komunikují HeLa buňky navzájem mezi sebou. Totéž bylo pozorováno i v případě kokultivace s ostatními kmeny mléčných bakterií. Kromě toho jsme zjistili, že bakteriální buňky mohou adherovat na různé části na povrchu HeLa buněk, např. na tělo HeLa buňky či na cytoplazmatický most HeLa buňky.

Klayraung a Okonogi (2009) pomocí SEM zjišťovali, zda se antibakteriální aktivita kmene *L. fermentum* projeví změnou morfologie buněk několika patogenních bakteriálních kmenů (*Listeria monocytogenes, Salmonella enterica* ser. *typhi, Shigella sonnei* a *Staphylococcus aureus*), se kterými byly kokultivované dohromady. Jejich výsledky naznačují, že tomu tak opravdu je. Antibakteriální aktivita laktobacilů způsobila poškození buněčné membrány patogenních bakterií, které mělo za následek smršťování či popraskání buněk daného patogena. V našem případě nedošlo k popraskání ani smrštování buněk, ale ke změně morfologických vlastností eukaryotických HeLa buněk. Víme, že HeLa buňky jsou citlivé na kultivační podmínky, včetně pH. Existuje zde možnost, že změnu morfologie HeLa buněk způsobuje snížení pH různými kyselinami (kyselina mléčná, kyselina octová, atd.) produkovanými bakteriemi mléčného kvašení, ale také i jiné jejich produkty, např. peroxid vodíku (Moy a kol., 2004). Tato zjištění dávají prostor pro další zkoumání, co je příčinou těchto změn.

5 Závěry

1) Největší schopnost adherence na povrch HeLa buněk se projevila u bakteriálního kmene *E. faecium* CCDM 922 (73,76%), naopak nejmenší schopnost adherence na HeLa buňky vykazoval kmen *L. casei* CCDM 650 (45,68%). Kmen *L. plantarum* CCDM 92 dosáhnul adherence 46,30%.

2) Statisticky významný rozdíl ve schopnosti adherovat na povrch HeLa buněk byl pozorován mezi kmeny *L. casei* CCDM 650 a *E. faecium* CCDM 922, *L. plantarum* CCDM 92 a *E. faecium* CCDM 922.

3) Ve schopnosti adherovat na povrch eukaryotických buněk (HeLa buňky) nebyl mezi kmeny *L. casei* CCDM 650 a *L. plantarum* CCDM 92 statisticky významný rozdíl.

4) Mikrokinematografickým zobrazením vazby mezi prokaryotickou (*L. casei* CCDM 650) a eukaryotickou (HeLa buňky) buňkou byl pozorován vznik, trvání a zánik této vazby počas 24 h. Tato vazba je zřejmě časově závislá.

5) Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla pozorována morfologie a vztah mezi prokaryotickou (*Lactobacillus* spp. a *Enterococcus* spp.) a eukaryotickou (HeLa buňky) buňkou.

6) Byl pozorován morfologický rozdíl mezi HeLa buňkami kultivovanými samotnými a mezi HeLa buňkami kokultivovanými s bakteriálními kmeny.

6 Literatura

Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F., Servin, A.L. (2006): *In vitro antibacterial activity of Lactobacillus helveticus strain KS300 against diarrhoeagenic, uropathogenic and vaginosis-associated bacteria*. J. Appl. Microbiol., *101*, s. 647–654.

Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. (1993): *Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen–cell interactions*. Appl. Environ. Microbiol., *59*, s. 4121–4128.

Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. (1994): *Lactobacillus acidophilusLA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria.* Gut, *35*, s. 483–489.

Bezkorovainy, A. (2001): *Probiotics: determinants of survival and growth in the gut.* Am. J. Clin. Nutr., *73*, s. 399–405.

Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E.J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., von Wright, A., Saarela, M., Saxelin, M., Collins, K., Morelli, L. (1999): *Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement.* Trends Food Sci. Tech., *10*, s. 405–410.

Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kerneis, S., Bernet, M.F., Servin, A.L. (1992): *Proteinmediated adhesion of Lactobacillus acidophilus BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture*. Appl. Environ. Microbiol., *58*, s. 2034–2039.

Collado, M.C., Gueimonde, M., Sanz, Y., Salminen, S. (2006): *Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance.* J. Food Protect., *69*, s. 1675–1679.

Collins, J.K., Thornton, G., O'Sullivan, G.O. (1998): *Selection of probiotic strains for human applications.* Int Dairy J, *8*, s. 487–490.

Endtz, H.P., van den Braak, N., Verbrugh, H.A., van Belkum, A. (1999): *Vancomycin resistance: status quo and quo vadis.* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., *18*, s. 683–690.

FAO/WHO (2001): *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria* **2001.** http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf **(15.3.2010)**

FAO/WHO (2002): *Guidelines for the evaluation of probiotics in food* **2002.** http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf **(15.3.2010)**

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006): *The role and application of enterococci in food and health.* Int. J. Food Microbiol., *106*, s. 1–24.

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E. (1999a): *Enterococci at the crossroads of food safety?* Int. J. Food Microbiol., *47*, s. 1 –24.

Giraffa, G. (2003): *Functionality of enterococci in dairy products.* Int. J. Food Microbiol., *88*, s. 215–222.

Greene, J.D., Klaenhammer, T.R. (1994): *Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells.* Appl. Environ. Microbiol., *60*, s. 4487–4494.

Gueimonde, M., Noriega, L., Margolles, A., de los Reyes-Gavilan, C.G., Salminen, S. (2005): *Ability of Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus*. Int. J. Food Microbiol., *101*, s. 341–346.

Gusils, C., Cuozzo, S., Sesma, F., Gonzalez, S. (2002): *Examination of adhesive determinants in three species of Lactobacillus isolated from chicken*. Can. J. Microbiol., *48*, s. 34–42.

Hammes, W.P. a Hertel, C. (2003): *The genera Lactobacillus and Carnobacterium.* In*:* Dworkin, M. (ed.). *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. Springer-Verlag, New York, s. 320–403.

Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H.J. (1992): *Probiotics: A general view*. In: Wood B.J.B. (ed.)., *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.* Chapman & Hall, New York, 209–224.

Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Fourniat, J., Servin, A.L. (1992): *Adhesion of human Lactobacillus acidophilus strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells*. J. Gen. Microbiol., *138* (Part 8), s. 1689–1696.

Kankaanpää, P., Tuomola, E., El-Nezami, H., Ahokas, J., Salminen, S.J. (2000): *Binding of aflatoxin B_1 alters the adhesion properties of Lactobacillus rhamnosus strain GG in a Caco-2 model.* J. Food Prot., *63*, s. 412–414.

Kim, H.S. (1988): *Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts*. Cult. Dairy Prod. J., *23*, s. 6–9.

Klayraung, S., Okonogi, S. (2009): *Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of Lactobacillus fermentum isolatér from Miang.* Braz. J. Microbiol., *40*, s. 757–766.

Klein, G. (2003): *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract*. Int. J. Food Microbiol., *88*, s. 123–131.

Lahtinen, S.J., Saarinen, N.M., Ämmälä, J., Mäkelä, S.I., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2002): *Interactions between lignans and probiotics*. Microb. Ecol. Health Dis., *14*, s. 106–109.

Larsen, N., Nissen, P., Willats, W.G. (2007): *The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of Lactobacillus ssp. and E. coli O138.* Int. J. Food Microbiol., *114*, s. 113–119.

Lichy, J.H., Modi, W.S., Seaunez, H.N., Howell, P.M. (1992): *Identification of a human chromosome 11 gene which is differntially regualted in tumorigenic and non-tumorigenic somatic cell hybrids of HeLa cells*. Cell Growth Differ., *3*, s. 541–548.

Ludwig, W., Seewald, E., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K.-H., Magrum, L., Woese, C.R., Fox, G.E., Stackebrandt, E. (1985): *The phylogenetic position of Streptococcus and Enterococcus*. J. Gen. Microbiol., *131*, s. 543– 551.

Masters, J.R. (2000): *Human cancer cell lines: fact and fantasy*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., *1*, 233–236.

Masters, J.R. (2002): *HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly*. Nat. Rev. Cancer, *2*, s. 315–319.

Moy, T.I., Mylonakis, E., Calderwood, S.B., Ausubeli, F.M. (2004): *Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by Enterococcus faecium.* Infect. Immun., *72*, s. 4512–4520.

Orrhage, K., Lidbeck, A., Rafter, J. (2005): *Influence of the probiotics, lactobacilli and bifidobacteria on gastrointestinal disorders in adults.* In: Hill, M. J. (ed.). *Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology.* Taylor & Francis e-Library, London, s. 256–257.

Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Toliko, S., Salminen, S.J. (2000): *The mucus binding of Bifidobacterium lactis Bb12 is enhanced in the presence of Lactobacillus GG and Lact. delbrueckii subsp. bulgaricus.* Lett. Appl. Microbiol., *30*, s. 10–13.

Ouwehand, A.C., Niemi, P., Salminen, S.J. (1999): *The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro.* FEMS Microbiol. Lett., *177*, s. 35–38.

Ouwehand, A.C., Parhiala, R., Salminen, S., Rantala, A., Huhtinen, H., Sarparanta, H., Salminen, E. (2004): *Influence of the endogenous mucosal microbiota on the adhesion of probiotic bacteria in vitro.* Microb. Ecol. Health Dis., *16*, s. 202–204.

Ouwehand, A.C., Tölkkö, S., Salminen, S. (2001): *The effect of digestive enzymes on the adhesion of probiotic bacteria in vitro.* J. Food Sci., *66*, s. 856–859.

Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkkö, S., Salminen, S. (2001): *Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus.* Int. J. Food Microbiol., *64*, s. 119–126.

Riedel, C.U., Foata, F., Goldstein, D.R., Blum, S., Eikmanns, B.J. (2006): *Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells—adhesion and impact on expression profiles.* Int. J. Food Microbiol., *110*, s. 62–68.

Savage, D.C. (1992): *Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse.* Appl. Environ. Microbiol., *58*, s. 1992–1995.

Schleifer, K.H. a Kilpper-Bälz, R. (1984): *Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov*. Int. J. Syst. Bacteriol., *34*, s. 31–34.

Speck, M.L. (1976): *Interactions among lactobacilli and man*. J. Dairy Sci., *59*, s. 338–43.

Stanbridge, E.J., Flandermeyer, R.R., Daniels, D.W., Nelson-Rees, W.A. (1981): *Specific chromosome loss associated with the expression of tumorigenicity in human cell hybrids*. Somat. Cell Genet., *7*, s. 699–712.

Woodford, N., Johnson, A.P. (1994): *Glycopeptide resistance in Gram-positive bacteria: from black and white to shades of grey.* J. Med. Microbiol., *40*, s. 375–378.

Zarate, G., Morata de Ambrosini, V., Perez Chaia, A., Gonzalez, S. (2002): *Some factors affecting the adherence of probiotic Propionibacterium acidipropionici CRL 1198 to intestinal epithelial cells.* Can. J. Microbiol., *48*, s. 449–457.

7 Seznam zkratek a symbolů

16S rDNA	16S ribozomální deoxyribonukleotidová kyselina
CFU	„Colony forming unit“, jednotka tvořící kolonie
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
FAO	„Food and Agriculture Orgnization of the United Nations”, Potravinářská a polnohospodářská organizace
G+	Gram pozitivní bakterie
MEM	„Minimum Esential Medium Eagle“
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe
PBS	„Phosphate buffered saline“, fosfátový pufrovaný fyziologický roztok
PFGE	Gelová elektroforéza v pulzním elektrickém poli
RDP	„Ribosomal Database Project“
SEM	Skenovaní elektronová mikroskopie
WHO	„World Health Organization“, Světová zdravotnická organizace