

# CHARAKTERIZACE IZOLÁTŮ Z ČELEDI *LACTOBACILLACEAE* ZÍSKANÝCH Z MATEŘSKÉHO MLÉKA A STOLICE KOJENCŮ

Ivana Hyršlová<sup>1</sup>, Karolína Medová<sup>1</sup>, Gabriela Krausová<sup>1</sup>,  
Iva Mrviková<sup>1,2</sup>, Jiří Štětina<sup>3</sup>, Ladislav Čurda<sup>3</sup>,  
Vladimír Dráb<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>2</sup> Česká zemědělská univerzita, Praha

<sup>3</sup> Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

## Characterization of the strains from the family *Lactobacillaceae* isolated from breast milk and infant faeces

### Abstrakt

Stolice kojenců a mateřské mléko jsou zdrojem bakterií mléčného kvašení se zajímavými funkčními a technologickými vlastnostmi. Cílem předložené práce bylo izolovat, identifikovat a charakterizovat nové potenciálně probiotické kmeny z čeledi *Lactobacillaceae*. Sedm izolátů bylo na základě homologie 16S rRNA identifikováno jako *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* a *Lactobacillus gasseri*. Následně byly u získaných kmenů testovány jejich bezpečnostní (rezistence k antibiotikům, hemolýza) a funkční vlastnosti (odolnost ke žlučovým solím, hydrofobita a antimikrobiální aktivita). Všechny izoláty byly senzitivní ke klinicky významným antibiotikům a nebyla u nich prokázána hemolytická aktivita. Kyselé supernatanty pěti ze sedmi testovaných izolátů vykazovaly antimikrobiální aktivitu vůči vybraným patogenním mikroorganismům. *Lcb. rhamnosus* 2 21/S/1E prokázal vysokou odolnost ke 3,0 g/L žlučových solí (> 80 %). Hydrofobita buněčného povrchu izolátů se pohybovala v rozmezí 9,8 – 67,9 %. Na základě předběžných výsledků je možné konstatovat, že získané izoláty ze stolice kojenců a mateřského mléka prokázaly slibný probiotický potenciál, nicméně je nutné ověřit jejich další funkční a technologické vlastnosti.

**Klíčová slova:** *Lactobacillaceae*, antimikrobiální aktivita, antibiotika, mateřské mléko, probiotika

### Abstract

Infant faeces and breast milk are good sources of lactic acid bacteria with interesting functional and technological properties. The main aim of the present study was isolation, identification and characterisation of new potential probiotic strains from the family *Lactobacillaceae*. Seven isolates were identified according to their 16S rDNA sequences as *Lacticaseibacillus rhamnosus*,

*Limosilactobacillus reuteri* and *Lactobacillus gasseri*. Furthermore, the safety aspects (antibiotic susceptibility, haemolytic activity) and functional properties, such as hydrophobicity, antimicrobial activity and bile salts tolerance, were determined. Isolates were sensitive to the most of the clinically important antibiotics and no haemolytic activity of any of the isolates was demonstrated. Acidic supernatants of five out of seven strains showed antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Lcb. rhamnosus* 2 21/S/1E proved a high survival rate in the presence of 3.0 % bile salts (> 80 %). Surface cell hydrophobicity of tested isolates ranged around 9.8 – 67.9 %. Based on the preliminary results, it can be concluded that the isolates obtained from the infant faeces and breast milk have demonstrated probiotic potential, however, it will be necessary to verify other functional and technological properties.

**Keywords:** *Lactobacillaceae*, antimicrobial activity, antibiotics, breast milk, probiotics

### Úvod

V současné době dochází ke zvyšování zájmu veřejnosti o potraviny přinášející příznivé zdravotní účinky, proto jsou probiotika a synbiotika zajímavou možností pro aplikaci do funkčních potravin a doplňků stravy. V dnešní době již existují důkazy, které poukazují na důležité vztahy mezi mikroorganismy a fyzickým, ale také psychickým stavem jedince. Selektce nových probiotických kmenů vyžaduje systematický přístup při hodnocení a výběru potenciálních probiotických kandidátů. Některé obecné požadavky jsou definovány Světovou zdravotnickou organizací (WHO), kdy probiotický mikroorganismus musí být například schopen tolerovat podmínky trávicího traktu, adherovat k epitelálnímu povrchu tlustého střeva nebo vykazovat antimikrobiální aktivitu k patogenním mikroorganismům. Kromě toho je také vyžadováno zaměřit se u nově izolovaných kmenů na bezpečnostní aspekty, které zahrnují stanovení přítomnosti, resp. nepřítomnosti genů rezistence vůči antibiotikům, stanovení produkce nežádoucích enterotoxinů nebo hemolytickou aktivitu.

Mezi nejčastěji používané probiotické mikroorganismy patří kmeny z rodu *Bifidobacterium* a čeledi *Lactobacillaceae*. Celá řada studií se zabývá izolací a charakterizací zmíněných kmenů z mateřského mléka nebo ze stolice dospělých a kojenců. Mateřské mléko představuje velmi vhodné prostředí pro zdravý prospěšný mikrobiální druh vzhledem k obsahu prebiotických mléčných oligosacharidů, a stává se tak zdrojem bakterií mléčného kvašení s pozoruhodnými funkčními a technologickými vlastnostmi. U bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií izolovaných ze stolice je pak předpokládána vysoká odolnost vůči žlučovým solím, nízkému pH a lysozymu a také schopnost adherovat ke střevním buňkám. Proto se i předložená práce zabývá izolací, identifikací a charakterizací nových, potenciálně probiotických

mikroorganismů z čeledi *Lactobacillaceae* pocházejících z mateřského mléka a stolice kojenců. U získaných izolátů byly sledovány bezpečnostní kritéria (antibiotická rezistence, hemolytická aktivita), dále funkční vlastnosti (odolnost vůči podmínkám trávicího traktu, antimikrobiální aktivita a hydrofobita).

## Materiál a metody

### Vzorky stolice kojenců a mateřského mléka

Vzorky stolice kojenců (ve věku 0 – 4 měsíců) a mateřského mléka byly získány od pěti dobrovolných dárců. Před dalším zpracováním byly vzorky skladovány při teplotě 4 °C maximálně po dobu 48 hodin.

### Izolace a identifikace izolátů

Pro izolaci nových kmenů z čeledi *Lactobacillaceae* byl použit MRS agar (De Man, Rogosa and Sharp; Merck, Německo) o pH 5,7 s přidavkem ledové kyseliny octové 1,32 ml/L. Kultivace probíhala anaerobně při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Po izolaci a přečištění byly získané izoláty klasifikovány na základě homologie získaných sekvencí 16S ribozomální RNA a sekvencí uložených v databázi NCBI pomocí porovnávacího nástroje BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). DNA z bakteriálních kultur byla extrahována pomocí DNeasy® UltraClean® Mikrobiálního Kitu (Qiagen, Hilden, Německo) podle Quick-Start protokolu dodaného výrobcem. Gen 16S RNA byl amplifikován pomocí fD1 (5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') a rP2 (5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primerů (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1987160/>). Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena v reakčním objemu 25 µl (0,5 µl obou primerů (10 µM), 1 µl templátu DNA, 12,5 µl 2× PPP Taq MasterMix (TopBio) a 10,5 µl ddH<sub>2</sub>O). Podmínky amplifikace byly následující: předehřívání na 95 °C (2 min), 35 cyklů: denaturace při 95 °C (30 s), nasedání primerů při 55 °C (30 s), prodlužování při 72 °C (5 min) a následná konečná extenze při 72 °C (8 min). Všechny produkty PCR byly ošetřeny 2 µl ExoSAP-IT™ dle referenční příručky výrobce (ThermoFisher Scientific, Baltic UAB, Vilnius) a sekvenovány společností Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Německo) s použitím fD1 jako forwardového primeru.

### Antibiotická rezistence

Citlivost k 10 vybraným antibiotikům byla testována pomocí diskové difúzní metody. K testování bylo vybráno 10 antibiotik (gentamicin (30 µg), erythromycin (15 µg), klindamycin (2 µg), streptomycin (25 µg), quinupristin/dalfopristin (15 µg), kanamycin (30 µg), chloramfenikol (30 µg), vankomycin (5 µg), ampicilin (10 µg), tetracyklin (30 µg); Oxoid, UK). Na Petriho misky se ztuhlým agarem MRS o pH 5,7 bylo rozetřeno 0,5 ml kultur po 18 hodinách kultivace. Po zaschnutí kultury

byly na agar aplikovány antibiotické disky. Po 24 hodinách kultivace při 37 °C byl změřen průměr jednotlivých zón v milimetrech. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ze tří stanovení ± SD. Pro vyhodnocení byla použita metodika podle Yerlikaya a kol. (2020), dle které značí velikost zón kmeny rezistentní (> 6 mm; -), slabě senzitivní (7-10 mm; +), senzitivní (11-17 mm; ++) a velmi senzitivní (> 17 mm; +++).

### Hemolytická aktivita

Hemolytická aktivita a produkce hemolysinu byla stanovována dle Sui a kol. (2021). Bakteriální kultury v exponenciální růstové fázi byly rozetřeny na misky s BD Columbia agar (Merck, Německo) obsahující 5 % ovčí krve. Kultivace probíhala anaerobně, 48 hodin při 37 °C. Přítomnost α- nebo β-hemolysinu byla stanovena jako vznik nazelenalých nebo průhledných zón v krevním agaru.

### Přežívání v podmínkách trávicího traktu

K simulaci podmínek GIT byla využita metoda dle Kostelac a kol., 2021. Izoláty v exponenciální fázi (MRS pH 5,7; 37 °C) byly centrifugovány a 1× promyty (5 500 RPM, 5 minut) fyziologickým roztokem. Sřevní šťávy byly simulovány vodou o pH 8 s přidavkem pankreatinu (1 g/L) (Sigma Aldrich, ČR) a žlučových solí (1,5 nebo 3,0 g/L) (Sigma Aldrich, ČR). Kultivace v simulovaných střevních podmínkách probíhala 4 hodiny při 37 °C. Schopnost přežívání podmínek GIT byla stanovena pomocí plotnové metody na MRS 5,7 agaru (37 °C; 72 hod.). Výsledná schopnost přežívání byla vypočtena jako:

$$Přežívání (\%) = \left( \frac{P_1}{P_0} \right) \cdot 100,$$

kde  $P_1$  je  $\log_{10}$ KTJ/ml po 4 hodinách ve vodě nebo v simulovaných gastrointestinálních podmínkách a  $P_0$  je  $\log_{10}$ KTJ/ml v počáteční suspenzi.

### Hydrofobita

Hydrofobita buněčného povrchu je jedním z parametrů, který může vypovídat o schopnostech mikroorganismů adherovat ke střevní sliznici hostitele. Ke stanovení hydrofobity byla využita metoda MATH (microbial adhesion to hydrocarbons) dle metodiky uvedené ve studii Krausova a kol (2019).

### Antimikrobiální aktivita

Před stanovením antimikrobiální aktivity byly izoláty kultivovány (MRS pH 5,7; 37 °C) po dobu 24 hodin. Následně byly centrifugovány (6 000 RPM, 8 minut) a získaný supernatant byl rozdělen na 3 části. První část (pH 4,0 – 4,5) byla ponechána beze změn (1), druhá část byla neutralizována pomocí NaOH do dosažení pH 6,5 ± 0,2 (2) a třetí část byla neutralizována pomocí NaOH (pH 6,5 ± 0,2) a zahřívána při 100 °C po dobu 20 minut

(3). Antimikrobiální aktivita získaných supernatantů byla testována vůči pěti patogenním kmenům: *Bacillus cereus* CCM 869, *Escherichia coli* CCM 3954, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* CCM 3958 a *Salmonella enterica* sérotyp Typhimurium CCM 7205 (Brain Heart Infusion, 37 °C, aerobně; Česká Sběrka Mikroorganismů Brno). Ke stanovení byla použita metoda uvedená ve studii podle Kostelac a kol. (2021). Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 20 µl suspenzí patogenů o optické denzitě 3 McF, 20 µl BHI a 160 µl supernatantu (1), (2) nebo (3). Jako kontrola byla použita směs 20 µl patogenů a 180 µl BHI. Míra inhibice byla vypočtena jako

$$\% \text{ inhibice} = \left(1 - \frac{A_{S,48} - A_{S,0}}{A_{K,48} - A_{K,0}}\right) \cdot 100,$$

kde  $A_{S,0}$ ,  $A_{S,48}$  a  $A_{K,0}$ ,  $A_{K,48}$  jsou hodnoty absorbance v jamkách se supernatanty (S) a v jamkách bez supernatantů (K) na počátku a po 48 hodinách kultivace.

## Výsledky a diskuze

Zástupci bakterií z čeledi *Lactobacillaceae* jsou běžnou součástí lidské mikrobioty. Mnohé z nich jsou navíc považovány za probiotika pro jejich příznivé působení v lidském těle, zvláště jsou-li izolovány z lidského zdroje. V roce 2020 došlo u této čeledi k zavedení nové taxonomie a nyní zahrnuje tato čeleď 25 rodů, například nové rody *Limosilactobacillus* a *Lacticaseibacillus*, ale také doposud známý rod *Lactobacillus*. V předložené studii bylo identifikováno a charakterizováno sedm izolátů, které patří do rodů *Lacticaseibacillus* (Lcb.), *Limosilactobacillus* (Llb.) a *Lactobacillus* (L.), jak je uvedeno v Tab. I.

**Tab. I** Seznam identifikovaných izolátů a jejich označení

Čeleď*	Rod	Druh	Označení
Lactobacillaceae	<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> <sup>2</sup>	21/S/1E
	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> <sup>1</sup>	21/S/2A
	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> <sup>2</sup>	21/S/2C
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i> <sup>1</sup>	21/M/6D
	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> <sup>3</sup>	21/S/8A
	<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> <sup>2</sup>	21/M/8A
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i> <sup>1</sup>	21/M/8C

**Tab. II** Rezistence izolovaných kmenů k vybraným antibiotikům

Antibiotikum	CN	E	DA	S	QD	K	C	VA	AMP	TE
Izolát										
<i>Lcb. rhamnosus</i> 2 21/S/1E	+	+++	++	-	+++	-	+++	-	++	++
<i>Llb. reuteri</i> 1 21/S/2A	++	+++	+++	-	++	-	++	-	++	++
<i>Llb. reuteri</i> 2 21/S/2C	++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	++	++
<i>L. gasseri</i> 1 21/M/6D	++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	++	++
<i>Llb. reuteri</i> 3 21/S/8A	+	+++	+++	-	++	-	++	-	++	++
<i>Lcb. rhamnosus</i> 2 21/M/8A	+	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	+++
<i>L. gasseri</i> 1 21/M/8C	++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	++	+++

Rezistentní (-): 6 mm, Slabě senzitivní (+): 7–10 mm, Senzitivní (++) : 11–17 mm, Velmi senzitivní (+++) : >17 mm; CN – gentamicin (30 µg), E – erythromycin (15 µg), DA – klindamycin (2 µg), S – streptomycin (25 µg), QD – quinupristin/dalfopristin (15 µg), K – kanamycin (30 µg), C – chloramfenikol (30 µg), VA – vankomycin (5 µg), AMP – ampicilin (10 µg), TE – tetracyklin (30 µg)

V současné době, kdy jsou antibiotika používána ve velkém měřítku, představuje rezistence k nim závažný problém. Z tohoto důvodu EFSA i WHO/FAO vydaly nařízení pro testování antibiotického profilu probiotických a potenciálně probiotických mikroorganismů (EFSA, 2008; FAO/WHO, 2002). Hodnocení profilu antibiotické rezistence u potenciálních probiotických mikroorganismů má velký význam z hlediska možnosti omezení přenosu genů odpovědných za antibiotickou rezistenci mezi běžnou mikrobiotu a patogeny. Na druhou stranu, na antibiotickou rezistenci probiotických mikroorganismů však lze dnes pohlížet i jako na výhodnou vlastnost při užívání takových laktobacilů osobami, které mají nevyvážený či narušený mikrobiom v důsledku užívání různých antibiotik. Všechny testované izoláty vykazovaly rezistenci, jak je uvedeno v Tab. II., vůči streptomycinu (25 µg), kanamycinu (30 µg) a vankomycinu (5 µg). Streptomycin je společně s kanamycinem řazen z hlediska chemické struktury mezi antibiotika zvaná aminoglykosidy. Obecně je známo, že zástupci tehdejšího rodu *Lactobacillus* jsou vůči aminoglykosidům rezistentní (Hummel a kol., 2006). Tato rezistence je však považována za přirozenou, jelikož je připisována absenci cytochromem zprostředkovaného elektronového transportu, který má na svědomí příjem léčiva (Charteris a kol., 2001). Verdenelli a kol. (2009) uvádí, že laktobacily (dnes již zástupci z čeledi *Lactobacillaceae*) jsou všeobecně považovány jako vankomycin-rezistentní. Vankomycin je glykopeptidové antibiotikum působící mechanismem inhibice syntézy buněčné stěny (Liasi a kol., 2009). Geny rezistence pro vankomycin jsou však chromozomálně kódovány, a proto taktéž nehrozí riziko přenosu, které pozorujeme například u plazmidů (Morrow a kol., 2012).

Hemolytická aktivita nebyla prokázána u žádného z testovaných kmenů, tedy kmeny nejsou schopny působit lyzi červených krvinek a nepředstavují zdravotní riziko. Pro mikroorganismy, které disponují hemolytickou aktivitou, je k růstu nezbytná přítomnost železa, které vystupuje jako kofaktor některých enzymů (Husain, 2008). Přítomnost hemolysinů napomáhá těmto mikroorganismům zvyšováním množství dostupného železa právě degradací červených krvinek. Kmeny z čeledi *Lactobacillaceae* jsou ve většině případů schop-



né nárůstu bez přítomnosti železa, což je považováno za kompetiční výhodu v přirozeném prostředí (Elli a kol., 2000).

Odolnost vůči náročným podmínkám trávicího traktu, zejména k nízkému pH žaludečních šťáv a vysokých koncentrací žlučových solí v tenkém střevě, je velmi důležitým parametrem při výběru vhodných probiotických kmenů. Průchod probiotických bakterií žaludkem ve vysokých koncentracích následně umožňuje bakteriím vykonávat probiotickou aktivitu na požadovaném místě ve střevech. Koncentrace žlučových solí v lidském střevě se může lišit v závislosti na druhu přijímané potravy a sekreci pankreatických enzymů (Shokryazdan a kol., 2014), průměrná koncentrace žlučových solí se však pohybuje okolo 0,1 až 0,5 % (Reis a kol., 2016). Schopnost přežívání (%) je uvedena v Tab. III. Velmi dobrou odolnost vůči přítomnosti žlučových solí (3,0 g/L) a pankreatinu vykazoval kmen pocházející ze stolice *Lcb. rhamnosus* 2 21/S/1E. Většina izolátů si zachovala velmi dobrou životaschopnost v přítomnosti 1,5 g/L žlučových solí, nicméně při zvýšení obsahu žlučových solí (3,0 g/L) již byl pozorován pokles počtu životaschopných kolonií o několik logaritmických řádů (2 – 6). Nejvíce citlivé byly dva kmeny původem ze stolice *Llb. reuteri* 1 21/S/2A a *Llb. reuteri* 2 21/S/2C a dále kmen pocházející z mateřského mléka *Lcb. rhamnosus* 2 21/M/8A. K odolnosti vůči žlučovým solím mohou přispívat například rozdíly ve stavbě buněčné stěny či rozdíly v genové výbavě, a tedy transkripci a expresi proteinů. V neposlední řadě se na snižování toxicity žlučových solí mohou podílet také enzymy BSH.

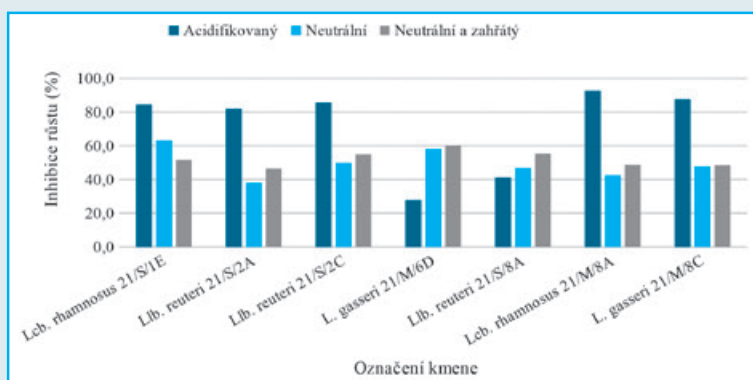
Hydrofobita buněčného povrchu může být jedním z klíčových faktorů, které hrají roli při kolonizaci trávicího traktu člověka. Dle Haddaji a kol. (2015) může prostřednictvím nescifických hydrofobních interakcí docházet k prvnímu kontaktu probiotických bakterií se střevním epitelem, jenž může být následován specifickými interakcemi. V této práci byly v hydrofobitě buněčného povrchu u testovaných izolátů pozorovány velké odlišnosti. Tyto rozdíly se nacházely i mezi stejnými druhy mikroorganismů. Schär-Zammaretti a Ubbink (2003) ve své studii uvádí, že hodnoty hydrofobity se mohou lišit napříč geneticky příbuznými druhy a také přímo mezi kmeny daného druhu. To potvrzují také výsledky studie Souza a kol. (2019), kde se hodnoty hydrofobity u různých kmenů druhu *L. casei* (nově *Lacticaseibacillus casei*) pohybovaly v rozsahu 9,66 až 69,36 %, podobně jako v této práci, a u kmenů *L. fermentum* dosahovaly hodnoty hydrofobity 0,30 až 68,81 %. U testovaných izolátů bylo pozorováno široké rozpětí hydrofobity buněčného povrchu (9,8 – 67,9 %) v rámci stejného taxonomického druhu. Nejnižší hydrofobita byla zaznamenána u *Llb. reuteri* 2 21/S/2C (9,79 %) izolovaného ze stolice, a naopak, nejvyšší míra

**Tab. III** Přežívání (%) izolátů v simulovaných střevních podmínkách v přítomnosti žlučových solí (1,5 a 3,0 g/L) po 4 hodinách kultivace

Izolát	Přežívání (%)		
	Kontrola; 4 h	Žlučové soli 1,5 g/L; 4 h	Žlučové soli 3,0 g/L; 4 h
<i>Lcb. rhamnosus</i> 2 21/S/1E	102,1 ± 0,1	89,8 ± 0,6	89,6 ± 0,4
<i>Llb. reuteri</i> 1 21/S/2A	100,6 ± 0,0	71,7 ± 0,4	41,5 ± 1,4
<i>Llb. reuteri</i> 2 21/S/2C	99,5 ± 0,1	67,2 ± 0,8	32,0 ± 0,0
<i>L. gasseri</i> 1 21/M/6D	99,8 ± 0,2	78,6 ± 0,2	64,5 ± 0,6
<i>Llb. reuteri</i> 3 21/S/8A	101,1 ± 0,1	82,6 ± 1,2	60,8 ± 1,2
<i>Lcb. rhamnosus</i> 2 21/M/8A	99,6 ± 0,1	95,5 ± 0,2	48,3 ± 0,6
<i>L. gasseri</i> 1 21/M/8C	99,9 ± 0,1	72,2 ± 0,3	69,0 ± 0,2

hydrofobity byla pozorována u *Llb. reuteri* 3 21/S/8A (67,87 %).

V této práci vykazovaly antimikrobiální aktivitu acidifikované supernatanty pěti ze sedmi testovaných kmenů (vyjma *L. gasseri* 1 21/M/6D a *Llb. reuteri* 3 21/S/8A). U izolátů *L. gasseri* 1 21/M/6D a *Llb. reuteri* 3 21/S/8A nebyl tento trend vždy sledován. U zmíněných kmenů byla také zaznamenána obecně nejnižší schopnost inhibovat růst patogenních mikroorganismů. Nejvýraznější rozdíl lze pozorovat při inhibici růstu *S. enterica* sérotyp *Typhimurium* CCM 7205 (Obr. I), kde ostatní kmeny inhibovaly patogení růst z 80,4 – 92,5 %, zatímco acidifikované supernatanty *L. gasseri* 1 21/M/6D a *Llb. reuteri* 3 21/S/8A inhibovaly růst *S. enterica* sérotyp *typhimurium* CCM 7205 výrazně méně (27,7 a 41,1 %). Po zahřátí již neutralizovaných supernatantů nedošlo k významným změnám v inhibičních aktivitách oproti neutralizovaným supernatantům, což by mohlo indikovat přítomnost některých termostabilních látek odpovědných za patogení inhibici. Ratsep a kol., 2014 uvádí, že některé kmeny *Lpb. plantarum* jsou schopny produkovat termostabilní plantariciny, které mohou inhibovat růst několika patogenních mikroorganismů. *L. gasseri* je zase schopen produkce termostabilního bakteriocinu – gassericinu (Zhang, 2019). Pro objasnění mechanismů antagonistické aktivity izolátů by bylo dále vhodné zaměřit se na studium produkce organických kyselin či na detekci a identifikaci sekretovaných molekul zapojených do mechanismu inhibice růstu patogenů.



**Obr. I.** Inhibice růstu *S. enterica* sérotyp *Typhimurium* CCM 7205 acidifikovanými, neutralizovanými a neutralizovanými a zahřátými supernatanty testovaných kmenů

## Závěr

Testované kmeny charakterizované jako *Lactocasei-bacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* a *Lactobacillus gasseri* získané z mateřského mléka a stolice kojenců prokázaly probiotický potenciál, především *Lcb. rhamnosus* 21/S/1E izolovaný ze stolice. Pro aplikaci do výrobků je však potřeba otestovat další funkční vlastnosti, např. adhezenci, auto-agregaci, antioxidační aktivitu nebo technologické aspekty, jako jsou produkce exopolysacharidů, odolnost při mechanickém zpracování, životaschopnost v dané matici či vliv na senzorické vlastnosti výrobků.

## Poděkování

Tato práce mohla být uskutečněna díky finanční podpoře Národní agentury pro zemědělský výzkum (MZe ČR) při řešení projektu č. QK1910024 a za podpory MZE-RO1422.

## Literatura

- ASAN-OZUSAGLAM M., GUNYAKTI A. (2019): *Lactobacillus fermentum* strains from human breast milk with probiotic properties and cholesterol-lowering effects. *Food science and biotechnology*, 28 (2), s. 501–509.
- DAVOODABADI A., DALLAL M. M. S., FOROUSHANI A. R., DOURAGHI M., HARATI F. A. (2015): Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe*, 34, s. 53–58.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008): Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA Journal* 732: 1–15.
- ELLI M., ZINK R., RYTZ A., RENIERO R., MORELLI L. (2000): Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *Journal of applied microbiology*, 88 (4), s. 695–703.
- HUSAIN S. (2008): Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. *Current microbiology*, 57 (4), s. 331–334.
- FAO/WHO (2002): Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, London, Ontario.
- HADDAJI N., MAHDHI A. K., KRIFI B., ISMAIL M. B., BAKHROUF A. (2015): Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment. *FEMS Microbiol Lett*, 362 (9).
- HUMMEL A. S., HERTEL C., HOLZAPFEL W. H., FRANZ C. M. (2006): Antibiotic resistances of lactic acid bacteria starter and probiotic strains. *Applied and Environmental Microbiology*.
- CHENG L., AKKERMAN R., KONG C., WALVOORT M. T. C., DE VOS P. (2021): More than sugar in the milk: human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61 (7), s. 1184–1200.
- IMPERIAL I. C., IBANA J. A. (2016): Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: reducing the risk of its double-edged sword effect. *Frontiers in microbiology*, 7, s. 1983.
- JÉQUIER E. (2002): Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*, 967, s. 379–88.
- KOSTELAC D., GERIĆ M., GAJSKI G., MARKOV K., DOMIJAN A. M., ČANAK I., JAKOPOVIĆ Ž., SVETEC I. K., ŽUNAR B., FRECE J. (2021): Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal*, 112, s. 104828.
- KRAUSOVA G., HYRSLOVA I., HYNSTOVA I. (2019): *In Vitro* Evaluation of Adhesion Capacity, Hydrophobicity, and Auto-Aggregation of Newly Isolated Potential Probiotic Strains. *Fermentation*, 5 (4), s. 100.
- LIASI S., AZMI T., HASSAN M., SHUHAIMI M., ROSFARIZAN M., ARIFF A. (2009): Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, *Malaysian Journal of Microbiology*, 5 (1), s. 33–37.
- MORROW L. E., GOGINENI V., MALESKER M. A. (2012): Probiotics in the intensive care unit. *Nutrition in clinical practice*, 27 (2), s. 235–241.
- PEREIRA M. G. V., DE OLIVEIRA COELHO B., MAGALHÃES JÚNIOR A. I., THOMAZ-SOCCOL V., SOCCOL C. R. (2018): How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv*, 36 (8), s. 2060–2076.
- RASTOGI S., MITTAL V., SINGH A. (2020): In vitro assessment of antioxidant and antimicrobial potential of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human milk and infant faeces. *J Pure Appl Microbiol*, 14 (2), s. 1305–131
- RATSEP M., NAABER P., KOLJALG S., SMIDT I., SHKUT E., SEPP E. (2014): Effect of *Lactobacillus plantarum* strains on clinical isolates of *Clostridium difficile* in vitro. *J. Probiotics Health*, 2, s. 1–5.
- RIAZ RAJOKA M. S., MEHWISH H. M., SIDDIQ M., HAOBIN Z., ZHU J., YAN L., SHAO D., XU X., SHI J. (2017): Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT*, 84, s. 271–280.
- REIS N. A., SARAIVA M. A. F., DUARTE E. A. A., DE CARVALHO E. A., VIEIRA B. B., EVANGELISTA-BARRETO N. S. (2016): Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 121 (3), s. 811–820
- RODRIGUES DA CUNHA L., FERREIRA C. L. F., DURMAZ E., Goh Y. J., SANOKY-DAWES R., KLAENHAMMER T. (2012): Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant. *Gut microbes*, 3 (1), s. 15–24
- SHOKRYAZDAN P., SIEO C. C., KALAVATHY R., LIANG J. B., ALITHEEN N. B., FASELEH JAHROMI M., HO Y. W. (2014): Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed research international*.
- SOUZA B. M. S., BORGONOV I. F., CASAROTTI S. N., TODOROV S. D., PENNA A. L. B. (2019): *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* strains isolated from mozzarella cheese: probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11 (2), s. 382–396.
- SUI Y., LIU J., LIU Y., WANG Y., XIAO Y., GAO B., ZHU D. (2021): In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented tangerine vinegar and their cholesterol degradation activity. *Food Bioscience*, 39, s. 100843.
- VERDENELLI M. C., GHELFI F., SILVI S., ORPIANESI C., CECCHINI C., CRESCI A. (2009): Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European journal of nutrition*, 48 (6), s. 355–363.
- YERLIKAYA O., SAYGILI D., AKPINAR A. (2020): Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Science and Technology*, 41, s. 418–425.
- ZHANG Q. (2019): Lactic acid bacteria and bacteriocins, Lactic acid bacteria, *Springer*, s. 61–91.
- SCHÄR-ZAMMARETTI P., UBBINK J. (2003): The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*, 85 (6), s. 4076–4092.
- ZHENG J., WITTOUCK S., SALVETTI E., FRANZ C., HARRIS H. M. B., MATARELLI P., O'TOOLE P. W., POT B., VANDAMME P., WALTER J., WATANABE K., WUYTS S., FELIS G. E., GÄNZLE M. G. a LEBEER S. (2020): A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70 (4), s. 2782–2858.

**Korespondující autor:** Ing. Ivana Hyršlová  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6, e-mail: hyrslova@milcom-as.cz

Přijato dne: 11. 8. 2022  
Lektorováno: 15. 9. 2022