

## PŮVODNÍ PRÁCE

# Testovanie potenciálne probiotických laktobacilov pre použitie vo výživových doplnkoch

## Testing of the potentially probiotic lactobacilli for use in food supplements

Andrea Bilková • František Bilka • Hana Kiňová Sepová • Andrea Balažová

Došlo 23. listopadu 2012 / Přijato 14. ledna 2013

### Souhrn

Niektoré kmene laktobacilov sú vďaka svojim probiotickým vlastnostiam využívané v potravinárstve a vo výživových doplnkoch. Na našom pracovisku je testovaných 8 kmeňov laktobacilov, pochádzajúcich zo žalúdočných slizníc jahňat a kozľaťa, na potenciálne využitie v probiotických prípravkoch pre humánnu, a/alebo veterinárnu medicínu. Sanguinarín je majoritným alkaloidom *in vitro* kultúr rastlín čeľade *Papaveraceae*. Vďaka svojmu antimikróbnemu, antimykotickému, antiplakovému a protizápalovému účinku našiel uplatnenie v stomatologických prípravkoch. Spolu s ďalšími alkaloidmi je obsiahnutý aj v prípravku na zvýšenie apetítu hospodárskych zvierat. V tejto práci sme sa zamerali na sledovanie antibakteriálneho vplyvu sanguinarínu, vyizolovaného zo suspenzných kultúr maku sateho, na vybrané kmene laktobacilov. Z nami testovaných laktobacilov bol voči sanguinarínu najmenej citlivý *L. reuteri* KO5 s MIC 0,6 mg.ml<sup>-1</sup>. Nasledovali *L. murinus* C, *L. mucosae* D a *L. plantarum* KG4, zhodne s MIC 0,3 mg.ml<sup>-1</sup>. V prípade použitia kombinácie dvoch a viacerých kmeňov mikroorganizmov v jednom prípravku je potrebné poznať ich vzájomnú schopnosť ovplyvňovať svoj rast a prežívanie. Na testovanie vzájomného vplyvu laktobacilov bola použitá prúžková metóda na agarových platniach. Zo získaných výsledkov vyplýva, že pre použitie v kombinovaných prípravkoch sú najvhodnejšie kmene *L. reuteri* E, *L. plantarum* KG1 a *L. reuteri* KO4m.

**Kľúčové slová:** *Lactobacillus* spp. • probiotiká • výživové doplnky • sanguinarín

### Summary

Some lactobacilli strains are used as probiotics in food industry and in dietary supplements. Eight lactobacilli strains, originated from the stomach of the lamb and goatling, are tested for their potential use in human and/or veterinary medicine in our department. Sanguinarine is a major alkaloid of *Papaveraceae* suspension cultures. For its antimicrobial, antifungal, anti-plaque and anti-inflammatory properties sanguinarine found application in dental preparations. A mixture of sanguinarine with other alkaloids is used for appetite stimulation of livestock. This paper is focused on testing of selected lactobacilli sensitivity to sanguinarine, isolated from the opium poppy suspension cultures. *L. reuteri* KO5 demonstrated the lowest sensitivity (MIC 0.6 mg.l<sup>-1</sup>). Other less sensitive strains were *L. murinus* C, *L. mucosae* D and *L. plantarum* KG4 (MIC 0.3 mg.l<sup>-1</sup>). For a combination of more strains of microorganisms in one preparation it is necessary to know their ability to influence their growth and survival. To test the mutual influence of lactobacilli, the streak line method on agar plates was used. The results show that the strains *L. reuteri* E, *L. plantarum* KG1 a *L. reuteri* KO4m are the most suitable ones for the use in combinations.

**Keywords:** *Lactobacillus* spp. • probiotics • food supplements • sanguinarine

### Úvod

Probiotické mikroorganizmy majú vysoko pravdepodobne pozitívny účinok na zdravie ľudí a zvierat<sup>1–6</sup>. Medzi nimi majú dominantné postavenie kmene patriace k rodu *Lactobacillus*. Okrem priaznivého účinku napr. na zloženie gastrointestinálnej mikrobioty, možnosti ovplyvnenia niektorých ochorení gastrointestinálneho traktu a schopnosti modulovať imunitnú odpoveď makroorganizmu sa ukazuje ich možné využitie pri prevencii vzniku zubného kazu. Napríklad Nikawa et al.<sup>7</sup> pozorovali, že konzumácia jogurtu s obsahom *L. reuteri* ATCC 55730 mala signifikantný vplyv na inhibíciu rastu *Streptococcus mutans* v ústnej dutine sledovaných osôb. Rovnako denný príjem probiotických baktérií (*L. reuteri* ATCC

Mgr. Andrea Bilková, PhD. (✉) • F. Bilka • H. Kiňová Sepová • A. Balažová  
Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta,  
Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv  
Kalinčiaková 8, 832 32 Bratislava, Slovenská republika  
e-mail: bilkova@fpharm.uniba.sk

55730/ATCC PTA 5289) obsiahnutých v žuvačkách významne redukoval množstvo *Streptococcus mutans* v slinách mladistvých<sup>8</sup>). Za tento efekt zodpovedajú pravdepodobne rôzne látky s antimikróbnyim účinkom, ktoré produkujú niektoré kmene laktobacilov, napr. organické kyseliny (mliečna, propiónová, octová), peroxid vodíka, CO<sub>2</sub>, bakteriocíny (antimikróbne pôsobiace peptidy alebo proteíny), reuterín, reutericyklín a i.<sup>5,9,10</sup>).

Producentmi sekundárneho metabolitu sanguinarínu sú najmä rastliny čeľade *Papaveraceae*, napr. makovec srdcovitý (*Macleaya cordata* Willd. R. Br.), slnčovník kalifornský (*Eschscholtzia californica* Cham.), lastovičník väčší (*Chelidonium majus* L.), krvavček kanadský (*Sanguinaria canadensis* L.) a mak siaty (*Papaver somniferum* L.). Východzu aminokyselinou v biosyntéze tohto benzo[c]fenantridínového alkaloidu je tyrozín a v súčasnosti sú už známe a aspoň čiastočne charakterizované všetky enzýmy, zúčastňujúce sa tvorby sanguinarínu<sup>11</sup>). Vo vodnom prostredí je sanguinarín v rovnováhe medzi formou kvartérneho kationu a formou 6-hydroxy-5,6-dihydroderivátu (tzv. pseudobáza, alebo alkanolamín)<sup>12</sup>). Sanguinarín vykazuje veľmi široké spektrum biologických účinkov, ktorých detailný prehľad je spracovaný v publikácii Zdařilovej a kol.<sup>13</sup>). Kombinácia antimikróbneho, antimykotického, antiplakového a protizápalového účinku<sup>14</sup>) je výhodná hlavne pre stomatologickú aplikáciu v liečbe a prevencii zápalových ochorení parodontu<sup>15</sup>). U sanguinarínu bola zaznamenaná bakteriostatická a baktericídna aktivita voči Gram pozitívnym (G+) a Gram negatívnym (G-) baktériám a tiež aktivita voči plesniam a kvasinkám. Existujú štúdie o jeho inhibičných účinkoch na *Mycobacterium* spp.<sup>16</sup>), *Helicobacter pylori*<sup>17</sup>) a *Trypanosoma brucei*<sup>18</sup>). Navarro a Delgado<sup>19</sup>) zistili aj inhibičnú aktivitu dihydrosanguinarínu voči *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a *Candida albicans*.

V predkladanej práci sme sa zamerali na sledovanie antibakteriálneho vplyvu sanguinarínu, vyzolovaného zo suspenzných kultúr maku siateho, na vybrané kmene laktobacilov. Tieto kmene sú testované ako potenciálni kandidáti pre využitie v probiotických prípravkoch pre humánu, a/alebo veterinárnu medicínu<sup>6,20</sup>). Zároveň sme sledovali schopnosť testovaných laktobacilov ovplyvňovať vzájomne svoj rast a prežívanie. Získané výsledky bude možné využiť pri príprave vhodnej zmesi dvoch alebo viacerých kmeňov do kombinovaných probiotických prípravkov. Takéto kombinované prípravky laktobacilov a prípadne sanguinarínu by mohli nájsť nové uplatnenie v ústnej hygiene, prípadne ako doplnky výživy pre veterinárne použitie.

## Pokusná časť

### Izolácia sanguinarínu

V experimente sme použili sanguinarín, ktorý sme vyzolovali zo suspenzných kultúr maku siateho (cv. Ger-

lach) v rámci experimentov, popísaných v práci Balažovej a kol.<sup>21</sup>).

### Pôvod a kultivácia baktérií

Inhibičný účinok izolovaného sanguinarínu a schopnosť laktobacilov ovplyvňovať navzájom svoj rast a prežívanie sme testovali na kmeňoch *Lactobacillus reuteri* CCM 3625 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, ČR), *L. reuteri* E, *L. reuteri* KO4b, *L. reuteri* KO4m, *L. reuteri* KO5, *L. mucosae* D, *L. murinus* C, *L. plantarum* KG1 and *L. plantarum* KG4 (všetky izolované, identifikované a uchovávané na Katedre bunkovej a molekulárnej biológie liečiv FaF UK, Bratislava, SR)<sup>22,23</sup>) a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (American Type Culture Collection, USA). Laktobacily sme kultivovali v MRS bujóne (de Man, Rogosa, Sharpe; Oxoid, Veľká Británia) za anaeróbnych podmienok pri 37 °C 24 h. *S. aureus* sme kultivovali v živnom bujóne (Imuna, Šarišské Michaľany, SR) aeróbne pri 37 °C 24 h. Pre ďalšie experimenty sme používali suspenzie baktérií vo fyziologickom roztoku nariadené, ako je to uvedené nižšie.

### Stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie sanguinarínu

Pri stanovení minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) sanguinarínu sme postupovali podľa metódy Mlynarčíka a kol.<sup>24</sup>). V krátkosti, do 96-jamkovej mikrotitračnej platničky sme aplikovali 100 µl dvakrát koncentrovaného MRS bujónu pre laktobacily alebo živného bujónu pre *S. aureus*, pričom následne sme do prvých jamiek troch radov pipetovali po 100 µl zásobného roztoku sanguinarínu (1,2 mg.ml<sup>-1</sup>) v 50% metanole. Ďalej sme roztok sanguinarínu riedili dvojkovým radom, čím sme získali 24 rôznych koncentrácií testovanej látky v troch paralelných testoch. Posledné dva rady jamiek sme použili ako kontrolu: namiesto roztoku sanguinarínu sme do 1. jamky 1. radu aplikovali 50% metanol (vehikulum) a do 1. jamky 2. radu MRS bujón. Následne sme aj obsah týchto jamiek riedili dvojkovým radom. Baktérie sme nariedili vo fyziologickom roztoku na počet 10<sup>5</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>. Následne sme do všetkých jamiek inokulovali bakteriálne suspenzie v množstve 5 µl/jamka. Takto inokulované baktérie sme inkubovali anaeróbne (laktobacily) alebo aeróbne (*S. aureus*) 24 h pri 37 °C. MIC sanguinarínu sme stanovovali hodnotením prítomnosti rastu jednotlivých testovaných baktérií, vyočkovaných inokulátorom na MRS agar (laktobacily) alebo krvný agar (*S. aureus*) po následnej 24 h inkubácii.

### Průzková metoda na agarových platniach

Na hodnotenie schopnosti laktobacilov ovplyvňovať vzájomne svoj rast a prežívanie sme použili průzkovú metódu na agarových platniach<sup>20,25,26</sup>).

Po kultivácii v MRS bujóne sme kultúry laktobacilov, usadené centrifugáciou (1000 x g.10 min<sup>-1</sup>) a dvakrát premyté 0,85% roztokom NaCl nariedili v 0,85% roztoku NaCl podľa stupnice McFarlanda na stupeň 3 (denzitometer CrystalSpec™ Becton Dickinson, USA). Cez stred

platne (Ø 9,6 cm) s modifikovaným MRS agarom (MRS agar bez citrátu triamónneho a acetátu sodného) sme očkovali producentské kmene laktobacilov v línii v objeme 20 µl a inkubovali po dobu 24 h alebo 48 h v anaeróbných podmienkach. Následne sme laktobacily usmrtili 2 h inkubáciou v parách chloroformu. Indikačné laktobacily sme očkovali v objeme 10 µl v líniiach kolmých na líniu producentských kmeňov laktobacilov a inkubovali 24 h pri 37 °C za anaeróbných podmienok. Urobili sme aj modifikovaný experiment, pri ktorom sme indikačné kmene laktobacilov naočkovali bezprostredne po naočkovaní producentských kmeňov a následne sme všetky baktérie inkubovali 24 h pri 37 °C za anaeróbných podmienok. V tomto prípade neboli producentské kmene usmrtené chloroformom (0 h pre-inkubácia).

Po poslednej inkubácii sme merali zónu inhibície rastu indikačných laktobacilov v mm.

Inhibičnú zónu dlhú 0–12 mm sme hodnotili ako slabú inhibíciu, 13–24 mm ako stredne silnú inhibíciu a zónu väčšiu ako 25 mm ako vysokú inhibíciu<sup>25, 26</sup>.

#### Testovanie baktericídneho alebo bakteriostatického efektu produktov laktobacilov

Zo zóny, kde bol rast indikačných laktobacilov inhibovaný sme inokulačnou kľučkou odobrali 1 µl vzorky a kultivovali sme ju na modifikovanom MRS agare 48 h pri 37 °C za anaeróbných podmienok. Následne sme hodnotili prítomnosť alebo neprítomnosť rastu laktobacilov. V prípade, že nebol detegovaný žiadny rast indikačnej baktérie, považovali sme účinok látok vyprodukovaných producentským kmeňom laktobacila za baktericídny voči testovanému indikačnému kmeňu. V prípade, že indikačný laktobacil vyrástol, považovali sme účinok látok, vyprodukovaných producentským kmeňom laktobacila, za bakteriostatický voči testovanému indikačnému kmeňu.

#### Výsledky a diskusia

Zmes benzo[c]fenantridínových alkaloidov (okrem sanguinarínu obsahuje najmä chelerytrín) izolovaných z *Macleaya cordata* je používaná na podporu chuti do jedla napr. u prasiat, hydiny a hovädzieho dobytky v príprav-

Tab. 1. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) sanguinarínu voči testovaným baktériám

Bakteriálny kmeň (10 <sup>4</sup> CFU.ml <sup>-1</sup> )	MIC (mg.ml <sup>-1</sup> )
<i>L. reuteri</i> CCM 3625	0,150
<i>L. murinus</i> C	0,300
<i>L. mucosae</i> D	0,300
<i>L. reuteri</i> E	0,150
<i>L. reuteri</i> KO5	0,600
<i>L. reuteri</i> KO4m	0,150
<i>L. reuteri</i> KO4b	0,075
<i>L. plantarum</i> KG1	0,075
<i>L. plantarum</i> KG4	0,300
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,150

ku Sangrovit (Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH., Nemecko)<sup>27–29</sup>. Prípravok registrovaný v EÚ podporuje tvorbu slín a činnosť tráviacich žliaz. Pritom sa ukazuje, že sanguinarín nie je v tráviacom trakte metabolizovaný na potenciálne nebezpečný benzo[c]fenantridín, ako sa pôvodne predpokladalo a tiež, že nie je takmer vôbec resorbovaný<sup>30</sup>.

V súčasnosti WHO zaradila vznikajúcu rezistenciu mikroorganizmov na antibiotiká medzi tri najväčšie hrozby pre ľudské zdravie. Následne Európska komisia vydala nariadenie, ktoré od 1. januára 2006 zakazuje používanie antibiotík ako rastových promótorov v krmivách s výnimkou kokcidostatík a histomonostatík (EC Regulation 1831/2003). Preto probiotiká so svojim širokým antimikrobiálnym potenciálom poskytujú sľubnú alternatívu. Ich používanie ako krmivových doplnkov sa ukazuje ako prospešné práve u úžitkových zvierat<sup>31</sup>. Kombinované prípravky laktobacilov a sanguinarínu (resp. súčasné podávanie výživových doplnkov s ich obsahom) by mohli nájsť uplatnenie v živočíšnej výrobe a vo veterinárnej praxi.

V humánnej medicíne sa zdá prospešné využitie probiotických mikroorganizmov a alkaloidu sanguinarínu v ústnej hygiene. Antimikrobiálny, antiinflamačný a antiplakový účinok sanguinarínu sa využíva vo viacerých stomatologických prípravkoch (zubná pasta a ústna voda Santoin, Walmark, ČR). Ako bolo spomenuté v úvode, laktobacily sa zase ukazujú byť prospešnými v prevencii tvorby zubného kazu. Predpokladaným mechanizmom ich účinku je produkcia antibakteriálnych látok, účinných voči jeho pôvodcom<sup>32–35</sup>. Zároveň je však nutné spomenúť aj opačný názor – v niektorých publikáciách sa autori prikláňajú k názoru, že laktobacily kolonizujú zubné kazy, iniciované inými baktériami a pre ich schopnosť tvorby organických kyselín sa môžu spolupodieľať na rozširovaní lézií<sup>36, 37</sup>.

V tejto práci testované laktobacily už boli charakterizované z hľadiska ich imunomodulačných vlastností, schopnosti ovplyvniť rast patogénnych a potenciálne patogénnych mikroorganizmov a produkcie antimikrobiálne pôsobiacich látok<sup>6, 20, 23</sup>. V predkladanej práci sme sa preto zamerali na schopnosť týchto laktobacilov, ako potenciálnych probiotických kandidátov, prežívať v prítomnosti rôznych koncentrácií sanguinarínu. Pre porovnanie baktericídneho účinku sanguinarínu voči testovaným laktobacilom sme použili zbierkové kmene *L. reuteri* CCM 3625 a *S. aureus* ATCC 6538. Minimálne inhibičné koncentrácie sanguinarínu voči testovaným baktériám sú uvedené v tabuľke 1. Z nami testovaných baktérií bol voči sanguinarínu najmenej citlivý kmeň *L. reuteri* KO5 s MIC 0,600 mg.ml<sup>-1</sup>. Nasledovali kmene *L. murinus* C a *L. mucosae* D a *L. plantarum* KG4, u všetkých troch bola MIC 0,300 mg.ml<sup>-1</sup>. Tieto štyri kmene laktobacilov sa preto javia v porovnaní s kmeňmi *L. reuteri* E, *L. reuteri* KO4m, *L. reuteri* KO4b a *L. plantarum* KG1 pre použitie v kombinácii so sanguinarínom ako perspektívnejšie. Nami stanovená MIC sanguinarínu pre *S. aureus* bola 0,15 mg.ml<sup>-1</sup>. Zaujímavé je, že Navarro a Delgado<sup>19</sup> zaznamenali u tohto kmeňa pomerne vysokú citlivosť na di-

Tab. 2. Zóny inhibície rastu indikačných kmeňov laktobacilov po 24 h pre-inkubácii producentských kmeňov

Producentský kmeň Indikačný kmeň	Zóna inhibície rastu (mm)							
	<i>L. murinus</i> C	<i>L. mucosae</i> D	<i>L. reuteri</i> E	<i>L. reuteri</i> KO5	<i>L. reuteri</i> KO4m	<i>L. reuteri</i> KO4b	<i>L. plantarum</i> KG1	<i>L. plantarum</i> KG4
<i>L. murinus</i> C	–	1,50 ± 1,05	2,15 ± 1,20	1,00 ± 0,64	4,55 ± 0,55	1,34 ± 0,62	4,50 ± 0,84	6,40 ± 0,55
<i>L. mucosae</i> D	1,92 ± 0,55	–	1,60 ± 0,77	1,00 ± 0,50	4,67 ± 0,52	1,17 ± 0,76	4,00 ± 0,80	5,84 ± 0,76
<i>L. reuteri</i> E	1,87 ± 0,52	1,42 ± 0,64	–	1,17 ± 0,76	4,00 ± 0,00	1,34 ± 0,62	3,84 ± 0,99	5,17 ± 0,76
<i>L. reuteri</i> KO5	0,00 ± 0,00	1,84 ± 0,76	3,00 ± 1,10	–	3,34 ± 1,04	0,84 ± 0,40	2,17 ± 0,41	5,17 ± 0,99
<i>L. reuteri</i> KO4m	0,00 ± 0,00	3,84 ± 0,99	4,67 ± 1,76	0,67 ± 0,32	–	0,84 ± 0,40	3,17 ± 0,41	5,84 ± 0,80
<i>L. reuteri</i> KO4b	0,00 ± 0,00	2,50 ± 0,55	3,34 ± 1,51	0,84 ± 0,38	2,67 ± 0,52	–	2,67 ± 0,52	5,17 ± 0,76
<i>L. plantarum</i> KG1	0,00 ± 0,00	3,50 ± 1,05	4,17 ± 0,76	1,67 ± 0,80	4,00 ± 0,80	1,67 ± 0,74	–	5,34 ± 1,37
<i>L. plantarum</i> KG4	0,00 ± 0,00	3,34 ± 1,22	5,34 ± 1,04	1,17 ± 0,55	5,00 ± 0,80	0,84 ± 0,40	4,34 ± 0,82	–

Hodnoty sú aritmetickým priemerom zo šiestich paralelných experimentov ± SD.

Tab. 3. Zóny inhibície rastu indikačných kmeňov laktobacilov po 48 h pre-inkubácii producentských kmeňov

Producentský kmeň Indikačný kmeň	Zóna inhibície rastu (mm)							
	<i>L. murinus</i> C	<i>L. mucosae</i> D	<i>L. reuteri</i> E	<i>L. reuteri</i> KO5	<i>L. reuteri</i> KO4m	<i>L. reuteri</i> KO4b	<i>L. plantarum</i> KG1	<i>L. plantarum</i> KG4
<i>L. murinus</i> C	–	3,84 ± 0,99	5,84 ± 1,37	19,84 ± 2,23	9,50 ± 1,23	14,84 ± 2,41	7,84 ± 1,17	20,20 ± 1,31
<i>L. mucosae</i> D	9,40 ± 1,92	–	6,50 ± 1,58	7,60 ± 0,55	3,17 ± 0,41	7,34 ± 1,04	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,64
<i>L. reuteri</i> E	9,25 ± 1,86	5,34 ± 0,75	–	8,50 ± 1,38	4,32 ± 0,52	6,17 ± 1,17	2,34 ± 0,52	11,50 ± 1,38
<i>L. reuteri</i> KO5	3,67 ± 1,04	12,17 ± 0,41	3,17 ± 0,41	–	4,17 ± 0,41	9,50 ± 0,55	1,92 ± 0,21	13,84 ± 1,33
<i>L. reuteri</i> KO4m	2,67 ± 0,84	10,67 ± 0,82	4,17 ± 0,41	11,84 ± 1,73	–	8,17 ± 0,76	3,34 ± 0,52	13,34 ± 0,32
<i>L. reuteri</i> KO4b	3,84 ± 1,07	11,34 ± 0,52	2,84 ± 0,41	10,17 ± 1,33	4,17 ± 0,76	–	2,34 ± 0,52	13,00 ± 0,64
<i>L. plantarum</i> KG1	4,67 ± 0,52	10,17 ± 0,99	3,34 ± 0,52	11,34 ± 0,52	5,00 ± 0,64	6,00 ± 1,27	–	12,84 ± 0,76
<i>L. plantarum</i> KG4	5,50 ± 1,05	9,34 ± 1,04	2,00 ± 0,00	7,84 ± 1,33	2,84 ± 0,41	8,34 ± 0,82	1,00 ± 0,00	–

Hodnoty sú aritmetickým priemerom zo šiestich paralelných experimentov ± SD.

hydrosanguinarín (MIC 0,0093 mg.ml<sup>-1</sup>), ktorý je redukovaným derivátom sanguinarínu.

Aby si zabezpečili selekčnú výhodu vo svojom environmentálnom prostredí, produkujú mnohé kmene laktobacilov rôzne látky s antimikróbnym účinkom. Tieto látky pôsobia bakteriostaticky alebo baktericídne nielen na rôzne patogénne a potenciálne patogénne mikroorganizmy (napr. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Candida albicans*), ale často sú účinné aj voči iným druhom laktobacilov a dokonca aj voči iným kmeňom rovnakého druhu, ako je sám producent<sup>5, 10</sup>). Preto sme sa v ďalšej časti práce zamerali na sledovanie schopnosti testovaných laktobacilov ovplyvňovať vzájomne svoj rast a prežívanie. Vzájomná koexistencia dvoch, resp. viacerých probiotických kmeňov v kombinovanom prípravku, môže totiž ovplyvniť účinnosť tohto prípravku. Na testovanie inhibičného potenciálu laktobacilov sme použili prúžkovú metódu na agarových platniach, ktorou sme už v minulosti testovali inhibičný potenciál laktobacilov voči vybraným oportúnnym patogénom<sup>20</sup>). Tento experiment umožňuje sledovať schopnosť extracelulárnych produktov laktobacilov potláčať rast iných mikroorganizmov.

Z výsledkov vyplýva, že čím bola dlhšia doba pre-inkubácie producentských kmeňov, tým bol silnejší aj ich inhibičný potenciál voči ostatným laktobacilom (tab. 2

a 3). V prípade, že sme producentské a indikačné kmene laktobacilov očkovali na platne bezprostredne po sebe, nepozorovali sme žiadne zóny inhibície rastu ani u jedného z indikačných kmeňov (údaje neuvádzame). Najvyšší inhibičný potenciál z producentských kmeňov sme pozorovali u *L. plantarum* KG4 po 24 aj 48 h pre-inkubácii. Najnižšiu inhibičnú aktivitu preukázali kmene *L. murinus* C (po 24 h pre-inkubácii) a *L. plantarum* KG1 (po 48 h pre-inkubácii). Kmeň *L. murinus* C po takto dlhej pre-inkubácii neinhiboval rast väčšiny ostatných laktobacilov. 24 h pre-inkubácia pravdepodobne nie je dostatočne dlhá na to, aby táto baktéria vyprodukovala dostatok účinných látok. Slabo inhiboval iba kmene *L. mucosae* D a *L. reuteri* E, spolu s ktorými bol izolovaný zo žalúdočnej sliznice jahňat'a. Zaujímavé výsledky sme pozorovali pri *L. reuteri* E a *L. plantarum* KG1, ktoré mali proti niektorým kmeňom nižšiu inhibičnú aktivitu po 48 h preinkubácii ako po 24 h. Ako najcitlivejší voči látkam, produkovaným ostatnými laktobacilmi sa ukázal byť *L. murinus* C. Najmenej citlivé boli *L. reuteri* KO5 (po 24 h pre-inkubácii producentov) a *L. plantarum* KG4 (po 48 h pre-inkubácii producentov).

Antimikróbne látky, produkované laktobacilmi do pevného média mali voči všetkým indikačným kmeňom bakteriostatický a nie baktericídny účinok.

Z hľadiska vzájomného pôsobenia nie sú medzi testovanými laktobacilmi výrazné rozdiely. Po 24 h pre-inku-



bácii všetky produkčné kmene vykazovali slabú inhibíciu rastu indikačných kmeňov (tab. 2). Po 48 h pre-inkubácii sme stredne silnú inhibíciu voči jednému z indikačných laktobacilov zaznamenali u produkčných kmeňov *L. mucosae* D, *L. reuteri* KO5 a *L. reuteri* KO4b. Jedine *L. plantarum* KG4 stredne silno inhiboval rast piatich zo siedmich indikačných kmeňov (tab. 3). Silný typ inhibície sme nezaznamenali ani v jednom prípade. Na základe získaných výsledkov za najvhodnejšie pre použitie v kombinovaných prípravkoch považujeme kmene *L. reuteri* E, *L. plantarum* KG1 a *L. reuteri* KO4m. Tieto kmene vykazovali najnižší inhibičný potenciál po 48 h pre-inkubácii a súčasne boli relatívne odolné voči antimikróbnemu účinku ostatných testovaných laktobacilov. Za kmene menej vhodné pre použitie v kombinovaných prípravkoch považujeme *L. murinus* C a *L. plantarum* KG4. Prvý pre najnižšiu schopnosť rásť v prítomnosti ostatných testovaných laktobacilov a druhý pre najvyššiu schopnosť inhibovať rast indikačných kmeňov.

**Stret záujmov:** žiadny.

## Literatúra

- Coudeyras S., Jugie G., Vermerie M., Forestier Ch. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2008; <http://www.hindawi.com/journals/idoj/2008/549640/> (13.11.2012)
- Myllyluoma E., Ahonen A. M., Korpela R., Vapaatalo H., Kankuri E. Effects of multispecies probiotic combination on *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15, 1472–1482.
- Lin P. P., Hsieh Y. M., Tsai Ch. Ch. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* RY2 isolated from healthy infancy feces on the growth and adhesion characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Anaerobe* 2009; 15, 122–126.
- Sepp E., Stšepetova J., Smidt I., Rätsep M., Kõljalg S., Lõivukene K., Mändar R., Jaanimäe L., Löhr H.I., Natás O.B., Naaber P. Intestinal lactoflora in Estonian and Norwegian patients with antibiotic associated diarrhea. *Anaerobe* 2011; 17, 407–409.
- Bilková A., Kiňová Sepová H., Bilka F., Balažová A. Bakteriocíny produkované baktériami mliečného kvasenia. *Čes. a slov. Farm.* 2011; 60, 65–72.
- Kiňová Sepová H., Dubničková M., Bilková A., Bukovský M., Bezáková L. Identification and biological activity of potential probiotic bacterium isolated from the stomach mucus of breast-fed lamb. *Braz. J. Microbiol.* 2011; 42, 1188–1196.
- Nikawa H., Makihira S., Fukushima H., Nishimura H., Ozaki Y., Ishida K., Darmawan S., Hamada T., Hara K., Matsumoto A., Takemoto T., Aimi R. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 95, 219–223.
- Caglar E., Kavaloglu S. C., Kuscü O. O., Sandalli N., Holgerson P. L., Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin. Oral Investig.* 2007; 11, 425–429.
- Ouwehand A. C., Vesterlund S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. C. eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and functional aspects*, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 2004.
- Kiňová Sepová H., Bilková A., Bilka F., Bezáková L. Antimikróbne pôsobiace látky produkované baktériami mliečného kvasenia. *Čes. a slov. Farm.* 2010; 59, 155–159.
- Bilková A., Bilka F., Bezáková L. Enzymológia tvorby benzylizochinolíkových alkaloidov. *Čes. slov. Farm.* 2005; 54, 17–22.
- Dostál J., Slavík J. Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech. *Chem. Listy* 2000; 94, 15–20.
- Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V. Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky *in vitro* a *in vivo*. *Chem. Listy* 2006; 100, 30–41.
- Simeon S., Rios J. L., Villar A. Pharmacological activities of benzophenanthridine and phenanthrene alkaloids. *Pharmazie* 1989; 44, 593–597.
- Walterová D., Ulrichová J., Valka I., Vičar J., Vavrečková C., Táborská E., Harkrader R. J., Meyer D. L., Černá H., Šimánek V. Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine: Biological activities and dental care applications. *Acta Univ. Palacky Olomouc Fac. Med.* 1995; 139, 7–16.
- Newton S. M., Lau C., Gurcha S. S., Besra G. S., Wright C. W. The evaluation of fourty-three plant species for *in vitro* antimicrobial activities. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 79, 57–67.
- Mahady G. B., Pendland S. L., Stoia A., Chadwick L. R. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. *Phytother. Res.* 2003; 17, 217–221.
- Merschjohann K., Sporer F., Steverding D., Wink M. *In vitro* effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. *Planta Med.* 2001; 67, 623–627.
- Navarro V., Delgado G. Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 66, 223–226.
- Bilková A., Kiňová Sepová H., Bukovský M., Bezáková L. Antibacterial potential of lactobacilli isolated from a lamb. *Vet. Med.* 2011; 56, 319–324.
- Balažová A., Blanáriková V., Bilka F., Bilková A., Kiňová Sepová, H. Efekt troch rôznych elicitorov na produkciu sanguinarínu suspenznými kultúrami nízko-morfínovej odrody maku siateho (*Papaver somniferum* L.). *Čes. slov. Farm.* 2011; 60, 237–240.
- Bilková A., Kiňová Sepová H., Bilka F., Bukovský M., Balažová A., Bezáková, L. Identification of newly isolated lactobacilli from the stomach mucus of lamb. *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 2008; 55, 64–72.
- Kiňová Sepová H., Bilková A. Isolation and identification of new lactobacilli from goatling stomach and investigation of reuterin production in *Lactobacillus reuteri* strains. *Folia Microbiol* 2003; 58, 33–38.
- Mlyнарčík D., Bukovský M., Čupková V., Sirotková L. Praktické cvičenia z mikrobiológie a imunologických prípravkov. Skriptá, FaF UK Bratislava, 1995, 160.
- Annuk H., Shchepetova J., Kullisaar T., Songisepp E., Zilmer M., Mikelsaar M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 94, 403–412.
- Hütt P., Shchepetova J., Lõivukene K., Kullisaar T., Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 100, 1324–1332.
- Vieira S. L., Oyarzabal O. A., Freitas D. M., Berres J., Pena J. E. M., Torres C. A. Performance of broilers fed diets supplemented with sanguinarine-like alkaloids and organic acid. *J. Appl. Poult. Res.* 2008; 17, 128–133.
- Rawling M. D., Merrifield D. L., Davies S. J. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture* 2009; 294, 118–122.
- Jurkiewicz J., Gruzauskas R., Zdunczyk Z., Semaskaite A., Jankowski J., Totilas Z., Jarule V., Sasyte V., Zdunczyk P., Raceviciute-Stupeliene A., Svirnickas G. Effect of dietary addition of *Macleaya cordata* alkaloid extract on growth performance, caecal indices and breast meat fatty acids profile in male broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2011; 95, 171–178.

30. Zdařilová A., Vrublová E., Vostalová J., Klejduš B., Stejskal D., Prosková J., Kosina P., Svobodová, A., Večera R., Hrbáč J., Černochová D., Vičar J., Ulrichová J., Šimánek V. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46, 3721–3726.
31. Nousiainen J., Javanainen P., Setälä J., von Wright A. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In: Salminen S., Ouwehand A., von Wright A. eds. *Lactic acid bacteria: microbial and functional aspects* 3rd ed. New York: Marcel Dekker 2004.
32. Caglar E., Sandalli N., Twetman S., Kavaloglu S., Ergeneli S., Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol. Scand.* 2005; 63, 317–320.
33. Caglar E., Cildir S. K., Ergeneli S., Sandalli N., Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol. Scand.* 2006; 64, 314–318.
34. Tong H., Chen W., Merritt J., Qi F., Shi W., Dong X. *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Mol. Microbiol.* 2007; 63, 872–880.
35. He X., Lux R., Kuramitsu H. K., Anderson M. H., Shi W. Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. *Adv. Dent. Res.* 2009; 21, 53–56.
36. Tanzer J., Livingston J., Thompson A. The microbiology of primary dental caries in human. *J. Dent. Educ.* 2001; 65, 1028–1037.
37. Švec P., Sedláček I., Žáčková L., Nováková D., Kukletová M. *Lactobacillus* spp. associated with early childhood caries. *Folia Microbiol.* 2009; 54, 53–58.

## ZPRÁVY

## ● Za RNDr. PhMr. Zdeňkem Hanzlíčkem



Ve věku nedožitých jednaděsátí let nás 6. ledna 2013 opustil přední historik naší farmacie RNDr. PhMr. Zdeňkem Hanzlíček. Narodil se 28. ledna 1922 v Plzni, maturoval v roce 1941 na vinohradském gymnáziu v Praze. Od studentských let měl rád dějepis a zvláště se zajímal o heraldiku. Protože za války byly naše vysoké školy zavřeny, nastoupil po maturitě na praxi do lékárny. Po dvou letech složil tyrociniální zkoušku a po válce také farmacii na Karlově univerzitě vystudoval.

Pracoval v různých lékárnách a posléze byl pověřen vedením směšovací lékárny „Na Knížecí“.

Jeho záliba v historii však pokračovala dále a rozšířila se o dějiny vlastního oboru, což později vyústilo ve snahu o založení farmaceutického muzea v Praze. V roce 1954 se prostřednictvím docenta farmaceutické chemie RNDr. PhMr. Aleše Sekery (1922–1961) seznámil s vedoucím Ústavu dějin lékařství Masarykovy univerzity v Brně RNDr. PhMr. Václavem Ruskem. Jejich spolupráce pokračovala i po zrušení brněnské Farmaceutické fakulty a s tím souvisejícím přenesením studia na společnou fakultu v Bratislavě. Kolega Hanzlíček se při tom účastnil výzkumu a také se podílel na vedení a obhajobách diplomových a později i doktorských prací. Mezitím pokročilo úsilí o vytvoření muzea. Farmaceutické památky zachráněné ze zrušených lékáren instaloval kolega Hanzlíček v bývalé Dittrichově lékárně v malostranské Nerudově ulici. V tu dobu již vedl lékárnu Na Pohořelci, odkud přešel do lékařského oddělení KÚNZ Středočeského kraje na místo provozního lékárníka.

V roce 1968 začal dálkově studovat muzeologii na Filozofické fakultě v Brně. Po otevření nové Farmaceutické fakulty UK

v Hradci Králové, kdy již prostory bývalé Dittrichovy lékárny potřebám muzea a rozsahu nashromážděných sbírek nepostačovaly, převzala pražské muzejní sbírky tato nová fakulta a umístila je v Kuksu. Když v roce 1970 získal kolega Hanzlíček doktorát přírodních věd, stal se tajemníkem v Praze připravovaného Mezinárodního kongresu o dějin farmacie a tuto úlohu plnil ještě o dvacet let později, kdy se pořádání téhož kongresu v Praze v roce 1991 opakovalo. V roce 1972 nastoupil do Státního ústavu pro kontrolu léčiv, kde setrval až do důchodu. Při tom se stále ve svém volném čase věnoval dějinám farmacie, bádával v archívech a knihovnách, publikoval výsledky svých prací a pomáhal při organizaci různých historických seminářů a sympozií.

Šíře jeho zájmů byla velmi široká. Zabýval se dějinami léčiv, farmaceutických organizací, biografiemi významných farmaceutů, historií mnoha lékáren, vývojem sítě lékáren a také již výše zmíněnou farmaceutickou muzeologií. Na tato témata proslavil asi osmdesát přednášek a uveřejnil v různých časopisech přes dvě stě článků. Byl autorem knižní publikace o dějinách pražského lékařství (1991), synoptických tabulek k dějinám české farmacie (1975, cyklostyl) a spoluautorem přehledu o vývoji farmacie ve 20. století (2005). Předtím se podílel na přípravě skript „Kapitoly z dějin čs. farmacie“ (1970) a dalších knižních publikací, např. o barokní lékárně v Kuksu (1971) a o vývoji lékařství ve Středočeském kraji (1980). Ještě v důchodu pokračoval v práci na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové, kde se zabýval vývojem biofarmacie a farmakokinetiky i vedením a oponenturami diplomových prací. Byl též konzultantem při vytváření Českého farmaceutického muzea v Kuksu.

Kolega Hanzlíček vždy pečlivě sledoval odbornou literaturu a také v průběhu své praktické činnosti získal mnoho cenných znalostí a praktických zkušeností, o něž se vždy rád a nezištně podělil. Je třeba též připomenout jeho podíl na vzniku a činnosti sekce pro dějiny farmacie, a to ve Společnosti pro dějiny věd a techniky (1960) a později také v České farmaceutické společnosti (1968). Jeho zásluhy byly oceněny udělením čestných členství, a to jak Českou farmaceutickou společností, tak i Společností pro dějiny věd a techniky a Spolkem pro vybudování Českého farmaceutického muzea. Svoji obětavou prací se navždy zapsal do dějin české farmacie a jeho památka nás bude stále inspirovat v našem úsilí o jejich poznání.

P. Drábek