

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Izolace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*
z fekálních vzorků

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

Autor práce: Bc. Zuzana Jílková

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Stanovení bifidobakterií ve funkčních potravinách“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne:.....

Podpis autora práce.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc., za odborný dohled a vedení této diplomové práce.

Děkuji Ing. Věře Bunešové za pomoc a rady při sepsování diplomové práce a za odborné vedení v laboratoři.

Souhrn

Cílem této práce bylo izolovat *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* z fekálních vzorků zvířat. Použito bylo 10 vzorků od telat, 10 vzorků od jehňat a 20 vzorků od psů.

Pro izolaci bifidobakterií byl použit modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s přídavkem mupirocinu, který byl speciálně navržen pro izolaci bifidobakterií. Narostlé kolonie byly přeočkovány do Wilkins-Chalgren bujónu.

Následovala identifikace na úroveň rodu. Pro tuto část byl použit test na přítomnost enzymu F6PPK a rodově specifickou PCR. Test na detekci enzymu fruktosa-6-fosfát fosfoketolasa vyšel u všech vzorků pozitivně. Pro metodu PCR byly použity specificky navržené primery Bif164 a Bif662 a jako negativní kontrola byl zvolen *Lactobacillus casei*.

Po identifikaci vzorků do rodu *Bifidobacterium* spp. následovala identifikace na úroveň druhu. Pro tuto část byla vybrána druhově specifická PCR. Použity byly dvě dvojice specifických primerů Bflac 2/Bflac 5 a Lw A/Lw B. Jako pozitivní kontrola byl použit *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Při vyhodnocení výsledků se s *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* shodovalo 16 ze 40 testovaných vzorků. Všechny 16 vzorků byly izoláty z fekálních vzorků psů.

Pro ověření výsledků byla u těchto 16 vzorků provedena metoda MALDI-TOF MS. Testované kmeny byly rozděleny do dvou skupin. Vzorek 34 a 40 do skupiny velmi pravděpodobné identifikace druhu a zbylých 14 do kategorie bezpečné identifikace rodu, pravděpodobné identifikace na úroveň druhu.

U těchto izolátů se pokračovalo v bližší charakterizaci pomocí fingerprintových metod REP-PCR a RAPD-PCR. Pro metodu REP-PCR byl vybrán primer (GTG)₅, pro metodu RAPD-PCR primer 173 a primer CRA 23. Jejich výsledky byly porovnány a na základně lepšího dělení vzorků byl jako vhodnější vybrán primer 173. U obou metod byl použit jako negativní kontrola kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*.

Z komerčních biochemických souprav byly použity dva testy ANAERO test 23 a API 50 CHL.

Ze získaných výsledků bylo dokázáno, že se *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* přirozeně vyskytuje v GIT psů.

Klíčová slova: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, izolace, identifikace, fekální vzorky

Summary

The objective of this work was to isolate *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* from samples of animal faeces. Ten samples of both calves and lambs faeces and 20 dog's were used.

Modified Wilkins-Chalgren agar with addition of mupirocin was used for the isolation of bifidobacterial. Grown colonies were isolated into Wilkins-Chalgren broth.

Next step was the identification to the genus level. For the identification the test for the presence of fructose-6-phosphate phosphoketolase enzyme and generic specification PCR was used. Test for the detection of enzyme F6PPK was positive for all samples. For PCR method specifically designed Bifl64 and Bif662 primers were used. *Lactobacillus casei* was chosen as negative kontrol.

After identification to the genus *Bifidobacterium* spp., identification to the species level followed. For this part was chosen species-specific PCR. Two pairs of specific primers Bflac 2/Bflac5 and Lw A/Lw B were used. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* was used as a positive kontrol. Sixteen out of 40 strains tested were identified as a species *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. All 16 samples were isolated from dog's faeces samples.

MALDI-TOF MS method was used for verification of results of these 16 samples. Tested strains were divided into two groups. Samples no. 34 and no. 40 belonged to highly probable species identification and remaining samples belonged to category secure genus identification, probable species identification.

Fingerprinting Method such as REP-PCR and RAPD-PCR was used for further characterization of isolates. For REP-PCR, primer (GTG)₅ was chosen, primer 173 and primer CRA 23 were chosen for RAPD-PCR. These results were compared and on the basis of better division of samples was chosen primer 173 as the more suitable one. *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* as negative kontrol was used. For the both methods.

for commercial biochemical tests ANAERO test 23 and API 50 CHL were used for commercial biochemical tests.

It could be concluded that *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* naturally occurred in the GIT of dogs.

Keywords: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, isolation, identification, faeces

OBSAH

1. Úvod	8
2. Cíl Práce	9
3. Literární rešerše	10
3.1 Rod Bifidobacterium	10
3.2 Fyziologické vlastnosti bifidobakterií	10
3.3 Výskyt bifidobakterií	11
3.3.1 Výskyt u lidí	12
3.3.2 Výskyt u novorozenců	12
3.3.3 Výskyt u zvířat	12
3.4 Účinky bifidobakterií v GIT	14
3.5 Probiotika	14
3.6 Probiotický účinek	15
3.7 Probiotické potraviny	15
3.8 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	16
3.9 Izolace bifidobakterií	16
3.9.1 Wilkins-Chalgren agar	16
3.9.2 MRS agar	17
3.9.3 BLOG agar	17
3.9.4 TPYD agar	17
3.9.5 NPNL agar	17
3.9.6 TOS-MUP agar	18
3.10 Identifikace bifidobakterií	19
3.10.1 Biochemické testy	19
3.10.2 Komerční soupravy biochemických testů	20
3.10.3 Molekulárně–genetické metody identifikace bifidobakterií	20
3.10.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	20
3.10.3.2 Interrepetitivní polymerázová řetězová reakce (Rep PCR)	21
3.10.3.3 Randomly Amplified Polymorphic PCR (RAPD)	22
3.10.3.4 MALDI - TOF SM	23
3.10.4 Sekvence DNA	24
4. Materiál a metody	25

4. 1 Materiál	25
4. 2 Identifikace na úroveň rodu	26
4. 2. 1 Identifikace pomocí detekce enzymu fruktóza-6-fosfát-fosfoketoláza	26
4. 2. 2 Rodově specifická PCR – <i>Bifidobacterium</i> sp.	28
4. 3 Identifikace na druhovou úroveň	29
4. 4 Fingerprintové metody RADP PCR A Rep PCR	29
4. 5 Elektroforetická separace PCR produktů	31
4. 6 Identifikace pomocí MALDI – TOF MS	31
4. 7 Charakterizace a identifikace pomocí komerčních a biochemických souprav	32
4. 7. 1 ANAERO test	32
4. 7. 2 API test 50 CH	34
4. 8 Sekvence	34
5. Výsledky	36
5. 1 Identifikace izolátů na rodovou úroveň	36
5. 2 Identifikace na druhovou úroveň	37
5. 3 Fingerprintové metody	38
5. 4 Výsledky metody MALDI TOF SM	39
5. 5 Vyhodnocení výsledků ANAERO testu	40
5. 6 Výsledky API 50 CHL	41
5. 7 Výsledky sekvence	42
6. Diskuse	43
7. Závěr	46
8. Seznam literatury	47
9. Použité zkratky	51

1. Úvod

Bifidobakterie se vyskytují v organismu lidí i zvířat a to především v trávicím traktu. Díky svému pozitivnímu vlivu na zdravotní stav hostitele se používají jako probiotika. Poddruh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* byl prvně izolován z jogurtu a v současné době je jedním z nejvíce používaných probiotik přidávaných do mléčných výrobků. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* se také podařilo izolovat z fekálních vzorků prasat.

Tato práce byla zaměřená na izolaci *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* z fekálních vzorků telat, jehňat a psů. Izolace bifidobakterií byla provedena pomocí modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru, který byl obohacený o mupirocin. Identifikace na úroveň rodu byla provedena pomocí testu na detekci enzymu F6PPK a metody PCR s komerčně vyráběnými primery Bif164/Bif662. Druhová příslušnost byla potvrzena metodou PCR s primery speciálně navrženými pro *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bflac2/Bflac5 a Lw-A/Lw-B. Z výsledků metody vyplynulo, že 16 vzorků získaných od psů má shodnou reakci se sbírkovým kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. U všech 16 vzorků byla použita chemotaxonomická metoda MALDI-TOF MS. Z typizačních metod byly použity REP-PCR a RAPD-PCR. U metody REP-PCR byl použit primer (GTG)₅, u metody RAPD-PCR primer 173 a CRA 23. U obou metod byl použit jako negativní kontrola kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a jako pozitivní kontrola kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Pro konečnou identifikaci byla použita metoda sekvenace, která potvrdila výsledky předešlých metod identifikace.

2. Cíl práce

Cílem této práce byla izolace a identifikace *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ze vzorků fekálií získaných od několika druhů domácích zvířat. Konkrétně se jednalo o fekálie psů, telat a jehňat. Identifikace probíhala pomocí biochemických testů API 50 CHL, ANAERO test 23 a F6PPK a molekulárně – genetických metod PCR, REP-PCR, RAPD-PCR a MALDI–TOF MS. Po identifikaci byly kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, které se vyizolovali z fekálií, porovnány s bifidobakteriemi běžně se vyskytujícími v kysaných mléčných produktech.

Hypotéza

V kysaných mléčných výrobcích se nejčastěji používají jako probiotikum kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Toto využití si bifidobakterie získaly díky tomu, že jsou odolné vůči podmínkám, které jsou na ně při tomto využití kladeny. Ve výrobcích jsou schopné vydržet až jeden měsíc, aniž by ztratily své probiotické vlastnosti. Původ kmene *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* není doposud přesně známý. Všechny izolované a doposud poznané kmeny bifidobakterií mají výskyt v trávicím traktu lidí a zvířat. Protože *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* není běžně izolován ze stolice lidí bude pravděpodobně autochtonním druhem ve střevě některého jiného živočišného druhu.

3. Literární rešerže

3.1 Rod *Bifidobacterium*

V roce 1899 Henry Tissier poprvé izoloval bifidobakterie ve výkalech kojenců. Následně byly izolované i z mateřského mléka. Pro označení tohoto nového druhu byl použit termín *Bacillus bifidus*. V roce 1924 Orla –Jensen prvně navrhl, že by měl být *Bacillus bifidus* klasifikován jako samostatný rod *Bifidobacterium*. Tento rod by vytvářel spojení mezi bakteriemi mléčného kvašení a bakteriemi tvořícími kyselinu propionovou (Russell et. al., 2011).

3.2 Fyziologické vlastnosti bifidobakterií

Bifidobacterium jsou Gram-pozitivní pleomorfní tyčinky, které se vyskytují jednotlivě, v řetězcích nebo ve shlucích. Bakterie jsou nepohyblivé, nesporulující a netvoří vlákna. Jako zdroj energie využívají organické látky a řadí se mezi chemoorganotrofní organismy.

Z hlediska vztahu ke kyslíku vyžadují anaerobní prostředí. Výjimkou jsou některé kmeny, které tolerují kyslík, pokud je v prostředí přítomen oxid uhličitý (*Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium asteroides*) (Russell et. al., 2011).

Optimální teplota pro růst bifidobakterií vyskytujících se u lidí je 36-38 °C. U zvířat je teplota růstu vyšší mezi 41-43 °C. Jsou však výjimky, kdy rostou při nižších i vyšších teplotách. Hodnota pH pro růst se pohybuje v rozmezí 6,5-7,0. Kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *laciis* je schopný přežít i v lidské žaludečních šťávách, které mají pH okolo 3,5 (Cronin et. al., 2011)

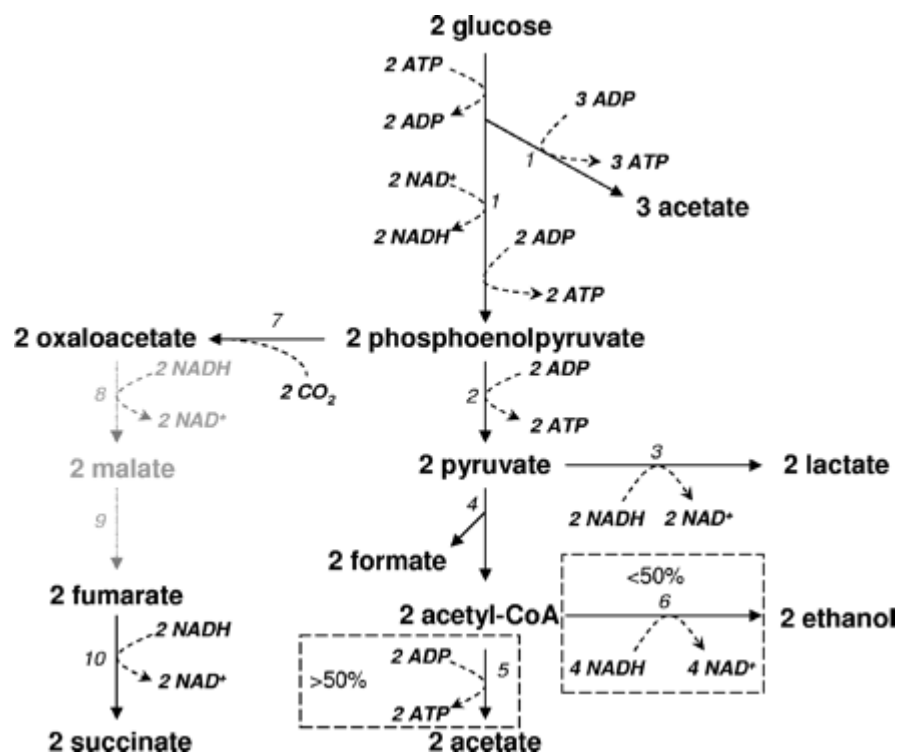
Bifidobakterie produkují kyselinu octovou a kyselinu mléčnou v teoretickém poměru 3:2. V malém množství vzniká kyselina mravenčí, ethanol, oxid uhličitý a kyselina jantarová. Všechny tyto látky se tvoří při metabolické přeměně sacharidů (Jalili et. al., 2009)

Bylo prokázáno, že jsou schopné fermentovat glukosu, galaktosu a fruktosu. Podle fyziologických údajů bylo zjištěno, že bifidobakterie umějí zpracovávat i další sacharidy jako jsou xylo- oligosacharidy, oligosacharidy, frukto-oligosacharidy, pektin a mucin. Fermentace dalších sacharidů a alkoholů je rozdílná podle druhu a kmene (Cronin et. al., 2011).

Pomocí genomové analýzy bylo objeveno, že kmeny bifidobakterií vytvářejí řadu vitamínu B. Konkrétně thiamin (B1), pyridoxin (B6) kyselinu listovou (B11) a niacin (B3),

některé kmeny také obsahují geny pro biosyntézu riboflavinu (B2). Produkce vitamínů bifidobakteriemi je hodnocena jako pozitivní probiotická vlastnost (Cronin et. al., 2011).

Obr. č.1 Schéma diagramu metabolismu cukrů bifidobakterií



3.3 Výskyt bifidobakterií

Bifidobakterie se vyskytují společně s dalšími obligátně anaerobními bakteriemi ve střevním traktu kojenců, dospívajících, dospělých lidí i zvířat. Společně s dalšími přirozeně se vyskytujícími mikroorganismy, zde vytváří přirozenou střevní mikroflóru (Russell et.al., 2011).

Přítomnost bifidobakterií byla potvrzena v odpadních vodách z anaerobních fermentorů a výrobních kalech. Přidávají se jako probiotika do mléčných kysaných výrobků. Je možné nalézt je v jogurtech a dalších mléčných výrobcích.

3. 3. 1 Výskyt u lidí

U člověka bylo izolováno celkem 42 druhů a 9 poddruhů bifidobakterií. Bifidobakterie jsou přítomné v celém gastrointestinálním traktu lidí. Nachází se v dutině ústní, žaludku, tenkém a tlustém střevu, rektu a přecházejí do stolice (Russell et. al., 2011).

V mateřském mléce jsou nejvíce obsažené *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve*. Kojené děti tak získávají bifidobakterie přímo z mateřského mléka a je možné prokázat jejich přítomnost v GIT (Russell et. al., 2011).

3. 3. 2 Výskyt u novorozenců

Výsledky mnoha studií ukázaly, že bifidobakterie se objevují ve výkalech dětí od prvních dnů po porodu. Výskyt bifidobakterií je závislý na způsobu stravování novorozence. U plně kojených dětí jsou dominantním mikroorganismem bifidobakterie. Ve srovnání s dětmi krmenými umělou výživou se společně s bifidobakteriemi ještě vyskytují bakterie rodu *Bacteroides* (Rosberg - Cody a kol., 2004).

Prostřednictvím mateřské mléko se bifidobakterie dostanou do GIT narozeného dítěte a začnou ho postupně kolonizovat. U novorozenců ve věku tří měsíců tvoří nejpočetnější skupinu bakterií, která se vyskytuje v trávicím traktu.

U dětí, které jsou krmené mateřským mlékem, tvoří bifidobakterie až 90 % fekální mikroflóry. Kdežto u dětí krmených umělou dětskou stravou tvoří bifidobakterie 50 % mikroflóry (Mayo a van Sinderen, 2010)

3. 3. 3 Výskyt u zvířat

U zvířat se vyskytují podobně jako u lidí v gastrointestinálním traktu, výkalech a mléce. Příklady bifidobakterií izolovaných ze zvířat: *B. animalis* subsp. *animalis* a *lactis*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. crudilactis*, *B. psychraerophilum*, *B. stercoris*, *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* (Russell et. al., 2011). V tabulce č.1 jsou uvedené konkrétní místa výskytu vybraných druhů *Bifidobacterium* lidí a zvířat.

Tab. 1 Místa výskytu bifidobakterií, Breaviti et. al. (2000)

Druh	Místo výskytu	Odkaz
<i>B. adolescentis</i>	Lidská stolice , bachor skotu, výrobní kaly	Reuter (1963)
<i>B. angulatum</i>	Lidská stolice, výrobní kaly	Scardovi and Crociani (1974)
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Zvířecí výkaly	Scardovi and Crociani (1974)
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Jogurty, prasata	Meile et. al. (1997)
<i>B. asteroides</i>	Ve střevech včely medonosné	Scardovi and Crociani (1974)
<i>B. bifidum</i>	Lidská stolice, sající telata, ženská vagina	Orla-Jensen (1924)
<i>B. boum</i>	Bachor skotu, výkaly selete	Scardovi et.al. (1979)
<i>B. breve</i>	Stolice nemluvnat, sající telata, ženská vagina, výrobní kaly	Reuter (1963)
<i>B. catenulatum</i>	Stolice nemluvnat, výrobní kaly, stolice dospělého člověka	Scardovi and Crociani (1974)
<i>B. crudilactis</i>	Syrové mléko, sýry ze syrového mléka	Delcenserie et. al. (2007)
<i>B. dentinum</i>	U lidí v dutině ústní, zubním kazu, lidská stolice	Scardovi and Crociani (1974)
<i>B. gallicum</i>	Lidská stolice	Lauer (1990)
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Lidská stolice	Reuter (1963)
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Stolice nemluvnat	Reuter (1963)
<i>B. minium</i>	Výrobní kaly	Biavati et. al. (1982)
<i>B. psychraerophilum</i>	Bachor skotu, výkaly telat, krys, králíků, výrobních kalech	Simpson et. al. (2004)
<i>B.ruminantium</i>	Výkaly kuřat	Biavati and Mattarelli (1991)
<i>B. scardovii</i>	Výkaly králíků	Hoyles et.al. (2002)
<i>B. stercoris</i>	Lidská krev	Kim et.al. (2010)
<i>B.subtile</i>	Lidská stolice	Biavati et. al. (1982)

3. 4 Účinky bifidobakterií v GIT

U dospělého člověka tvoří bifidobakterie průměrně 3 % mikroflóry. Přítomnost těchto organismů má vliv na správnou funkci a děje probíhající v GIT (Cronin et. al., 2011).

Mají schopnost vyvažovat střevní mikroflóru a udržovat nebo obnovovat rovnováhu v zaživacím traktu. Zmírňují obtíže, které mohou být způsobené změnou složení střevní mikroflóry v důsledku léčby antibiotiky, chirurgických zákroků, infekčního onemocnění trávicího traktu, onemocnění jater a ledvin, při stresu, stárnutí a poruchách imunity.

Působí preventivně proti střevním infekcím, redukuje hladinu cholesterolu v séru, zabraňují rozvoji rakoviny, zmírňují problémy laktóзовé intolerance (Savard et. al., 2011).

Ne všechny druhy z rodu *Bifidobacterium* jsou pro hostitele prospěšné. Například *Bifidobacterium dentium* (Bd1) způsobuje demineralizaci zubů, která může vést až k tvorbě zubního kazu (Cronin et. al., 2011).

3. 5 Probiotika

Probiotika jsou definované jako živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány v dostatečném množství napomáhají k lepšímu zdravotnímu stavu hostitele. Bývají to bakterie, které se vyskytují jako přirozená kultura v zaživacím traktu člověka (Rada, 2011).

Hlavními mikroorganismy používanými jako probiotika jsou zástupci rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. V potravinách by měl být počet živých buněk minimálně kolem 10^6 probiotických bakterií v 1 g nebo 1 ml (Bartošová, 2009).

Bakterie musí splňovat následující kritéria: (Bartošová, 2009)

1. musí být zdravotně nezávadné
2. nesmí být patogenní
3. musí být schopné přežít průchod zaživacím traktem(kyselé prostředí žaludku) aniž byly oslabeny
4. schopnost udržet se na epitelových buňkách střeva a pomnožit se v něm
5. jejich pozitivní působení na hostitele musí být průkazné
6. během zpracování by měly být odolné vůči poškozené a neměnit organoleptické vlastnosti potraviny, ve které jsou obsaženy
7. zůstat životaschopné během celé uvedené doby trvanlivost

3. 6 Probiotický účinek

Účinek probiotik je závislý na stáří konzumenta a na jeho fyziologickém stavu. Při pravidelné konzumaci potravin, které obsahují probiotické mikroorganismy se snižují problémy při vyprazdňování jako jsou zácpa a průjem (Rada, 2011).

Pozitivně působí na celý zažívací systém hostitele a podílí se na jeho správném chodu. Jsou schopné zmírňovat problémy při onemocněních GIT a působit preventivně proti vzniku nemocem spojených s trávicím ústrojím (Bartošová, 2009).

Denně by se mělo zkonsumovat alespoň 100 g mléčného výrobku s minimálním obsahem 10^6 probiotických bakterií v 1 g nebo 1 ml (tzv. terapeutické minimum). Během dlouhotrvajícího užívání probiotik ve formě mléčných výrobků nebo farmaceutických preparátů je možné podávané bifidobakterie prokázat ve stolici. Pokud dojde k přerušení příjmu tyto bifidobakterie postupně ze stolice vymizí. Je tedy důležité, přijít na způsob, jak bifidobakterie udržet v trávicím traktu co nejdéle (Mayo a van Sinderen).

3. 7 Probiotické potraviny

Mezi potraviny obsahující největší množství probiotických bakterií patří fermentované mléčné výrobky. Pro jednotlivé skupiny kysaných mléčných výrobků je množství bakterií použité mikrobiální kultury stanoveno vyhláškou ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb.

Dříve se využívalo přirozeného kysání mléka působením přítomných mikroorganismů. V dnešní době už se používají čisté mlékárenské kultury, ale ne všechny lze označit jako probiotika. Probiotické potraviny obsahují výhradně bakterie mléčného kvašení především rod *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. V roce 1995 byl na trh uveden první probiotický jogurt s názvem LC1. Uvedla ho tehdy firma Nestlé.

Probiotické kultury se pokoušíme přidávat i do další skupiny potravinářských výrobků jako jsou cereálie, masné výrobky, nápoje a kvašené výrobky, ale fermentované mléčné výrobky mají stále dominantní roli (Bartošová, 2009).

3. 8 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Poprvé byl poddruh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* izolován z jogurtu. V současné době je jedním z nečastěji používaných probiotik, které se přidávají do mléčných výrobků. V těchto produktech je schopný přežít v životaschopné formě až jeden měsíc a udržovat stabilitu výroků (Freeman and Roberts, 2009).

Jedním z rozdílů, které vedly k rozdělení *Bifidobacterium animalis* na podruhy *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* byla špatná schopnost růstu *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* v mléce. V této vlastnosti se od sebe oba podruhy zásadně lišily.

Dnes je *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* komerčně vyráběn několika společnostmi. Ch. Hansen (Dánsko) vyrábí tento kmen s označením BB-12. Používá se již od roku 1985, kdy začal být přidáván jako probiotická složka do potravin nebo jako doplněk stravy. Během užívání zatím nebyl zjištěn žádný nežádoucí účinek. BB-12 byl uznán FDA (Food and Drug Administration) za bezpečný.

Největší čínská mlékárenská společnost Yili Industrial Group Company používá *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* označený V9 v průmyslové výrobě mléčných startovacích kultur (Sun et al., 2010).

3. 9 Izolace bifidobakterií

Pro izolaci bifidobakterií z lidských, zvířecích i potravinářských zdrojů bylo vyvinuto několik účinných medií, které se využívají k izolaci bifidobakterií a dalších anaerobních bakterií.

Při izolaci anaerobních bakterií je důležité vytvořit vhodné prostředí pro růst s ohledem na vztah ke kyslíku, zvolit vhodnou inkubační dobu a teplotu. Velmi důležitý je výběr vhodného kultivačního média, které bude vyhovovat výživovým požadavkům izolovaných mikroorganismů. Vývoj medií stále pokračuje se snahou zdokonalit a přizpůsobit jeho vlastnosti pro snazší kultivaci izolovaných bakterií. V následující části je uvedeno několik z příkladů z možných medií.

3. 9. 1 Wilkins-Chalgren agar

Wilkins-Chalgren agar je používán pro kultivaci anaerobních mikroorganismů. Pomáhá stanovit minimální inhibiční koncentraci antibiotik u anaerobních bakterií. Oproti jiným mediím se liší tím, že neobsahuje krev (Wilkins and Chalgren, 1976). Často se používá

v různých modifikovaných formách. Pro izolaci bifidobakterií byl vytvořený modifikovaný Wilkins-Chalgren agar (WSPmup), který byl obohacen o sojový pepton, L-cystein, tween 80, mupirocin a ledovou kyselinu octovou podle Rada a Petr (2000).

3. 9. 2 MRS agar

MRS agar byl vyvinut v roce 1960 a pojmenován podle vynálezců de Man, Rogosa a Sharp. Tento agar se používá pro bakterie mléčného kvašení a mikroorganismy, které jsou používány jako probiotická kultura do mléčných výrobků.

Selektivitu agaru lze zvýšit přidáním některých látek jako je cykloheximid, který brání růstu kvasinek nebo kyselinou sorbovou, která brání růstu kvasinek tím, že snižuje hodnotu pH media na 6,2 – 5,7.

Pro zvýšení selektivity pro izolaci bifidobakterií se využívají inhibitory v kombinaci s dalšími sloučeninami, které potlačují růst ostatních bakterií (Ashraf and Shah, 2011).

3. 9. 3 BLOG agar

Jedná se o selektivní medium pro izolaci bifidobakterií obsažených v kysaných mléčných výrobcích. Má stejný základ jako NPML, ale příprava je mnohem rychlejší než je tomu u NPML. Jeho složení je přizpůsobeno k podpoře růstu bifidobakterií. Přidaný gentamicin je selektivní pro bifidobakterie a hovězí žluč (2mg/l) potlačuje růst ostatních bakterií. Oproti NPML agaru má BLOG větší inhibiční účinek i na streptokoky (Lim et al., 1995).

3. 9. 4 TPYD agar

TPYD agar využívá antibiotikum dicloxacillin k izolaci a identifikaci bifidobakterií obsažených v kysaném mléce. Přídavek 2 µg/ml dicloxacillinu do TPY media inhibuje růst laktobacilů a streptokoků a zároveň velmi dobře podporuje růst většiny bifidobakterií. Pro izolaci bifidobakterií z mléčných produktů byl TPYD agar zvolen za více vhodný než DMRS agar (Ashraf and Shah, 2011).

3. 9. 5 NPML agar

NPML agar byl vyroben Teraguchi et.al. v roce (1978) pro stanovení bifidobakterií v mléčných produktech obsahujících směs bifidobakterií, laktobacilů a streptokoků. Medium obsahuje BL-agar a přídavek neomycin-sulfát, paromomycin sulfát, nalidixiovou kyselinu a lithium chlorid. Bifidobakterie na tomto agaru dobře rostou a z tohoto důvodu je používán

jako referenční medium pro izolaci bifidobakterií z kysaných mléčných výrobků. NPNL agar byl použit i při vývoji nových medií jako jsou TOS-NPNL agar, RMS-PPNL agar, MRS-NPNL agar (Ashraf and Shah, 2011).

3. 9. 6 TOS-MUP agar

TOS agar se používá pro izolaci bifidobakterií z mléčných výrobků a přímý průkaz přítomnosti životaschopných bifidobakterií ve startovacích kulturách. Díky svému složení je vysoce selektivní a specificky podporuje růst bifidobakterií. Složení média je uvedeno v tabulce č. 2. Rada a Koc (2000) ve své studii testovali citlivost bifidobakterií, laktobacilů, laktokoků a streptokoků na mupirocin. Z výsledků jasně vyplynulo, že kromě bifidobakterií jsou na mupirocin ostatní testované kmeny citlivé. Na základě tohoto objevu se k TOS agaru začal přidávat mupiricin. Tato kombinace napomohla vzniku vysoce spolehlivého a specifického média pro izolaci a identifikaci bifidobakterií obsažených v mléčných produktech.

Příprava média

Bezprostředně před použitím se rozpustí 190 ml základního TOS media, které se poté zchladí ve vodní lázni na teplotu $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. K připravenému médiu přidáme 10 ml přefiltrovaného a sterilovaného roztoku s mupirocinem. Opatrně promícháme, aby nedošlo k tvorbě bublin. Vratíme zpět do vodní lázně, dokud se nepoužije k rozlití na kultivační polty.

Roztok s mupirocinem se k TOS mediu přidává těsně před rozlitím. Kompletní TOS-MUP medium musí mít konečnou koncentraci mupirocinu 50 mg/l.

Složení a postup přípravy média je ve shodě s normou ISO 29981 / IDF 220:2010.

Tab. č. 2 Složení TOS média

Složky	Množství
Pepton z kaseinu	10,0 g
Kvasničný autolyzát	1,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
K ₂ HPO ₄	4,8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
R-cystein HCl · H ₂ O	0,5 g
Propionát sodný	15,0 g
Galaktooligosacharid TOS	10,0 g
Agar	15,0 g
Voda	950 ml

3. 10 Identifikace bifidobakterií

3. 10. 1 Biochemické testy

Mezi biochemické testy používané pro stanovení bifidobakterií v potravinářských a klinických materiálech patří především test na detekci F6PPK.

Dále pak například komerční soupravy testů jako ANAERO test 23 a API 50 CHL test. Pomocí těchto testů můžeme prokázat přítomnost bakterií ve zkoumaném vzorku na základě jejich biochemických vlastností.

Test na detekci enzymu Fruktóza 6-fosfát-fosfoketolasa (F6PPK)

Fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza (E.C. 4.1.2.22) katalyzuje štěpení fruktoso-6-fosfátu na acetyl-fosfát a erytroso-4-fosfát. Z prvně jmenovaného meziprojektu vzniká jako konečný produkt kyselina mléčná a z druhého kyselina octová v teoretickém molárním poměru 2:3 (Roy, 2001).

Modifikovaná metoda F6PPK testu s přidavkem citridium bromidu (CTAB) se ukázala jako nejméně náročná, ale i přesto velmi spolehlivá (Vlková a kol., 2002).

Pokud je F6PPK ve vzorku přítomen, dojde k barevné změně roztoku, která je způsobena reakcí acetyl-1-fosfátu s FeCl_3 za vzniku fialového zbarvení. Pokud je test na přítomnost F6PPK negativní, roztok se zbarví dožluta (Scardovi, 1986).

3. 10. 2 Komerční soupravy biochemických testů

Pro rutinní identifikaci anaerobních bakterií z potravin nebo klinického materiálu se používá ANAERO test 23.

ANAERO test 23 napomáhá k zařazení bakterie do příslušného kmene pomocí biochemických testů. Testy jsou obsaženy v jamkách mikrotitrační destičky a reagují se suspenzním médiem za vzniku barevné reakce. Po inkubaci se výsledky reakce hodnotí podle barevné srovnávací stupnice.

API 50 CHL je systém 50 biochemických testů sloužící k identifikaci mikroorganismů na základě fermentace sacharidů. Test obsahuje kity s komůrkami, ve kterých jsou obsažena dehydratovaná diagnostická média spolu se substráty. Během inkubace (37 °C, 48 hod) se fermentace substrátu projeví jako změna barvy obsahu v komůrce. První komůrka neobsahuje žádný substrát a slouží nám jako kontrola. Vyhodnocení se provádí pomocí stupnice 0 – 3 a výsledky se zapisují do speciálních formulářů.

3. 10. 3 Molekulárně–genetické metody identifikace bifidobakterií

V současné době jsou genotypové metody hojně využívány pro mikrobiální identifikaci a klasifikaci. Každá z těchto metod umožňuje přesnější zařazení zkoumaného mikroorganismu na druhovou, poddruhovou a rodovou úroveň.

Metody založené na identifikaci DNA jsou považované za spolehlivější než jednodušší a levnější způsoby stanovení mikroorganismů.

3. 10. 3. 1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR byla vyvinuta v roce 1983 a Kary Mullis za její objev dostal Nobelovu cenu. Polymerázová řetězová reakce cyklicky amplifikuje definované sekvence DNA v podmínkách *in vitro*. Tato metoda umožňuje rychlé a vysoce selektivní namnožení konkrétní nukleotidové sekvence obsažené v testované DNA.

PCR metoda se skládá ze tří kroků, které vytvářejí jeden opakující se cyklus, při kterém dochází k exponenciálnímu nárůstu amplifikované DNA. Jednotlivé kroky denaturace, hybridizace a elongace se od sebe odlišují teplotou a časem působení na DNA. Při denaturaci se DNA ohřívá na teplotu v rozmezí 94 – 98 °C po dobu 20-30 sec. a dochází k uvolnění vláken dvoušroubovice DNA. Hybridizace probíhá při teplotě 50 – 65 °C a dochází k přiléhání primerů na templář. Při elongaci dochází k syntéze vlákna DNA ve směru od 5'OH ke konci 3'OH. Optimální teplota procesu je 72 °C (McPherson a Miller, 2006).

Důležitý enzym DNA polymerasa označovaná také jako Taq polymerasa, která se získává z bakterie *Thermus aquaticus*, se používá k syntéze nového vlákna DNA. Taq polymeráza je odolná vůči vysokým teplotám a může být aktivní i po dobu mnoha cyklů. Namožení bakteriální DNA bifidobakterií je možné provádět přímo z testovaných vzorků mléčných výrobků nebo výkalů. Kultivace bifidobakterií tak není potřebná. Vysoká specifčnost této metody je závislá na správné volbě primerů a vhodné teplotě (Ward a Roy, 2005).

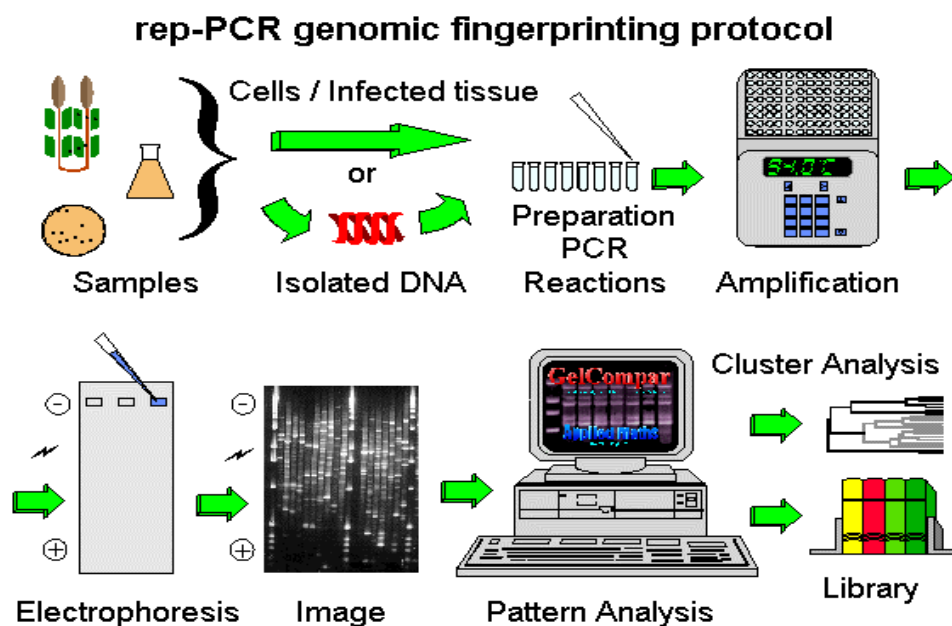
3. 10. 3. 2 Interrepetitivní polymerázová řetězová reakce (Rep PCR)

Rep-PCR je metoda, která je založena na zisku fingerprintů genomové DNA. Primery, které se u této metody PCR používají, jsou komplementární s repetitivními sekvencemi uvnitř genomu. Opakující se sekvence DNA jsou přítomné v několika kopiích v genomech většiny Gram - pozitivních i Gram – negativních bakteriích (Rademaker and Bruijn, 2001).

Byly popsány 3 repetitivní sekvence zahrnující 35-40 bp repetitive extragenic palindromic (REP) sekvence, 124-127 bp enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sekvence a 154 bp BOX element. Tyto sekvence jsou rozmístěny v rozdílných pozicích kolem genomu. Opakující se části mohou být přítomné v obou směrech. Použití těchto primerů ve spojení s PCR vede k selektivní amplifikaci různých oblastí kolem genomu, které se nacházejí mezi REP, ERIC nebo BOX (Versalovic et al. 1994).

V dokumentech a protokolech jsou rep-PCR, ERIC-PCR a BOX-PCR genomové fingerprinty zahrnuté pod označení REP-PCR. Výsledné zobrazení fingerprintů je podobné čárovým kódům, používaných v obchodech.

Obr. 2. Postup metody REP-PCR ((Rademaker and Bruijn, 2001)



3. 10. 3. 3 Randomly Amplified Polymorphic PCR (RAPD)

RAPD nebo také polymorfismus náhodně amplifikované DNA je založen na principu amplifikací fragmentů DNA, kdy je použit pouze jeden oligonukleotidní primer.

Délka primerů je obvykle 10 bází. Sekvence bází jsou vybírané podle zastoupení jednotlivých bází. Produkty amplifikace jsou obvykle separovány pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Pro znázornění výsledku dělení se používá ethidium bromid. Obarvení probíhá pod UV světlem.

Tato metoda se dá použít při detekci jednoho konkrétního kmene, který se testuje ve více různých vzorcích. Pro zařazení bakterií do příslušného druhu a rodu se zjišťuje velikost DNA fragmentů a počet DNA fragmentů (Ward a Roy, 2005).

Může se stát, že se na gelu objeví tzv. falešné pruhy, které zkreslují výsledky. Ke vzniku dochází při špatné délce primerů nebo v důsledku nízké teploty, při které primery nasedaly na DNA. (Riedy et al., 1992)

Ke statistickému vyhodnocení se používají různé analytické systémy jako je AMOVA (Analysis of molecular Variance) a jiné dostupné metody (Excoffier et al., 1992).

3. 10. 3. 4 MALDI - TOF MS

Základem hmotnostní spektrometrie je rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém nebo magnetickém poli.

Ke stanovení vyšších molekulových hmotností se používá ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight). Detektor umožňuje měřit dobu průletu a z ní následně vypočítat i rychlost částice (Havliš, 1999)

Postup

- Směs vzorku a matrice v pevném stavu a na vhodném nosiči (př. nerezová destička), je zasažena nanosekundovým pulzem laseru
- Matrice energii pulzu absorbuje a její rozklad ionizuje molekuly vzorku
- Touto ionizací se rozumí:
 1. adice kationtu (H^+ , Na^+) či aniontu na molekulu vzorku, disociace H^+ z molekuly vzorku
 2. vznik radikálu odštěpením elektronu, popřípadě cílené rozkouskování (vysokou energií laseru) molekuly vzorku a opět spojení kousků
- Ionty analyzované látky jsou urychleny silným elektrickým polem (25–30 kV) a přes uzemněnou mřížku vstupují do vakua v trubici detektoru letu, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem.
- V trubici detektoru se měří doba letu částice, z níž se pak vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částice

Metoda MALDI – TOF se může používat k analýze izolovaných bakteriálních proteinů, buněčné frakce nebo buněčné suspenze. Uplatňuje se při analýze bakteriální DNA a RNA, detekci rekombinantních proteinů, charakterizaci cílené nebo neznámé bakteriální bílkoviny a umožňuje nám rychlou identifikaci bakterií na rodovou, druhovou i kmenovou úroveň. Výsledky jsou prezentovány ve formě hmotnostních spekter, které se porovnávají se spektry zadanými v databázích. Databáze obsahují velké množství referenčních indikátorů získaných z opakovaných analýz. Po nalezení shody výsledků mezi testovaným kmenem mikroorganismů a kmenem v databázi, můžeme u vzorku určit o jaký druh z kmene se jedná (Havliš, 1999).

3. 10. 4 Sekvence DNA

Pomocí sekvenování DNA můžeme určit pořadí nukleotidů v jednom z řetězců DNA. Pro sekvenování byly vyvinuty dvě metody chemická podle Maxam-Gilberta a biochemická podle Sangerova. V současné době Sangerova metoda převládá.

Pro Sangerovu metodu je potřebná jednovláknová DNA, která slouží jako templát (vzor) pro syntézu komplementárního řetězce DNA. Pomocí enzymu polymerasa dochází k syntéze řetězce v určitých místech v závislosti na sekvenci templátového vlákna k terminaci syntézy. Tímto způsobem vznikají nekonečné úseky komplementárního vlákna. Pomocí elektroforézy v gelu je možné zjistit délku těchto úseků. K ukončení reakce dochází v okamžiku, když se v templátovém vlákně vyskytne určitý nukleotid. Délka nedokončeného úseku, která byla zjištěna pomocí elektroforézy v gelu, tak odpovídá vzdálenosti od začátku vlákna, ve v němž se vyskytl určitý nukleotid.

Průběh reakce je založen na přidávání nukleotidů ve směru 5' > 3' v novém komplementárním vlákně pomocí enzymu DNA-polymerasy. Kromě templátové jednovláknové DNA a enzymu jsou potřebné ještě nukleotidtrifosfáty, které slouží jako stavební kameny nového řetězce DNA.

Genomová sekvence byla použita Botaccini et al. (2011) u *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1, který je využíván v potravinářském průmyslu jako účinný látka přidávaná do funkčních potravin. Zároveň přispěla k objasnění fylogenetických vztahů mezi tímto kmene a ostatními používanými kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

4. Materiál a metody

Hlavním úkolem diplomové práce byla izolace a charakterizace bakterií *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ve fekálních vzorcích zvířat a posouzení shody izolovaného *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* s bifidobakteriemi se sbírkovými kmeny a bifidobakteriemi izolovanými z jogurtů.

4.1. Materiál

Pro izolaci bifidobakterií byly použity vzorky výkalů od různých druhů zvířat. Jednalo se o výkaly psů, telat, jehňat.

Dále byly v pokusu použity izoláty bifidobakterií z jogurtů, sbírkové kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10104 a *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* jako negativní kontrola.

Izolace

Vzorky výkalů byly získány z rekta zvířat a transportovány ve zkumavkách s Wilkins – Chalgren bujónem. Vzorky byly do laboratoře přepraveny během dvou hodin od odebrání. Pro izolaci bifidobakterií byl použit modifikovaný Wilkins- Chalgren agar (WSPmup), který byl doplněn o sójový pepton (5 g/l, Oxoid), L- cystein (0,5 g/l Sigma), tween 80 (1 ml/l, Sigma), mupirocin (100 mg/l, Merck) a ledovou kyselinu octovou (1ml/l) podle Rada a Petr (2000).

Kultivace probíhala za anaerobních podmínek v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Pro izolaci komerčních kmenů bifidobakterií z jogurtů byl použit totožný agar. Po této době byly narostlé kolonie izolovány z agaru do bujónu Wilkins – Chalgren (Oxoid). Složení bujónu je uvedeno v tab. č. 3..

Tab. č. 3 Složení Wilkins-Chalgren bujón

Složka	Hmostnost v g/l
Trypton	10,0
Želatinový pepton	10,0
Kvasničný autolyzát	5,0
Pyruvát sodný	1,0
Menadion	0,0005
Hemin	0,005

4. 2 Identifikace na úroveň rodu

Identifikace na rodovou úroveň je důležitá pro odlišení bifidobakterií od ostatních bakterií, které se běžně vyskytují v trávicím traktu lidí a zvířat. Pro jejich odlišení bylo použito dvou testů: F6PPK a rodově specifické PCR.

4. 2. 1 Identifikace pomocí detekce enzymu fruktóza-6-fosfát-fosfoketolasa (F6PPK)

Při tomto testu byla provedena detekce enzymu F6PPK, který se vyskytuje u bifidobakterií. Pokud dojde k pozitivní reakci, vzorek se zbarví do fialova v případě negativní reakce se vzorek zbarví do žluta.

Postup

1. Narostlá kultura bifidobakterií byla převedena do zkumavek
2. Obsah zkumavek byl stočen v centrifuze - 8 minut při 9 000 g při teplotě 20 °C
3. Dále byl slit supernatant a sediment resuspendován v připravených činidlech
 - 0,2 ml CTAB
 - 0,5 ml činidla č. 1
 - 0,125 ml činidla č. 2
 - 0,2 ml předem připraveného roztoku F6PPK
4. Vzorky byly dány na 30 min. do vodní lázni o teplotě 37 °C
5. 0,75 ml činidla č. 3 a nechalo se 10 min při pokojové teplotě
6. Postupně byly přidány činidla 4, 5 a 6, každý v objemu 0,5 ml
7. Vyhodnocení testu

Pozitivní reakce = fialové zbarvení

Negativní reakce = žluté zbarvení

Složení Činidel pro F6PPK test

Činidlo 1 - Bifi pufr - 0,36 g K^2HPO^4 ; 0,10 g KH^2PO^4 ; 0,15 g cysteinu, 300 ml destilované vody; pH 6,5

Činidlo 2 - 120 mg NaF; 200 mg Na-indoacetátu, 20 ml destilované vody

Činidlo 3 - 4,17 g hydroxylaminu; 30 ml destilované vody; pH upravit na 6,5 pomocí 2 ml 40 % NaOH

Činidlo 4 - 3 g TCA; 20 ml destilované vody

Činidlo 5 - 2,48 ml HCl; 17,52 ml destilované vody

Činidlo 6 - 1 g $FeCl^3$; 62 μ l koncentrované (35 %) HCl; 20 ml destilované vody

Činidlo 7 - 290 mg fruktoso-6-fosfátu; 5,5 ml destilované vody

Izolace DNA

Pro další molekulárně – genetické identifikace bylo potřeba získat jejich čistou DNA. Izolace DNA z jednotlivých izolátů byla provedena níže popsanou metodou.

Postup

1. Z čisté kultury narostlé ve Wilkins-Chalgren bujónu byl odebrán 1ml a přenesen do označené ependorfky
2. Následovalo stáčení v centrifuze po dobu 2 min. při 14 500 g
3. Supernatant byl slit a bylo přidáno se 100 μ l roztoku Prepman ultra (Applied Biosystéme, USA)
4. Po promíchání na vortexu byly vzorky umístěny do termobloku (Eppendorf) nastaveného na teplotu 99 °C po dobu 10 minut.
5. Poté bylo centrifugováno 3 min. při 14 500 g
6. Dále bylo odebráno 50 μ l supenatantu, který byl převeden do čisté ependorfky

Izolovaná DNA byla uchován při teplotě – 18 ° C a připravena pro identifikaci.

4. 2. 2 Rodově specifická PCR – *Bifidobacterium* sp.

Pro identifikaci izolovaných kmenů *Bifidobacterium* byla použita rodově specifická PCR pro *Bifidobacterium* sp.

Směs pro PCR je uvedena v tabulce č. 4, byla připravena z PCR mixu a PCR vody (Fermentas) a komerčně připravených primerů Bif164 a Bif662 (Metabios international AG). Sekvence je uvedena v tabulce č. 5. Směs pro PCR byla rozpipetována do předem označených ependorfeček po 24 μ l. K tomuto objemu bylo přidáno po 1 μ l izolované DNA. Přesné objemy jednotlivých složek byly vypočteny v poměru k množství testovaných vzorků.

PCR reakce probíhala v termocykleru podle nastaveného profilu pro uvedený primer, uvedeno v tabulka č. 6.

Tab. č. 4 Objemy složek pro 1 vzorek v PCR směsi

Složka	Objem μ l
PCR mix	12,5
PCR voda	10,5
Primer 1	1
Primer 2	1
DNA	1

Tab. č. 5 Sekvence primerů pro detekci bifidobakterií

Primer	Sekvence	Teplota	Produkty PCR
Bif164	5' GCACGGTTTCGGCCGTG - 3'	55 °C	567 bp
Bif662	5' GGGAAACCGTGTCTCAC - 3'		

Tab. č. 6 Teplotní profil PCR reakce pro primery Bif164 a Bif662

Proces	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95 °C	5 min.
Denaturace	94 °C	20 sec.
Hybridizace primerů	55 °C	20 sec.
Elongace	72 °C	30 sec.
Finální elongace	72 °C	5 min.

4. 3 Identifikace na druhovou úroveň

Pro druhově specifickou PCR byly použity primery Bflac 2 a Bflac 5 tabulka č.7. Složení směsi bylo totožné s rodově specifickou PCR. Teplotní profil byl odlišný tabulka č. 8.

Tab. č. 7 Sekvence primerů pro detekci bifidobakterií

Primer	Sekvence	Teplota	Produkty PCR
Bflac 2	5'-GTGGAGACACGGTTTCCC - 3'	58 °C	680 bp
Bflac 5	5'-CACACCACACAATCCAATAC - 3'		

Tab. č. 8 Teplotní profil PCR reakce pro primery Bif164 a Bif662

Proces	Teplota	Čas	
Počáteční denaturace	95 °C	5 min.	
Denaturace	95 °C	30 sec.	30 cyklů
Hybridizace primerů	58 °C	1 min.	
Elongace	72 °C	4 min.	
Finální elongace	72 °C	7 min.	

4. 4 Fingerpintové metody RADP-PCR A REP-PCR

Metody RADP a Rep PCR byly použity k přesnější charakterizaci v porovnání se sbírkovými kmeny. Směs pro Rep PCR obsahovala PCR mix a PCR vodu (Fermentas) a komerčně připravený primer (GTG)₅. Použité objemy složek jsou uvedeny v tab. č. 9.

Do označených ependorfků jsme nepipetovali 24 µl PCR směsi a 1 µl izolované DNA. Reakce probíhala v termocykleru nastaveném na vhodný teplotní profil použitého primeru. Stejný postup přípravy PCR mixu byl proveden i u metody RAPD. Rozdíl byl pouze v použitém primeru a nastavení teplotního profilu termocykleru. Rozdíly jsou uvedeny v tabulce č. 10 a tabulce č. 11.

Tab. č. 9 Objemy složek pro 1 vzorek v REP PCR směsi

Složka	Objem μ l
PCR mix	12,5
PCR voda	10,5
Primer	1
DNA	1

Tab. č. 10 Teplotní profil primerů pro REP A RAPD PCR

Metoda	REP - PCR	RAPD - PCR
Podmínky PCR		
Denaturace	7 min. 95 °C	5 min. 95 °C
Počet cyklů	45	45
Denaturace	3 min 90 °C	1 min 95 °C
Annealing	1 min 40 °C	1 min 36 °C
Elongace	8 min. 65 °C	2 min. 72 °C
Konečná elongace	16 min 65 °C	8 min 72 °C

Tab. č.11 Primery pro REP a RAPD PCR

Primer	Sekvence primeru	Metoda
(GTG) ₅	5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'	REP
173	5' CAGGCGGCCGT 3'	RAPD
CRA 23	5' GCGATCCCCA 3'	RAPD

4. 5 Elektroforetická separace PCR produktů

Separace PCR produktů byla prováděna na elektroforéze OWL Easycast. Směs pro přípravu gelu se skládala z 0,75x koncentrovaného TAE pufru a agaróze (SERVA). Do gelu bylo přidáno 5 µl Gel Red Nucleic Acid (Biotium), který sloužil k vizualizaci PCR produktů namísto etidium bromidu. Po separaci PCR produktů byl gel umístěn do dokumentačního zařízení BIO-RAD, kdy byl gel vyfotografován systémem Quantity One.

Pro separaci PCR produktů byl připraven 1% gel a separace probíhala pod napětím 80 V po dobu 50 min. a pro separaci produktů REP-PCR a RAPD-PCR byl připraven gel o vyšší koncentraci 1,5 % , napětí bylo stejné 80 V a čas 1 hod. 50 min.

4. 6 Identifikace pomocí MALDI – TOF MS

U vzorků, které měly pozitivní reakci s rodovými primery, byla provedena identifikace na druhovou úroveň pomocí metody MALDI- TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight)

Postup

Z narostlé bakteriální kultury v bujónu byly odebrány 2 ml do sterilních 2 ml ependorfek . Obsah byl stočen po dobu 3 min. při 14 500 g. Supernatant byl odebrán a vzorek resuspendován v 1 ml Bifi pufru a opět stočen v centrifuze. Znovu byl odstraněn supernatant a vzorek resuspendován v připraveném 60 % etanolu. Takto byl vzorek transportován k analýze MALDI – TOF MS, která byla provedena na Ústavu fyziologie živočichov SAV, Košice, profesorem V. Kmetěm.

4. 7 Charakterizace a identifikace pomocí komerčních a biochemických souprav

U testovaných vzorků byla provedena charakterizace a identifikace pomocí komerčních souprav testů ANAERO test 23 (Erba Lachema) a API 50 CH test (Biomérieux).

4. 7. 1 ANAERO test 23

Postup

1. Do ependorfky byl odpipetováno po 2 ml čisté kultury
2. Odstředěno 3 min. při 14 500 ot./min.
3. Slit supernatant
4. Vzorek byl poté opláchnut 0,5 ml Bifi pufrem a následně nesuspendován
5. Znovu odstředěno 3 min. při 14 500 ot./min.
6. Následovalo slítí supernatantu
7. Opláchnuto 0,5 ml pufru a v 1ml pufru rozpuštěno
8. Do suspenzního média, které bylo součástí soupravy, bylo přidáváno takovém množství vzorku, dokud nebyl vytvořen zákal, který odpovídal 3. stupni Mc Farlandovy stupnice.
9. Suspenze byla aplikována do jamek v destičce, v takovém množství, aby nedošlo k vyschnutí a případnému zkreslování výsledků.
10. Do jamky na test indolu bylo přidáno po dvou kapkách parafinového oleje.

Tab. č. 12 Složení Bifi pufru

Složka	Hmotnost
K ₂ HPO ₄	0,36 g
KH ₂ PO ₄	0,10 g
cystein	0,15 g
H ₂ O	300 ml
pH	7,1 ± 0,2

Inkubace

Destička byla dána do inkubačního polyethylenového sáčku. Inkubace probíhala po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C za anaerobních podmínek. Pro vytvoření anaerobních podmínek byl použit paladinový katalyzátor.

Vyhodnocení

Po 48 hod. bylo provedeno odečtení výsledků reakcí. Do 1. řady jamky H (test indol) bylo kápnuto činidlo pro IND – 2 kapky a do 2. řady jamky H (test nitráty) 1 kapka činidla pro NIT. Pak už byly odečteny barevné reakce testů a výsledky byly zaznamenány ve formě + a – do formuláře přiloženého u testu.

Obrázek č. 3 Výsledky barevných reakcí ANAERO testu 23

1 stanovení obsahuje 23 testů:

1		H IND	G GLU	F MLT	E FRU	D GAL	C LAC	B MLZ	A URE
	⊕	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	●
	⊖	●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●
2		H NIT	G SUC	F SAL	E TRE	D MAN	C RHA	B NAG	A bGL
	⊕	●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	●	●
	⊖	● ○	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	○	○
3		H ESL	G MNS	F RAF	E CEL	D XYL	C ARA	B SOR	A CON
	⊕	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	
	⊖	○	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	

4. 7. 2 API test 50 CHL

Postup

1. Testovaný vzorek byl asepticky převeden do zkumavky pro centrifugu a stáčeli jsme po dobu 3 min. při 9 000 g.
2. Supernatant byl slit a sediment jsme omyli 0,5 ml Bifi Pufru, poté byl odlit a v dalším 0,5 ml Bifi pufru byl sediment důkladně promíchán a znovu stočen
3. Vzorek byl slit a omyt přibližně 0,3 ml Bifi Pufru opět slit a nakonec nesuspendován v 0,7 ml Bifi Pufru.
4. Vzorek byl postupně přidáván k suspenznímu médiu, které je součástí soupravy, až do vytvoření 2 zákalového stupně Mc Farlandovy stupnice
5. Do suspenzního média API 50 CHL Médium (BioMerieux) bylo přidáno dvojnásobné množství vzorku než do předchozího média a následovala aplikace do jednotlivých jamek v kitu.
6. Po naplnění všech jamek byl kit umístěn do anaerostatu a kultivován za anaerobních podmínek po dobu 48 hod. při teplotě 37 °C.

Tab. č. 13 Složení API 50 CHL Médium

Název složky	Množství
Pepton	10 g
Kvasničný autolyzát	5 g
Tween 80	1 ml
Hydrogenfosforečnan draselný	2 g
Octan sodný	5 g
Diamonium citrát	2 g
Síran hořečnatý	0,20 g
Síran manganatý	0,05 g
Bromkrezolová červeň	0,17 g
Demineralizovaná voda	100 ml
pH	6,7 – 7,1

Vyhodnocení

Odečítání výsledků se provádělo nejprve po 24 hod. a následně po 48 hod. Pro zápis výsledků byl použit speciální formulář, který byl součástí soupravy.

Pozitivním výsledkem bylo žluté zbarvení, obsahu jamky v negativním případě byl obsah fialový. K hodnocení se používá stupnice 0-3.

Výsledné zbarvení:

0 – negativní reakce – fialové zbarvení

1 – negativní reakce – zelenofialové zbarvení

2 – pozitivní reakce – zelenožluté zbarvení

3 - pozitivní reakce – žluté zbarvení

Pro vyhodnocení výsledků je možné použít programy www.bacter.wisc.edu nebo apiweb.biomerieux.com.

4. 8 Sekvence

Vybrané vzorky izolátů byly poslány k sekvenci, která byla provedena ve Středisku sekvenování DNA Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i..

5. Výsledky

5.1 Identifikace izolátů na rodovou úroveň

Pro tuto práci bylo použito celkem 40 izolátů bifidobakterií. Konkrétně se jednalo o 10 vzorků z telecích výkalů, 10 vzorků z jehněčích výkalů a 20 výkalů psů.

Bifidobakterie izolované ze vzorků výkalů byly identifikovány na rodovou úroveň pomocí testu na přítomnost enzymu F6PPK. Všechny použité izoláty vykazovaly pozitivní reakci na detekci enzymu. Tato skutečnost byla potvrzena pomocí rodově specifické PCR, ve které byly použity primery Bif164 a Bif662. Platnost metody PCR byla ověřena použitím čisté DNA *Lactobacillus casei* jako negativní kontroly.

5.2 Identifikace na druhovou úroveň

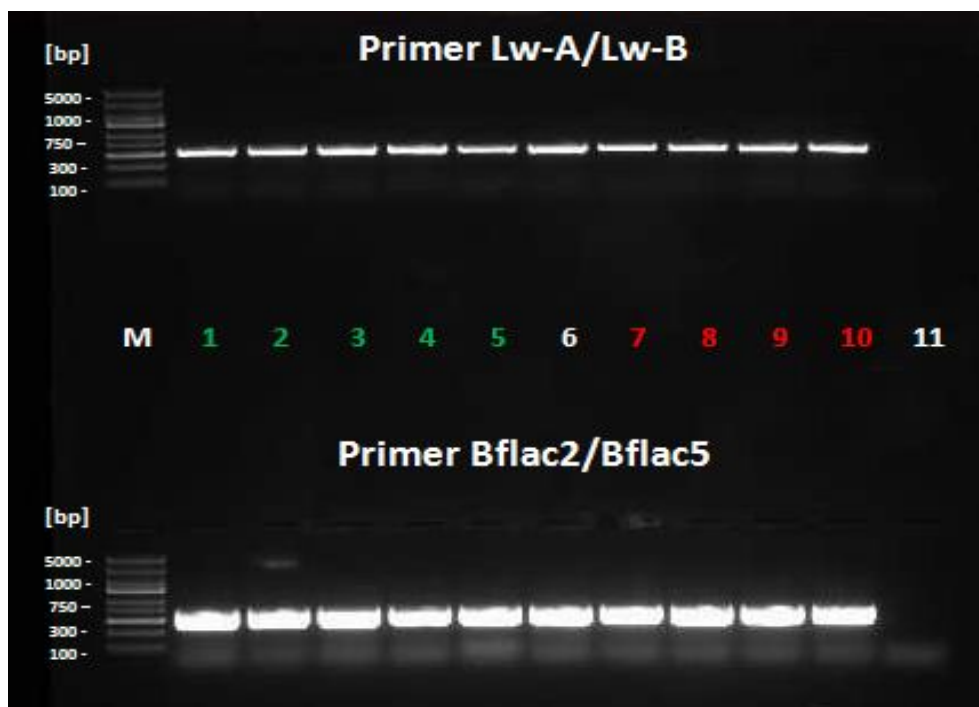
Vzorky identifikované na rodovou úroveň jako *Bifidobacterium sp.* byly dále identifikovány pomocí druhově specifické PCR s použitím dvojice primerů Bflac2/Bflac5 a Lw-A/Lw-B specifických pro *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Specifita primerů byla potvrzena použitím kontrolní kmene *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*.

Pozitivní reakce byla zaznamenána pouze u vzorků izolovaných ze psích výkalů. Konkrétně došlo k reakci u 16 vzorků z 20. Výsledky jsou uvedené v tabulce č. 14.

Tab. č. 14. Výsledky rodové a druhové identifikace

Vzorek	Původ izolátů	Rodová identifikace		Druhová identifikace metodou PCR	
		F6PPK	Rodová PCR	Primer Bflac2/ Bflac5	Primer Lw-A/Lw-B
1 - 10	jehňata	+	+	+	+
11 - 20	telata	+	+	+	+
21 - 40	psi	+	+	16 vz + /4 vz -	16 vz + /4 vz -
J1 – J4	jogurt	+	+	+	+
<i>Lac. casei</i>	Sb. kmen	-	-	-	-
<i>Bif. a. animalis</i>	Sb. kmen	+	+	-	-
<i>Bif. a. lactis</i>	Sb. kmen	+	+	+	+

Obr. č. 4 Výsledky druhové PCR s primery Bflac2/Bflac5 a Lw-A/Lw-B



5. 3 Fingerprintové metody

Kmeny s pozitivní reakcí se specifickými primery pro *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* byly dále charakterizovány metodami REP-PCR a RAPD-PCR. Pro metodu REP-PCR byl použit primer (GTG)₅. Pro potvrzení shody byl použit sbírkový kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (DSM 10104). K porovnání a kontrole výsledků metody byl použit sbírkový kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* (CCM 4988). U výsledků bylo zřejmé rozlišení mezi testovanými vzorky a použitým kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, který vykazoval odlišný profil. Izoláty ze psích výkalů si byly vzájemně podobné. Použité izoláty jsou uvedeny v tabulce č. 16 a výsledek REP-PCR na obrázku č. 4.

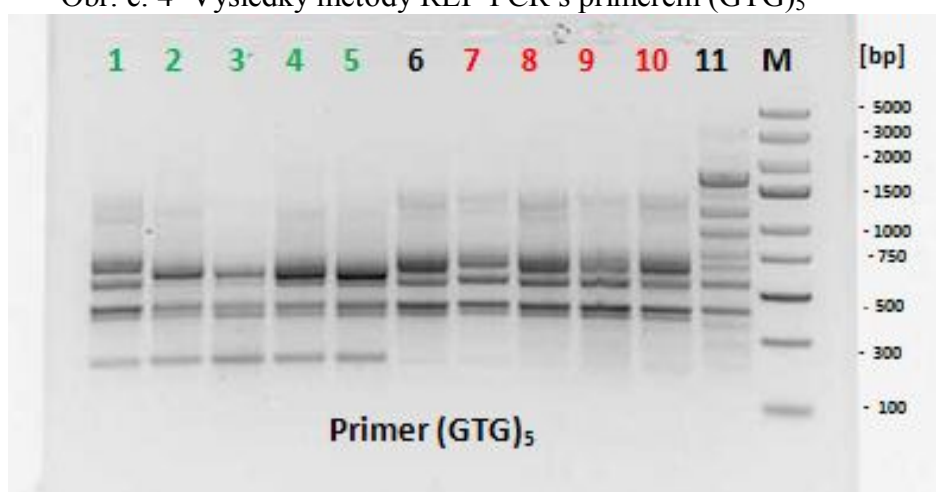
U metody RAPD-PCR byly použity dva primery: primer 173 a CRA 23. V obou případech byly použity ke srovnání a kontrole stejné kmeny jako u metody REP-PCR. U primeru 173 vzniklo větší množství bandů umožňující porovnání jednotlivých izolátů. Výsledky izolátů byly totožné s REP-PCR. Po získání výsledků jsme za vhodnější primer vyhodnotili primer173, který vytvořil více jednotlivých bendů a poskytoval lepší možnosti k rozlišení. Bylo potvrzeno, že testované izoláty nejsou shodné s negativním kontrolním

kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* Vzorky jsou uvedené v tabulce č. 15 a výsledek RAPD-PCR je uveden na obrázku č. 5.

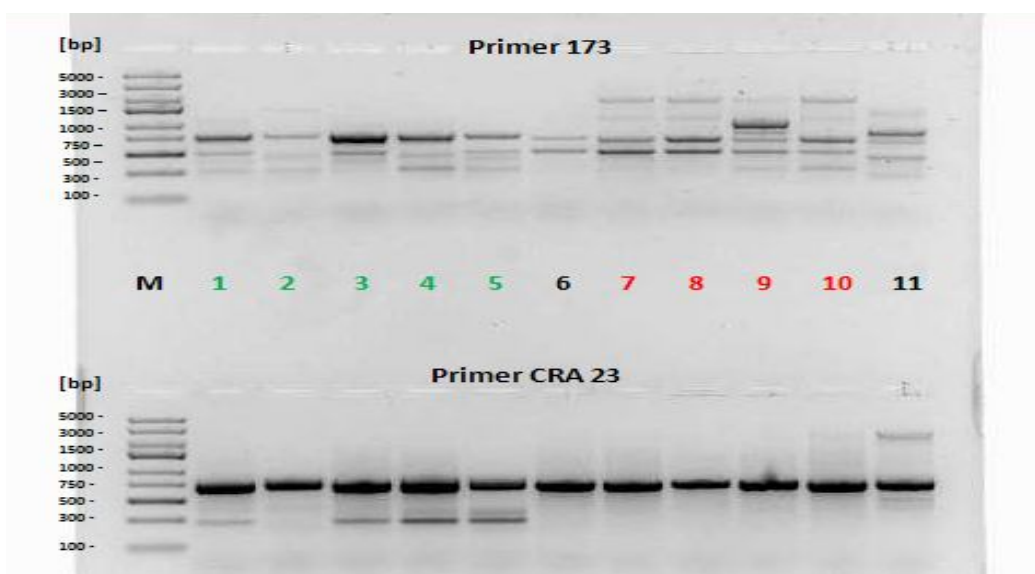
Tab. č. 15 Použité izoláty pro REP A RAPD PCR

Pořadí na gelu	Vzorek	Izolát
1	22	pes
2	25	pes
3	31	pes
4	35	pes
5	39	pes
6	-	<i>B. animalis ssp.lactis sb</i>
7	1	jogurt
8	2	jogurt
9	3	jogurt
10	4	jogurt
11	-	<i>B. animalis ssp. animalis sb.</i>

Obr. č. 4 Výsledky metody REP-PCR s primerem (GTG)₅



Obr. č. 5 Výsledek metody RAPD-PCR s primer173 a CRA 23



5. 4 Výsledky metody MALDI TOF MS

U všech izolátů, které jsme pomocí předešlých metod identifikovali jako *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, byla stanovená výsledná skóre pomocí metody MALDI-TOF MS. Podle shody mezi získanými izoláty a kmeny v databázi byly stanovené vzorky zařazeny do příslušné kategorie. Dělení výsledných hodnot skóre je uvedeno v tabulce č. 16 a v tabulce č. 17 jsou uvedeny hodnoty 16 testovaných vzorků.

Tab. č. 16 Dělení skóre MALDI-TOF MS

Rozsah	Hodnocení	Označení
3,000 – 2,300	Velmi pravděpodobná identifikace na druhovou úroveň	(+++)
2,999 – 2,000	Bezpečná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace na úroveň druhu	(++)
1,999 – 1,700	Pravděpodobná identifikace rodu	(+)
1,699 – 0,000	Nespolehlivá identifikace	(-)

Tab. č. 17 Hodnoty izolovaných vzorků

Vzorek	Hodnota skóre	Označení
22	2,255	(++)
23	2,102	(++)
24	2,175	(++)
25	2,246	(++)
26	2,163	(++)
28	2,181	(++)
29	2,046	(++)
30	2,090	(++)
31	2,181	(++)
32	2,224	(++)
33	2,066	(++)
34	2,327	(+++)
35	2,042	(++)
38	2,043	(++)
39	2,117	(++)
40	2,311	(+++)

Všechny pozitivní izoláty ze psích výkalů byly pomocí metody MALDI-TOF SM rozděleny do jednotlivých kategorií. Vzorky č. 22, 25, 34 a 40 dosáhly nejvyššího skóre.. Hodnoty vzorku 34 a 40 byly zařazeny do první kategorie hodnocení skóre tedy do Velmi pravděpodobná identifikace na druhovou úroveň (+++), zbytek vzorků byl zařazen do kategorie druhé = bezpečná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace na úroveň druhu (++).

5. 5 Vyhodnocení výsledků ANAERO testu

ANAERO test byl proveden u izolátu z psích výkalů a 4 jogurtů označených 1, 2, 3, 4. Pro srovnání a správnou identifikaci izolátů byly přidány *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*. Po uplynutí 48 hodin byly odečteny výsledky testu. U reakce s glukosou vyšly všechny izoláty z psích výkalů i jogurty pozitivně a shodovaly se *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*. Kromě jogurtu č. 2 vycházela u všech ostatních izolátů a jogurtů pozitivně i maltosa. Reakce na laktosu vycházela pozitivně u všech testovaných jogurtů i izolátů ze psích výkalů. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* vyšel jako laktosa negativní. Sacharosa byla negativní u vzorků jogurtů č. 1, 2, 3 jediný vzorek č. 4 byl pozitivní a pozitivní výsledek

měly *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a izoláty. Celkové výsledky reakcí jsou uvedeny v tabulce č. 18.

Tab.č. 18 Výsledky ANAERO testu

Substrát	Izoláty	Kmen	Kmen	Jogurt			
	z psích výkalů	<i>ssp. lactis</i>	<i>ssp. animalis</i>	1	2	3	4
Indol	-	-	-	-	-	-	-
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	-	+	+
Fruktosa	-	-	-	-	-	-	-
Galaktosa	+	-	-/+	+	-	-	-
Laktosa	+	-	+	+	+	+	+
Melezitosa	-	-	-	-	-	-	-
Urinasa	-	-	-	-	-	-	-
Nitrát	-	-	-	-	-	-	-
Sacharosa	+	+	+	-	-	-	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-β-D-glukosaminidasa	-	-	-	-	-	-	-
β-glukosidasa	-	-	-	-	-	-	-
Eskulin	-	+	-	-	-	-	-
Manosa	-	-/+	-	-	-	-	-
Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	-
Xylosa	+	-	+	+	-	-	-
Arabinosa	+	-	-	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-

5. 6 Výsledky API 50 CHL

U tří vybraných kmenů izolovaných ze psích výkalů a dvou jogurtů byl proveden API test CHL. Pro kontrolu a srovnání byl použit sbírkový kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Vyhodnocení výsledků jsme prováděli nejprve po 24 hodinách a po té po 48 hodinách. Výsledky API testu jsou uvedeny v tabulce č. 17.

Už po 24 hodinách od provedení testu byla patrná shoda ve výsledcích reakcí mezi použitým *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a testovanými kmeny vyizolovanými z psích výkalů. Po 48 hodinách od provedení testu jsme provedly konečné vyhodnocení výsledků. U vzorku č. 24 nedošlo k pozitivní reakci s D- laktosou, u ostatních vzorků byla reakce pozitivní. Vzorek č. 35 oproti všem nereagoval s D-sacharosou a D-rafinosou. Rozdíly u ostatních výsledků reakcí byly pouze ve stupnici hodnocení. V některých případech docházelo ke slabší reakci, jako například u vzorku č. 39 a reakci s D-glukosou nebo D-sacharosou, než u sbírkového kmene *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Konečné výsledky reakcí se shodovaly s výsledky *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

Tab.č. 19 Souhrn výsledků API 50 CH

Test	Jogurt 1		Jogurt 3		vzorek 25		vzorek 34		vzorek 40		<i>B.a.lactis</i>	
	12h	24h	12h	24h	12h	24h	12h	24h	12h	24h	12h	24h
D- Ribosa	2	3		3	2	3		2	1	3		3
D Xylosa		1		2	2	3			1	2		1
D-Galaktosa					2	3			2	2		
D-Glukosa	3	3			2	3	2	3	2	2		3
D-Maltosa	3	3		3	3	3	3	3	3	3		3
D-Lactosa	2	3		2			2	3	1	2		2
D-Melibosa	3	3		3	3	3	3	3	3	3		3
D-Sacharosa	3	3		3	3	3			2	2		3
D-Rafinosa	3	3		3	3	3			2	2		3

5. 7 Výsledky sekvenace

Vzorky č. 24, 28, 32, 34 a 40 vybrané pro sekvenaci byly všechny identifikovány jako *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Podobnost 16S rRNA s typovým kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 (kompletní genom) byla 99 %.

6. Diskuse

Bifidobakterie jako první izoloval Henry Tissier v roce 1899 ze stolice kojenců. Postupně byly bifidobakterie izolovány z dalších ekologických nik. Jejich přítomnost byla potvrzena v gastrointestinálním traktu člověka, dutině ústní, GIT zvířat a hmyzu a odpadních vodách (Russell et al., 2011). V odpadních vodách bylo detekováno několik druhů rodu *Bifidobacterium*. Jejich přítomnost byla následkem kontaminace vod fekáliemi a odpadním materiálem. U druhu *Bifidobacterium subtilis* a *Bifidobacterium minimum* bylo zjištěno, že toto prostředí osídluje primárně (Ventura et al., 2004)

U lidí se *Bifidobacterium* sp. objevuje především v gastrointestinálním traktu. Díky svým biochemickým vlastnostem jsou bifidobakterie schopné se zde udržet a vytvářet spolu s ostatními anaerobními mikroorganismy přirozenou střevní mikroflóru. Pozitivní vliv na lidský organismus řadí bifidobakterie mezi probiotika. Probiotika definoval v roce 1899 Fuller jako živý mikrobiální doplněk stravy, který má pozitivní vliv na zdravotní stav hostitele a udržuje mikrobiální rovnováhu v trávicím traktu.

V potravinách jsou bifidobakterie aplikovány především do mléčných kysaných výrobků jako jsou jogurty, kefíry a acidofilní mléka. V současné době je snaha přidávat probiotické kultury i do ostatních potravin. Například firma Carnex uvedla na trh probiotickou klobásu, firma OPAVIA začala vyrábět sušenky s náplní obsahující probiotické kultury a ve firmě Chr. Hansen vyrobily džus obohacený probiotiky.

Výskyt bifidobakterií u zvířat byl zatím potvrzen u několika druhů. Stejně jako na lidský organismus tak i na zvířecí mají probiotika a tedy i bifidobakterie pozitivní vliv.

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* druh byl poprvé izolován z jogurtu (Miele, 1997). Dále byl tento druh izolován z prasečích výkalů (Mayer, et al., 2007) a (Solano-Aguilar et al., 2008). Masco et al. (2004) izolovali *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* z lidské a dětské stolice, výkalů kuřat a králíků a z odpadních vod. V případě odpadních vod se jedná zřejmě o sekundární kontaminaci a lidský trávicí trak osídluje krátkodobě následkem konzumace fermentovaných mléčných výrobků s probiotickou kulturou.

Práce byla zaměřena na izolaci a identifikaci *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* z fekální vzorky od jehňat, telat a psů. Celkem bylo použito 10 vzorků od jehňat, 10 vzorků od telat a 20 vzorků od psů. Pro transport vzorků do laboratoře byl použit Wilkins-Chalgren bujón (Oxoid). Pro následnou izolaci byl použit modifikovaný Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) s přidavkem mupirocinu podle Rada a Petr (2000), který je vhodným agarem pro bifidobakterie.

Identifikace vzorků na rodovou úroveň byla provedena pomocí detekce enzymu F6PPK. Tento enzym je charakteristický pro bifidobakterie a napomáhá k jejich rozlišení od ostatních anaerobních mikroorganismů, které se běžně vyskytují v trávicím traktu lidí a zvířat. Přítomnost enzymu byla potvrzena u všech testovaných vzorků.

Pro identifikaci na úroveň rodu byla použita společně s testem na přítomnost enzymu F6PPK také rodově specifická PCR. Pro tuto metodu byly použity komerčně připravené primery pro stanovení na rodovou úroveň *Bifidobacterium* sp.. Jednalo se o primer Bif164 a Bif662, které byly použity například i ve studii Specifická detekce a analýza probiotického kmene *Bifidobacterium* ve stolici novorozenců vydané R. G. Kok et. al. (1996). Jako ukazatel správnosti výsledků pro rodově specifickou PCR byl použit sbírkový kmen *Lactobacillus casei* jako negativní kontrola.

Po identifikaci vzorků na úroveň rodu *Bifidobacterium* sp. následovala identifikace na úroveň druhu, kdy byla použita druhově specifická PCR. Pro tuto metodu byly použity speciálně navržené primery s označením Lw-A Lw-B a Bflac 2 a Bflac 5, určené pro stanovení *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Pro kontrolu metody byl použit kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* jako negativní kontrola, což doporučuje Markiewicz et al. (2009). Z výsledků této metody bylo zjištěno, že 16 vzorků pocházejících od psů má pozitivní reakci jako sbírkový kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, který byl použit jako pozitivní kontrola. Ostatní čtyři testované izoláty ze psích výkalů a všechny fekální izoláty telat a jehňat nevykazovaly pozitivní reakci.

U všech 16 pozitivních izolátů, které byly identifikovány jako *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* byla pro spolehlivost identifikace použita metoda MALDI TOF MS, která je rozdělila do dvou kategorií. Vzorky 34 a 40 byly zařazeny do první kategorie, hodnocené jako velmi pravděpodobná identifikace na druhovou úroveň. Ostatních 14 testovaných vzorků bylo zařazeno do druhé kategorie, tedy bezpečné identifikace rodu, pravděpodobné identifikace na úroveň druhu. Nejvyšší skóre měl vzorek č. 34, jehož hodnota skóre byla 3,327. Tato metoda se ukázala jako vhodně zvolená a spolehlivá pro identifikaci testovaných vzorků. Ruiz-Moyano et al.,(2011) použil metodu MALDI TOF MS ve své studii, která se také zabývala rozlišením *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* a *Bifidobacterium animalis* spp. *animalis*.

U pozitivních vzorků reagujícími s druhově specifickými primery, byla provedena podrobnější charakterizace. K tomuto stanovení byly využity fingerprintové metody REP-PCR a RAPD-PCR. U těchto metod se používá pouze jeden specifický primer na rozdíl u metod PCR. U metody REP-PCR byl použit primer (GTG)₅, který ve své sekvenci obsahuje

pětinasobnou repetici sekvence GTG. Švec et al., (2005) úspěšně použili tento primer pro identifikaci *Enterococcus* spp. podobné výsledky publikoval i Gevers et al., (2001) u identifikace *Lactobacillus* spp. Pro metodu REP-PCR byly vybrány reprezentativní vzorky izolátů ze psích fekálií. Konkrétně šlo o vzorek č. 21, 25, 31, 35 a 39. a použity byly navíc 4 vzorky jogurtů, které obsahovaly probiotickou kulturu. Pro potvrzení shody byl použit kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a jako negativní kontrola byl použit sbírkový kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*. Při vyhodnocování výsledků bylo patrné, že vzorky izolátů ze psích výkalů jsou si navzájem podobné a podobají se *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, kdežto profil *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* se od nich lišil.

Další fingerprintovou metodu, kterou jsme použili byla metoda RAPD-PCR. Pro porovnání výsledků i pro kontrolu správnosti metody byly použité stejné sbírkové kmeny jako u metody REP-PCR. Metodu jsme prováděli s dvěma rozdílnými primery. První primer byl primer 173, který také použili Briczinski et al. (2009) pro rozlišení kmenů *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium infantis* a *Bifidobacterium suis*. Druhým použitým primerem byl primer CRA 23. Tento primer úspěšně použili Mayer et al. (2007) při identifikaci *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ve fekálních vzorcích prasat. Po získání výsledků bylo provedeno srovnávání výsledných zobrazení. Podle nich bylo rozhodnuto, který z použitých primerů byl vhodnější ke stanovení *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* pomocí metody RAPD PCR. U primeru 173 vznikalo u všech použitých vzorků k viditelné tvorbě jednotlivých bandů, které od sebe byly příslušně oddělené. Bylo možné i potvrzení, že jednotlivé izoláty se neshodují s negativním kontrolním kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*. U primeru CRA 23 nevznikalo u testovaných vzorků dostatečné množství oddělených bandů, které by usnadnily vyhodnocení výsledků. Nebyl patrný ani dostatečný rozdíl mezi sbírkovým kmenem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a kmenem pro negativní kontrolu *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*. Proto byl vyhodnocen primer 173 jako vhodnější pro tuto metodu.

Psí kmeny byly na základě výsledků ANAERO testu 23 schopné fermentovat větší množství substrátů, jako například xylosu a arabinosu. Obecně se uvádí, že právě původní – divoké kmeny mají schopnost využívat širší množství uhlíkatých zdrojů. V případě použití testu API 50 CHL jsme zaznamenali obdobné výsledky.

Pro konečnou identifikaci byla provedena sekvenace vybraných izolovaných vzorků, kdy došlo k potvrzení všech předchozích metod. Metoda sekvenace je považována za vysoce spolehlivou a specifickou metodu.

7. Závěr

U fekálních vzorků telat, jehňat a psů, které byly testovány na přítomnost *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, se podařilo tento kmen izolovat a identifikovat pomocí sérií metod u 16 fekálních vzorků získaných od psů. U vzorků telat a jehňat se nám nepodařilo tento kmen identifikovat. Je tedy možno konstatovat, že druh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* se přirozeně vyskytuje v zažívacím traktu psů.

8. Seznam literatury

- Ashraf, R., Shah N. P., 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp.* in jogurt. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 194–208.
- Bartošová, L. Účinky živých bakterií v potravinách [online]. SZPI. 30.6. 2009 [cit. 2012-03-17]. Dostupné z <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000465&nid=11327&hl=Probiotické%20účinky>
- Briczinski, E., Loquasto, J., Barrangou R., Bydlet, E., Roberts, A. M., Roberts R., F., 2009. Strain-Specific Genotyping of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* by usány Single-Nucleotide Polymorphism, Insertions and Deletions. *Applied and Environmental mikrobiology*. 75 (23). 7501-7508.
- Bruijn, F. J., Rademaker, J., Schneider, M., Rossbach, U., Louwsl, F. J., 1996, Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analyse. *Biology of Plant-Microbe Interaction* 497-502 APS Press.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald G. F. , van Sinderen, D., 2011, Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Mikrobiology*. 149. 4-18.
- Excoffier L., Smouse P.E. a Quattro J.M., 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes; application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Freeman, M. C., Roberts, R., 2009. Surfival of *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* DSMZ 10140 and *Bifidobacterium animalis* spp. *animalis* ATCC 25527 during manufacture and storage of ice cream. *Food Science Collage of Agriculture, Pensilvania University*. 18-20.
- Havliš, J., 1999. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. *Vesmír*. 78. 448.

- Jalili, H., Razavi, S.H., Safari, M., Malcata, F.X., 2009. Enhancement of growth rate and β -galactosidase activity, and variation in organic acid profile of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb 12. *Enzyme and Microbial Technology*. 45. 469-476.

- Lim, K. S., Huh, S., Baek, Y. J., Kim, H. U., 1995. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*. 78 (10). 2108-2212.

- Mayer, H., Amtmann, E., Philippi, E., Steinegger, G., Mayrhofer, S., Kneifel, W., 2007. Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* from reference strains and commercial probiotic strains. *International Dairy Journal*. 17. 565-573.

- Mayo, B., van Sinderen, D., 2010. *Bifidobacteria Genomics and molecular aspects*. Caister Academic Press. 261. ISBN 978-1-904455-68-4

- McPherson, M. J., Moller, S. G. 2006. *PCR*. Taylor and Francis group. UK. p. 292. ISBN: 0-203-00267-9.

- Rada, V., Koc, J. 2000. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft*. 55 (2). 65-67.

- Rada, V., 2011. Využití probiotik, prebiotik a symbiotik. *Medicína pro praxi*. 8 (1). 10-15.

- Rada, V., Petr, J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*. 43. 127 – 132.

- Rademaker, J.L. W. and de Bruijn F.J., 1998. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. *Appl. Envir. Mikrobiology*. 64. 2096-2104.

- Riedy M.F., Hamilton W.J. and Aquadro C.F, 1992. Excess of non-parental bands in offspring from known pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acid Research* 20: 918.

- Roy, D., 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 69 (3). 167-182.

- Rosberg-Cody E., Ross R. P., Hussey S., Ryan C. A., Murphy B. P., Fitzgerald G. F., Devery R., Stanton C., 2004. Mining the microbiota of the neonatal gastrointestinal tract for conjugated linoleic acid-producing Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8): 4635-4641.

- Russell, D.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton C., 2011, Metabolite activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 88-105.

- Scardovi, V., 1986. Genus *Bifidobacterium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins. Baltimore, USA. p. 1418–1434.

- Savard, P., Lamarche, B., Paradis, M. E., Thiboutot, H., Laurin, E., Roy D., 2011. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB 12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 50-57.

- Sun, z., Chen, X., Wang, J., Gao, P., Zhou, Z., Ren, Y., Sun, T., Wang, L., Meng, H., Chen, W., 2010. Complete genome sequence of probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9

- Švec P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I., Swings, J., 2005. Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Mikrobiology Letters*. 247. 59-63.

- Ventura, M., Sinderen D., Fitzgerald G. F., Zink R., 2004, Insights into taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 205-223.

- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn F. J. and Lupski, J. R.,1994. *Meth. Cell. Mol. Biol.* 5, 25-40.
- Vlková, E., Medková, J., Rada, V. 2002. Comparison of four methods for identification of bifidobacteria to the genus level. *Czech Journal of Food Sciences.* 20 (5). 171-174.
- Ward P., Roy D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria., INRA, EDP Science. 85: 23-32.
- ISO 29981: 2010 / IDF 220: 2010, Milk products – Enumeration of presumptive bifidobacteria –Colony count technique at 37 °C

9. Seznam použitých zkratk a symbolů

ATP	adenosintrifosfát
BLOG	blood-glukose-liver agar with oxgall and gentamicin
F6PPK	fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa
GIT	gastrointestinální trakt
MALDI TOF	matrix assisted laser desorption/ionization, time-of-flight
MRS	De Man, Rogosa, Sharpe
MRSD	De Man, Rogosa, Sharp + dicloxacillin
NADP	nikotinamin adenin dinukleotid
NPNL	Neomycin-paromomycin-nalidixic acid-lithium chlorid
PCR	polymerázová řetězová reakce
REP PCR	Interrepetitivní polymerázová řetězová reakce
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic
TPYD	Tryptone Phytone Yeast + dicloxacillin

