

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



**FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH  
A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ**

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

**STANOVENÍ STŘEVNÍCH BAKTERIÍ METODOU  
FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE**

Bakalářská práce

**Vedoucí práce:** doc. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

**Konzultant práce:** Ing. Věra Bunešová, Ph.D.

**Autor práce:** Adéla Brávková

© 2013 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Stanovení střevních bakterií metodou fluorescenční *in situ* hybridizace“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

V Praze dne 11. 4. 2013

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za její pomoc, připomínky a odborné rady při zpracování mé bakalářské práce.

## Souhrn

Ve své bakalářské práci se zabývám stanovením bakterií v trávicím traktu telat. Pro stanovení bakterií se využívá kultivačních metod na selektivních půdách, avšak ne všechny mikroorganismy jsou kultivovatelné. Proto bylo cílem mé bakalářské práce stanovení bakterií trávicího traktu telat molekulárně-biologickou metodou fluorescenční *in situ* hybridizace v porovnání s kultivačním stanovením.

Bakterie trávicího traktu byly stanoveny pomocí selektivních prostředí. Vzorky byly odebírány ve věku 2 – 21 dní. Příslušné naředěné vzorky byly převedeny do Petriho misek a přelity médii. Pro bifidobakterie byl použit modifikovaný TPY agar s mupirocinem (100 mg/l) a kyselinou octovou (1 ml/l). Celkové počty anaerobních bakterií byly stanoveny na Wilkins-Chalgren agaru. Vzorky výkalů telat byly analyzovány také pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Principem FISH je navázání specifické fluorescenčně značené sondy na ribosomální RNA bakterií, které pak světélkují v epifluorescenčním mikroskopu. Byly použity sondy značené FITC a Cy5.

Oběma metodami byly stanoveny podobné počty bifidobakterií. Počty bifidobakterií stanovené metodou FISH s použitím sondy značené FITC a Cy5 se pohybovaly kolem 9,00 log KTJ/g. Kultivační metodou byly bifidobakterie stanoveny v rozmezí od 6,70 do 9,11 log KTJ/g. Získané výsledky ukazují, že sonda pro celkové počty bakterií nebyla plně spolehlivá, protože počty byly nižší než počty bifidobakterií. Stanovené počty celkových anaerobních bakterií pomocí kultivační metody se pohybovaly v rozmezí od 9,62 do 9,98 log KTJ/g. Při použití FISH sondy značené FITC byly stanovené počty v rozmezí 8,59 do 9,10 log KTJ/g a se sondou značenou Cy5 v rozmezí od 8,55 do 8,87 log KTJ/g.

Z výsledků bakalářské práce je patrné, že stanovené počty bifidobakterií ve vzorcích výkalů telat metodou FISH s použitím různých sond jsou srovnatelné s výsledky získanými kultivační metodou. Stanovené počty celkových anaerobních bakterií byly nižší než stanovené počty bifidobakterií, a proto použitá sonda pro celkové počty nebyla vhodná.

**Klíčová slova:** střevní mikroflóra, telata, FISH, kultivační stanovení

## Summary

Bachelor thesis is focused on determination of faecal bacteria in calves. Cultivation selective media is used for the detection of bacteria but not all microorganisms are cultivatable. In order to that, the goal of my bachelor thesis was determination of bacteria in digestive tract of calves by molecular-biological method fluorescence *in situ* hybridization in comparison to cultivation determination.

The faecal samples were taken between 2 to 21 days of calves life and bacteria were detected by selective media. Modified TPY agar with mupirocin and acetic acid were used for bifidobacteria enumeration. The total number of anaerobic bacteria was determined on Wilkins-Chalgren agar. The samples were also analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). For the FISH method are used specific fluorescently labeled probes which hybridise to ribosomal RNA of bacteria. Evaluation of the test result is done by epifluorescence microscopy.

Probes labeled by FITC and Cy5 were used. Similar numbers of bifidobacteria were determined by both methods. The number of bifidobacteria determined by FISH method with the use of probe FITC and Cy5 were about 9.00 log KTJ/g. Bifidobacteria determined by cultivation method were between 6.70 and 9.11 log KTJ/g. It has been demonstrated from the results that probe for total number of bacteria was not fully reliable because the numbers were lower than numbers of bifidobacteria. Numbers of total anaerobic bacteria determined by cultivation were between 9.62 and 9.98 log KTJ/g. The numbers determined using FISH probes marked by FITC were between 8.59 and 9.10 log KTJ/g and with probe marked Cy5 between 8.55 and 8.87 log KTJ/g.

From the results of my bachelor thesis is clear, that number of bifidobacteria in samples by FISH with the use of various probes are comparable with the results from cultivation method. The total number of anaerobic bacteria were lower than number of bifidobacteria, and so the used probe for the total number was not suitable.

**Key words:** intestinal microflora, calves, FISH, cultivation determination

# OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Literární rešerše.....	9
2.1. Střevní mikroflóra.....	9
2.1.1. Střevní mikroflóra u přežvýkavců.....	9
2.1.2. Funkce střevní mikroflóry.....	11
2.2. Probiotika .....	11
2.2.1. Funkce probiotik.....	12
2.2.2. Probiotické druhy bakterií.....	13
2.2.2.1. Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	15
2.2.2.1.1. Charakteristika rodu.....	15
2.2.2.1.2. Výskyt bifidobakterií.....	16
2.2.2.1.3. Identifikace bifidobakterií.....	16
2.3. Kultivační metody.....	18
2.3.1. Kultivační média.....	18
2.4. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	19
2.4.1. Historie FISH.....	21
2.4.2. Sondy a označování.....	21
2.4.3. Fluorescenční barviva.....	22
2.4.4. Fixace a hybridizace.....	23
2.4.5. Vyhodnocení.....	24
2.4.6. Falešné pozitivní výsledky.....	24
2.4.7. Falešné negativní výsledky.....	25
3. Hypotéza.....	26
4. Cíl práce.....	27
5. Materiál a metody.....	28
5.1. Ustájení telat.....	28
5.2. Odběr vzorků.....	28
5.3. Kultivační stanovení.....	29
5.4. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) – fluid metoda.....	29
6. Výsledky.....	31
7. Diskuze.....	37

8. Závěr.....	41
9. Použitá literatura.....	42

## 1. ÚVOD

Mikroorganismy mají nepostradatelnou funkci v trávicím traktu živočichů. Pro optimalizaci střevní mikroflóry lze použít například probiotika. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, při jejichž podávání v adekvátním množství vede ke zlepšení střevní mikroflóry. Jsou přijímána v potravě a zlepšují vlastnosti střevní mikroflóry příjemce. Probiotikum musí však splňovat různé požadavky, nesmí být toxinogenní ani patogenní, musí odolávat technologickým procesům při jeho výrobě a musí být zdravotně nezávadný. Jako probiotika pro telata je možné použít také bifidobakterie, které jsou přirozenou součástí mikroflóry jejich trávicího traktu. Pro sledování zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů v trávicím traktu lze použít různé metody. Klasicky se používají kultivační postupy, které jsou v posledních desetiletích doplňovány nebo nahrazovány molekulárně-biologickými metodami.



## 2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 2.1. Střevní mikroflóra

Složení střevní mikroflóry závisí na aktuálním stavu jedince, je ovlivněno genotypem, imunitním systémem, věkem, stravováním, koncentrací kyslíku a dalšími vnějšími i vnitřními faktory. Vývoj intestinální mikroflóry je zahájen během narození zvířete, kdy je aseptický trávicí trakt plodu infikován přirozenou mikroflórou vagíny, trávicího traktu matky a mikroflórou z okolního prostředí. Ne vždy jsou mláďata infikována střevní mikroflórou během porodu, ale až při přijímání mléka, kdy nasají nečistoty z povrchu vemene. Podstatný vliv na vývoj mikroflóry trávicího traktu mláďat má způsob výživy (Fanaro et al., 2003).

Střevní mikroflóra, je zastoupena nejrůznějšími druhy bakterií, virů a v malém množství i houbami a prvoky. Striktně anaerobní bakterie představují největší část tohoto dynamického systému (Lupp a Finlay, 2005). V tenkém střevě se nacházejí převážně fakultativně anaerobní bakterie např. rody *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, v tlustém střevě pak bakterie striktně anaerobní např. rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus* a *Clostridium* (Holm, 2001). Celkové počty bakterií v trávicím traktu se pohybují kolem  $10^3$ /g v žaludku, od  $10^4$  do  $10^7$ /g v tenkém střevě a nejvíce mikroorganismů se vyskytuje v tlustém střevě, kde se počty pohybují od  $10^{10}$  do  $10^{12}$ /g (Holzapfel et al., 2001).

#### 2.1.1. Střevní mikroflóra u přežvýkavců

Existuje jen málo studií se zaměřením na dynamiku střevní mikroflóry mladých přežvýkavců. Obecně platí, že bakteriální kolonizace začíná *E. coli*, která je zjištělná ve všech oblastech trávicího traktu jehňat a telat již 8 hodin po porodu, laktobacily a streptokoky jsou přítomny od 1. dne. U zdravého zvířete dochází k rychlému osídlení střev laktobacily, dále ke snížení počtu koliformních bakterií a dosažení populace laktobacilů v celém střevě  $10^7$ - $10^9$  buněk na g od 1 týdne věku (Karney et al., 1986; Smith, 1965). K mikrobiální kolonizaci bachoru dojde rychle po porodu vysokým počtem striktně anaerobních bakterií přítomných za 2 dny (Fonty et al., 1987).

Vlková et al. (2006) sledovali vývoj mikroflóry trávicího traktu telat od narození do věku 7 týdnů (Tabulka č. 1). Tři dny po narození dominují koliformní bakterie a lactobacily. Bifidobakterie byly stanoveny jako dominantní skupina bakterií do sedmého dne věku, nadále jejich počty klesaly. Celková koncentrace anaerobních bakterií byla nejvyšší 3 dny po narození, dále se jejich počet snižoval do 7. dne a poté byly stabilní po zbytek studie. Rod *Enterococcus* byl nejméně početnou skupinou sledovaných mikroorganismů a jejich počty se pohybovaly od 6,38 do 7,29 log CFU/g. Množství bakterií rodu *Lactobacillus* pokleslo z 8,35 ve třetím dni věku na 6,67 log CFU/g po pěti týdnech. Největší množství koliformních bakterií bylo nalezeno ve třech dnech života. Během druhého až sedmého týdne byly počty koliformních bakterií vyšší než počty bifidobakterií.

Tabulka č.1. Množství bakterií v trávicím traktu telat (log CFU/g ± směrodatná odchylka ; Vlková et al. (2006).

Bakterie	Věk, dny					
	3	7±1	14±2	21±2	35±2	49±2
Anaerobní bakterie	10,3±0,22	9,86±0,60	9,97±0,78	9,81±0,32	9,87±0,36	9,58±0,13
Bifidobakterie	7,67±0,94	8,86±0,89	8,16±1,25	7,76±1,22	7,40±1,16	6,82±0,66
Laktobacilli	8,35±1,12	7,48±0,52	7,27±0,98	7,66±1,17	6,67±0,76	6,89±1,25
Koliformní bakterie	8,96±1,05	8,04±0,77	8,41±1,13	8,17±0,93	7,88±0,82	7,17±0,58
Enterokoky	7,29±0,59	6,92±1,03	6,41±0,92	7,17±0,90	7,06±0,66	6,38±0,45

V roce 1976 Trovatelli a Matteuzzi (1983) sledovali počty bifidobakterií v bachorové tekutině přežvýkavců a zjistili, že počty bifidobakterií jsou vyšší u zvířat krmených škrobovým koncentrátem než u zvířat krmených objemnými krmivy (Wallace a Newbold, 1992).

K nejvíce početné skupině mikroorganismů trávicího traktu mláďat savců patří bifidobakterie. Tyto bakterie byly zjištěny u králíků, prasat, telat, myší, krys a dalších (Scardovi, 1986). Řada bifidobakterií je hostitelsky specifická. Například *B. suis* byl nalezen pouze ve výkalech prasete, *B. pullorum* u kura domácího a *B. magnum* u králíka. Některé druhy bifidobakterií můžeme nalézt společně u více hostitelů, jedná se například pro *Bifidobacterium animalit ssp animalis* (Mitsuoka, 1992).

### 2.1.2. Funkce střevní mikroflóry

Mikroflóra trávicího traktu představuje důležitou komplexní složku organismu, která se podílí na jeho správné funkci, především v tlustém střevě. Má velkou metabolickou aktivitu a vyznačuje se řadou důležitých funkcí. Podporuje trávicí procesy, protože enzymy mikroorganismů zlepšují zažívání, trávení, štěpení. Mikroorganismy, trvale usídlené v tlustém střevě, fermentují látky přijaté potravou, které projdou nestrávené tenkým střevem. Jedná se o odolné škroby, neškrobové polysacharidy, oligosacharidy a některé proteiny. U dospělého jedince se denně dostane do tlustého střeva průměrně 60-80 g potravy, která je mikroorganismy fermentována na kyselinu mléčnou a těkavé mastné kyseliny (TMK). V jednom gramu stolice je přítomno téměř 10<sup>12</sup>-10<sup>14</sup> živých bakterií, které spadají asi do 500-1000 druhů (Votava, 2003). Velký význam mají ve střevě bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie, které přispívají k udržení rovnováhy. Laktobacily a bifidobakterie chrání sliznici tenkého střeva před patogeny přeměnou cukrů, na kyseliny, přispívají k posilování imunitního systému a obranyschopnosti. Mléčné bakterie snižují pH a osmolaritu prostředí, je také potlačen růst hnilobných bakterií a kvasinek (Scharlau et al., 2009).

## 2.2. Probiotika

Podle FAO/WHO (2002) jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy, jejichž podávání hostiteli v adekvátním množství vede ke zlepšení střevní mikroflóry. Někteří autoři navrhují, aby z definice bylo odstraněno slovo "živé", protože pozitivní účinky na zdraví mají také inaktivované buněčné struktury a buňky mikroorganismů, hlavně bakterií a kvasinek (Ouwehand et al., 2002).

Jsou přijímána v potravě a zlepšují vlastnosti střevní mikroflóry příjemce (Gomes a Malcata, 1999). Bakteriální kmen, který je využíván jako probiotikum musí splňovat jisté požadavky:

- musí být zdravotně nezávadný
- odolný proti poškození během technologického zpracování
- neměl by ovlivňovat organoleptické vlastnosti probiotické potraviny
- bakteriální kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele
- nesmí být toxinogenní ani patogenní

- bakterie musí mít schopnost přežívat v trávicím ústrojí a být metabolicky aktivní

Aby mohly probiotické kmeny ovlivnit složení střevní mikroflóry, musí se do těla dostat v dostatečném množství (minimální množství  $10^8$  buněk). Probiotika pak upravují složení střevní mikroflóry a nastolují její rovnováhu, mají protinádorové účinky, působí při prevenci průjemových onemocnění způsobených změnou stravovacích návyků a při prevenci rotavirových a jiných průjmů (Holm, 2001).

Jestliže má docházet k pozitivnímu působení na přirozenou mikroflóru střeva exogenními bakteriemi, je nutné, aby tyto mikroorganismy po použití hostitelem prošly celým trávicím traktem až do střeva v neporušeném stavu s vysokou vitalitou. Mikroorganismy musí být odolné k nízkým hodnotám pH v žaludku, působení trávicích enzymů a účinkům žlučových kyselin (Fuller, 1989; Gilliland, 2001).

### 2.2.1. Funkce probiotik

V případě správného podávání, mohou mít probiotika řadu příznivých vlivů na hospodářská zvířata: zvýšení rezistence k infekčním onemocněním, způsobeným *E.coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* a rotaviry, zvýšení přírůstků, absorpce živin, zlepšení konverze živin, obohacení o esenciální látky, zvýšení doživosti, zlepšení kvality mléka, zlepšení snášky a kvality vajec, zlepšení kvality jatečního těla a snížení kontaminace masa při porážce (Fuller, 1999).

Ishibashi a Shimamura (1995) studovali vliv podání *B. pseudolongum* a *L. acidophilus* na mikroflóru trávicího traktu a zdravotní stav selat a telat. U zvířat, kterým byla podávána probiotika, se snížil výskyt průjemových onemocnění, u selat se výrazně zvýšily přírůstky a snížila mortalita. Proto je vysoký počet probiotických bakterií v trávicím traktu mláďat savců žádoucí.

## 2.2.2. Probiotické druhy bakterií

Mezi nejběžněji používaná probiotika (Tabulka č. 2) patří bakterie mléčného kvašení (BMK) a to hlavně rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, dále pak rod *Bacillus*, *Bifidobacterium*, kvasinky *Saccharomyces* (Anadón et al., 2006).

Tab.č. 2 Bakterie používané jako probiotika (Holzapfel et al., 2001)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	jiné bakterie	ostatní
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. bifidum</i>		
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Složení probiotik musí být přizpůsobeno stavu, věku a druhu zvířete, kterému jsou probiotika podávána. Vhodné je probiotika zahrnout do krmné dávky ve stresujících obdobích jako je doba odstavu, začátek laktace nebo změna složení krmné dávky (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010). Probiotika jsou aplikována zvířatům ve formě

prášku, tekuté suspenze, v lyofilizované formě, v kapslích, v pitné vodě, ve formě pasty, jako kysané mléko nebo sušená či mražená kultura.

Bakteriální probiotika vykazují příznivý efekt při podávání kuřatům, prasatům a telatům, zatímco probiotika s obsahem kvasinek mají vliv spíše na dospělé přežvýkavce. Při aplikaci probiotik přežvýkavcům je třeba přihlížet k věku zvířete s ohledem na vyvinutí bacheru. U mláďat v období mléčné výživy není vyvinut bacher a strava obsahuje méně vlákniny, více proteinů a snadno zkvasitelných sacharidů. Problémem telat jsou průjmová onemocnění, jejichž výskyt je možné snížit pomocí aplikace BMK, hlavně pak *Laktobacillus acidophilus*, další laktobacily a enterokoky. Z ostatních bakterií se jako probiotika pro přežvýkavce používá *Bacillus toyoi* (Wallace a Newbold, 1992).

Mikroflóra bacheru je podstatně hůře ovlivnitelná. Probiotická aplikace typických bacherových bakterií je problematická, neboť se jedná o kultivačně velice náročné striktní anaeroby. Byly činěny pokusy s geneticky modifikovanými bakteriemi rodů *Fibrobacter* a *Ruminococcus*, ale bez většího úspěchu. Částečného úspěchu bylo dosaženo u *B. fibrisolvens* (Krause a kol., 2003). U skotu bylo dosaženo největších účinků pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, působily vzrůst pH bacherové šťávy s následným rozvojem celulolytické mikroflóry (Dawson et al., 1990; Williams, 1991).

Jako probiotika pro telata je možné použít také bifidobakterie, které jsou přirozenou součástí mikroflóry jejich trávicího traktu (Vlková et al., 2006). Při aplikaci probiotik je důležité zvolit správný kmen a termín aplikace.

První poznatky o potravinách s obsahem bakterií mléčného kvašení s příznivými účinky na lidské zdraví byly popsány ruským vědcem Iljičem Mečnikovem (1907), který přisuzoval dlouhověkost balkánské populace, právě konzumaci fermentovaných mléčných výrobků (Tortuero, 1973).

Probiotika jsou podávána jako prevence vzniku průjmových onemocnění. Infekční průjem je hlavním světovým zdravotním problémem, který je odpovědný za několik milionů úmrtí ročně, hlavně u dětí na celém světě. V rozvinutých zemích je zaznamenán každoročně stejně velký podíl úmrtí způsobený mikroorganismy, které kontaminují potraviny (Anonym1, 2003). Hlavními patogeny způsobující průjmy jsou viry a bakterie. Akutní infekce střev jsou obvykle provázeny průjmy a často i zvracením. Nejběžnější původci akutních průjmů u dětí jsou rotaviry (Picard et al., 2005).

K nejběžnějším zdrojům bakterií s probiotickým účinkem patří zejména kysané (fermentované) mléčné výrobky. Mezi potraviny s nezanedbatelným obsahem probiotických kultur také řadíme vysokodohříváné tvrdé sýry, mléčným kysáním

konzervovanou zeleninu (kysané zelí, rychlokvašené okurky) a šťávu z kysaného zelí. Opomíjeným, ale také důležitým zdrojem jsou ušlechtilé suché salámy.

Probiotika jsou kultury skládající se z živých mikroorganismů, které jsou prospěšné lidem i zvířatům, protože se podílejí na zlepšování rovnováhy mikroorganismů v trávicí soustavě (Smith, 1991).

### **2.2.2.1. Rod *Bifidobacterium***

#### **2.2.2.1.1. Charakteristika rodu**

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou grampozitivní, nepohyblivé, striktně anaerobní, nesporulující tyčinky nepravidelného tvaru a vyskytují se jak jednotlivě, tak i v řetězcích nebo hvězdicovitém uspořádání. Nevykazují katalasovou aktivitu s výjimkou *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides* (Felis and Dellaglio, 2007). Rod *Bifidobacterium* rozkládá fermentovatelné sacharidy na kyselinu mléčnou a octovou v teoretickém molárním poměru 2:3 (Scolaro, 2008).

Optimální teplota růstu je mezi 37 °C a 40 °C, zastavení růstu se pohybuje okolo minimum 20 °C a maximum okolo 46 °C. Optimální hodnota pH pro tento rod je mezi 6,5 a 7. Růst se zastaví při pH než 8,5. (Holzapfel et al., 2001). Některé kmeny druhu *B. animalis* používané do mléčných kysaných výrobků, velmi dobře přežívají i v prostředí s pH 3,5 (Matsumoto a kol., 2004).

Buněčná stěna bifidobakterií je složena ze dvou hlavních komponentů: Peptidoglykanu (murein) a lipoteichových kyselin, jsou zastoupeny v malé míře bílkoviny a polysacharidy (Bonaparte, 1997). Peptidoglykan je specifický pro prokaryotické organismy. Peptidoglykanů je více typů u jednotlivých druhů bifidobakterií což se využívá pro jejich rozlišení. Lipoteichové kyseliny jsou dalším komponentem buněčné stěny bifidobakterií. Jsou to lineární polymery glycerolfosfátu nebo ribitolfosfátu s glykocidicky vázanými cukry. Polysacharidy buněčné stěny se skládají většinou galaktózy, glukózy někdy i rhamnózy. Zastoupení polysacharidů je druhově specifické a může se využít při identifikaci (Fiedler et al., 1981).

### 2.2.2.1.2. Výskyt bifidobakterií

Bifidobakterie běžně osídlují střevní trakt lidí i zvířat a také včel. Můžeme je nalézt v odpadních vodách či v humánním klinickém materiálu (Scardovi, 1986).

Rod *Bifidobacterium* je součástí přirozené mikroflóry trávicího traktu člověka. U kojených dětí tvoří více než 95 % střevních bakterií, u dospělých jejich podíl klesá na přibližně 1-10 %. Co se týče druhového zastoupení, tak *B. breve* a *B. infantis* jsou druhy typické pro kojené i nekojené děti, zatímco druhy *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* a *B. pseudocatenulatum* se vyskytují především ve stolici lidské populace. *B. adolescentis* je druhem, který byl izolován pouze ze stolice dospělců.

Jednou z nejpočetnějších skupin mikroorganismů trávicího traktu mláďat savců jsou bifidobakterie. Většina druhů je hostitelsky specifická. Například druh *B. longum* ssp. *suis* byl nalezen pouze ve výkalech prasat. Dále pak druh *B. pullorum* a *B. gallinarum* byl nalezen jen v trávicím traktu kura domácího. V bacheru u přežvýkavců byly detekovány druhy *B. boum*, *B. pseudolongum* ssp. *globosum*, *B. thermophilum*, *B. merycicum* a *B. ruminantium*. Poslední dva jmenované druhy byly detekovány výhradně z bacheru (Mitsuoka, 1969).

Jako probiotické kultury se používají nejčastěji druhy *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. thermophilum* a *B. animalis* ssp. *lactis*. Jsou součástí řady fermentovaných mléčných výrobků (Picard et al., 2005).

### 2.2.2.1.3. Identifikace bifidobakterií

Identifikace bifidobakterií je prováděna pomocí biochemických postupů, jako je stanovení fermentačních charakteristik a stanovení enzymových profilů (Gavini et al., 1991). V kombinaci s molekulárně-genetickými metodami (Matsuki et al., 1999; Ventura, 2001).

Zpočátku se zkoumala výhradně morfologie buněk popřípadě kolonií nebo jejich kultivační vlastnosti. Později se začaly rozvíjet biochemické a enzymové testy, z nichž nejjednodušším enzymovým testem pro bifidobakterie je fruktózo-6-fosfát fosfoketolázový test (F6PPK; Scardovi, 1986; Orban a Patterson, 2002). Tento enzym je klíčovým enzymem metabolismu bifidobakterií a je pro ně specifický.



Biochemické a enzymové testy jsou založeny na studiu metabolismu daných bakterií. Předběžné identifikace bifidobakterií přežvýkavců lze provádět na základě schopnosti zkvašování pěti cukrů (ribósa, arabinósa, xylósa, celobiósa a inulin; Biavati a Mattarelli., 1991). Identifikace je možné provádět pomocí komerčně vyráběných identifikačních souprav (pro bifidobakterie lze použít např. API 50 CHL, Rapid ID 32 A). Stanovené profily se mohou porovnat s referenčními kmeny nebo jsou vyhodnoceny pomocí numerické identifikace (identifikační databáze, např. Bacter; Gavini et al., 1991)

V posledních letech jsou k identifikaci bifidobakterií využívány také molekulárně biologické postupy. Molekulárně identifikační metody jsou založeny na studiu DNA. Patří mezi ně např. DNA/DNA hybridizace, sekvenační analýza 16S rDNA, hybridizace se specifickou sondou a analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP). Molekulární identifikace je založena na porovnání informací obsažené v DNA (Ward and Roy, 2005).

Existuje mnoho molekulárních metod určených k identifikaci, popisu a detekci bifidobakterií a mnohé z nich jsou založeny na analýze sekvencí 16S ribozomální DNA, jejichž oblasti jsou druhově neměnné a mohou být použity ke srovnání sekvencí různých druhů bakterií. PCR (polymerázová řetězová reakce) a ARDRA (restrikční analýza amplifikované rDNA) jsou dvě spolehlivé, jednoduché a citlivé metody k detekci a identifikaci rodu *Bifidobacterium* a jeho druhů pomocí specifických primerů (PCR) a restrikčních enzymů (ARDRA).

Další metodou identifikace biodiverzity trávicího traktu je FISH, která umožňuje detekci bakteriální buňky ve vzorku pomocí navázání fluorescenčně značené 16S rDNA, sondy na rRNA bakterií. Byly vyvinuty rodově specifické sondy pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH), která je využívána ke stanovení počtu bifidobakterií ve fekálních (Langendijk et al., 1995) a potravinových vzorcích (Kaufmann et al., 1997). Druhově specifické FISH sondy v kombinaci s průtokovou cytometrií použili Dinoto et al. (2006) pro studium dynamiky vývoje bifidobakteriálních druhů během podávání rafinózy.

## 2.3. Kultivační metody

Kultivace mikroorganismů znamená jejich pomnožení při zachování jejich dobré životaschopnosti s optimální fyziologickými vlastnostmi. Stanovení specifických skupin mikroorganismů se může provádět na selektivních médiích, příprava medií je pracná, kultivace je časově náročná a metoda je náchylná ke statickým a metodickým chybám. To brání objektivnímu hodnocení střevní mikroflóry (Langendijk et al., 1995).

Chceme-li mikroorganismy správně kultivovat, musíme jim poskytnout vhodné podmínky, které jsou nezbytné pro jejich metabolismus. Veškerá životní činnost mikroorganismů je přímo závislá na vnějších podmínkách. K vnějším činitelům, působící na životní funkce mikroorganismů, patří obecně veškeré složky prostředí, v němž mikroorganismy žijí, a to složky fyzikální (do kterých patří: vlhkost, osmotický tlak, teplota, záření, třepání), chemické (chemické složení prostředí, reakce prostředí - pH, oxidoredukční podmínky - rH) a biologické (především metabolické zplodiny, antibiotika a protilátky). Oproti molekulárně-genetickým metodám nelze detekovat buňky, které jsou mrtvé, poškozené, částečně nebo úplně rozpadlé (Moter and Göbel, 2000).

### 2.3.1. Kultivační média

Kultivační médium je prostředí, ve kterém mikroorganismy žijí a množí. Kultivace musí probíhat za optimálních podmínek: reakce prostředí (pH), oxidoredukční podmínky (rH), vlhkost, teplota, kyslík atd.

Podle skupenství lze média rozdělit na půdy tekuté, polotuhá, tuhá. Příkladem tekutých půd jsou nejrozmanitější druhy bujónu, jejich výhodou je snadný přístup vody a živin k množícím se mikrobům. Růst bakterií se na nich projeví obvykle zákalem, vzácněji sedimentem nebo blankou. Nevýhodou však je, že ze zákalu nelze stanovit přesný počet a izolovat. Pevné půdy se připravují ztužením základu se živinami pomocí agaru, který je směsí polysacharidů extrahovaných z rudých mořských řas (Potter, 1993).

Může být použit Wilkins-Chalgren agar, na kterém se stanovuje celkový počet anaerobů. Také je doporučováno použití TOS (Merch) agar media, který podporuje růst bifidobakterií (Rada a Koc, 2000). Pro stanovení bifidobakterií, je důležité přidat k agaru mupirocin (MUP), tedy antibiotika, které potlačuje růst všech bakterií mléčného kvašení a kyseliny octovou, která potlačuje výskyt střevních bakterií. Jedním z příkladů je stanovení

pomocí modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid) s přidavkem mupirocinu (100mg/l), ledové kyseliny octové (1ml/l) a sojového peptonu (5g/l) takto byly izolovány bifidobakterie z trávicího traktu telat a jehňat na mléčné výživě (Bunešová et al., 2012).

Další dělení je podle složení a účelu, k němuž jsou půdy používány a to na základní, selektivní, diagnostické, selektivně-diagnostické (Votava, 2003). Základní (univerzální) půdy poskytují vhodné prostředí pro velké množství fyziologicky odlišných mikroorganismů. Selektivní půdy umožňují vypěstování pouze vybraných mikrobů. Na půdách diagnostických lze prokázat obsahující určitý substrát, který je fermentovatelný jen úzkou skupinou MO. Půdy selektivně-diagnostické kombinují principy obou typů předchozích půd (Votava, 2003)

Mnoho kultivačních i mikroskopických metod se používá pro detekci a izolaci mikroorganismů z povrchů, půdy, vody a z dalších prostředí, např. střevního obsahu. Mikroskopické studie však ukázaly, že přibližně 60-90 % střevních bakterií nemůže být kultivováno (Suau et al., 1999) z důvodu jejich způsobu života ve striktně anaerobním prostředí, a proto také pro charakterizaci střevní mikroflóry kultivační techniky nejsou vždy vhodné. Potřeba kultivačních technik se sice nevylučuje, ale díky neustálému zdokonalování a rozvoji molekulárně biologických metod se pro detekci anaerobů začaly využívat bezkultivační metody založené na molekulární analýze DNA (Lan et al., 2002). Jedna z takových metod je například FISH, která je dále popsána.

## 2.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

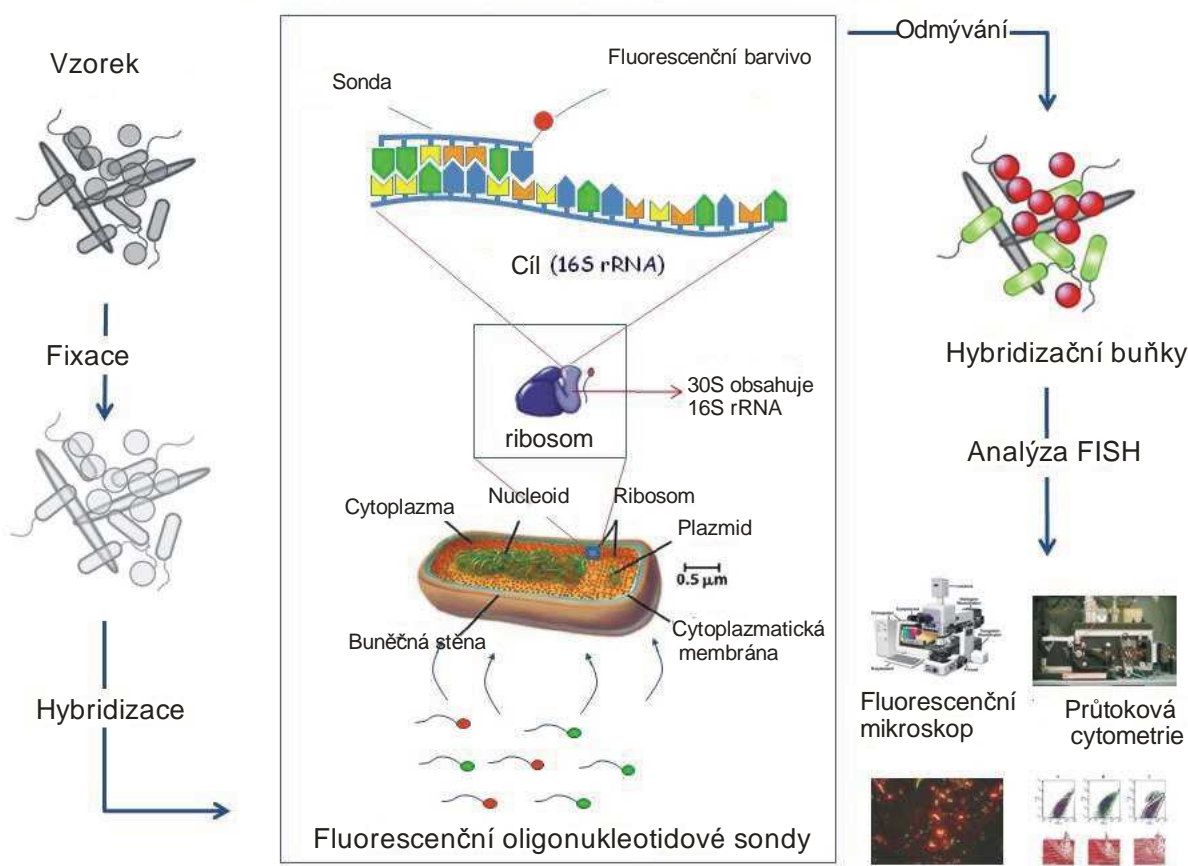
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je metoda používaná k přímé vizualizaci, identifikaci, kvantifikaci a lokalizaci jednotlivých mikrobiálních buněk a jejich skupin v jejich přirozeném prostředí. Tato metoda se v posledních letech začala používat spolu s PCR jako jedna z hlavních metod pro detekci mikroorganismů, zejména bakterií. Metoda je časově nenáročná a dostatečně selektivní a je využitelná v nejrůznějších oblastech mikrobiologie.

Umožňuje detekci kultivovaných, ale i zatím nekultivovaných mikroorganismů, kombinuje přesnost molekulární genetiky s vizuální informací z mikroskopie (Moter and Göbel, 2000). Metoda nevyžaduje kultivaci, což umožňuje kvantifikovat i mikroorganismy, které jsou nekultivované nebo kultivované velice obtížně, jedná se zejména o anaerobní obyvatele trávicího traktu (Takada et al., 2004)

Principem FISH je navázání specifické fluorescenčně značené sondy na ribosomální RNA bakterií, které pak světélkují v epifluorescenčním mikroskopu. Postup zahrnuje následující kroky (viz obr.č.1) po odběru vzorku se vzorek fixuje, následně hybridizuje příslušnými sondami, potom se odmyvá přebytečná sonda a následuje vizualizace epifluorescenčním mikroskopem nebo průtokovou cytometrií.

obr.č.1 Postup FISH (<http://www.biovisible.com/indexRD.php?page=fish>)

## Fluorescence *in situ* hybridizace



V mikrobiologii je nejběžněji používají geny pro 16S rDNA, tato oblast se využívá pro její fylogenetickou stabilitu a její velké množství ve fyziologicky aktivních buňkách. Další sondy, které se mohou využít pro FISH, jsou sondy přisedající k 23S rRNA, 18S rRNA a v poslední době i mRNA (Wagner et al., 1998).

Langendijk et al., (1995) byli průkopníky používání FISH pro stanovení počtu bifidobakterií ve fekálních vzorcích zvířat a lidí.

### 2.4.1. Historie FISH

*In situ* hybridizace (ISH) byla vyvinuta nezávisle na sobě dvěma výzkumnými týmy Pardueho v roce 1969 a Johnovo 1969. Označená DNA nebo 28S RNA byla vpravována do oocytů žab (*Xenopus*) a dále byla detekována pomocí microautoradiografie. Tato technika byla použita k vyšetření nukleových kyselin uvnitř buněk, aniž by se změnila morfologie buňky.

Od té doby byla ISH upravena pro studium evoluce, chromozomální analýzu nádorů a leukémií a cytogenetické studie. Nakonec tato metoda byla zavedena do bakteriologie podle Giovannoni et al., (1988), kteří poprvé použil označení rRNA sondy pro mikroskopickou detekci bakterií. Poté DeLong (1989) poprvé použil fluorescenční značení oligonukleotidů pro detekci jednotlivých mikrobiálních buněk.

V prvních experimentech se DNA sondy značily radioaktivními izotopy ( $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ). Detekce radioaktivních signálů trvala až několik týdnů a doba expozice záležela na množství a koncentraci navázané sondy, nebylo ji možné dopředu odhadnout, a proto bylo vždy připraveno několik preparátů, které byly postupně vyvolávány (Wilcox, 1993).

Ve srovnání s radioaktivní sondou, jsou fluorescenční sondy bezpečnější, nabízí lepší rozlišení a není třeba další detekční kroky kromě vizualizace pomocí mikroskopie nebo průtokové cytometrie. Kromě toho mohou být označeny fluorescenční sondy barvami s různou emisní vlnovou délkou a tím umožňují detekci několika cílových sekvencí v jednom kroku hybridizace.

### 2.4.2. Sondy a jejich značení

Metoda je založena na navázání fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy na rRNA testovaného kmene bakterií. Pro FISH musíme vybírat správné sondy a tedy brát v úvahu specifičnost, citlivost a průnik do bakterií. Typická oligonukleotidová sonda je dlouhá 15 a 30 párů bází (bp) a je generována na základě genetických databází. Délka sondy ovlivňuje její prostupnost buněčnou stěnou a množství barviva, které lze na sondu připevnit. Krátké sondy mají snazší přístup k cíli.

Sondy jsou označeny fluorescenčním barvivem, které umožňují detekci a kvantifikaci specifických bakteriálních populací. Fluorescenční značené oligonukleotidy

jsou komerčně dostupné. Při pokojové teplotě a ve tmě, mohou být uloženy až několik měsíců.

### 2.4.3. Fluorescenční barviva

K přechodu elektronů na vyšší energetickou hladinu neboli excitaci dochází po ozáření fluorescenčního barviva světlem vhodné vlnové délky. Tento stav je však nestabilní a elektrony se vrací do základního stavu. Při tomto procesu dochází k uvolňování světelné a tepelné energie, kterou lze zaznamenat jako světelný vjem, mikroskopem nebo kamerou. Jedna nebo více molekul fluorescenčních barviv je připojena chemicky během syntézy sondy přes aminolinker na 5-konci nebo enzymaticky pomocí transferázy na 3-konci (Moter et al., 1998)

Fluorescenční barviva se používají nejčastěji a jsou také nejrychlejším, nejlevnějším a nejjednodušším způsobem, protože dále nevyžadují žádné další detekční kroky po hybridizaci kromě mikroskopie. Barviva běžně používané pro FISH v mikrobiologii jsou uvedena v tabulce č. 3

Tabulka č. 3 Barviva používané pro detekci mikroorganismů metodou FISH (Cullander, 1999)

<b>Fluorochrom</b>	<b>Excitace</b>	<b>Emise</b>	<b>Barva</b>
<b>Fluoresceinderiváty</b>			
Fluorescein-isothiokyanát (FITC)	492	528	Zelená
5-(-6-)carboxyfluorescein-N-hydroxysuccimid-ester	488	520	Zelená
<b>Rhodaminderiváty</b>			
Tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát (TRITC)	557	576	Červená
5-karboxy-tetramethyl-rhodamin-N-hydroxy-succinimid-ester (TAMRA)	555	576	Červená
Texasred	583	603	Červená
<b>Kyanová barviva</b>			
Cy3	550	570	Oranžová
Cy5	651	674	Infračervená
6-diamidino-2-phenylidol dihydrichlorid (DAPI)	345	455	modrá

Mohou být použity multibandpass filtry pro mikroskopické pozorování vícebarevné FISH. Metodu mnohobarevné FISH (mFISH), zavedl Speicher et al. v roce 1996. M-FISH je založeno na kombinatorním značení, které poskytuje nejjednodušší způsob mnohonásobného označení sondy. Sondy jsou značené buď jediným fluorochromem nebo kombinací fluorochromů, což zvyšuje počet rozpoznatelných DNA sekvencí (Nederlof et al., 1989). Technologie mFISH nevyžaduje žádné speciální vybavení, je však zapotřebí sada šesti různých optických filtrů (pro 5 fluorochromů a DAPI) zahrnujících úzký spektrální interval 350-770 nm, což umožňuje vysoký stupeň rozlišení všech možných fluorochromových párů a vyšší citlivost obrazu. Základními pěti používanými fluorochromy byly v prvních experimentech FITC (excitační maximum 490 nm, emisní maximum 520 nm) a kyanidová barviva Cy3 (554 a 568 nm), Cy3.5 (581 a 588 nm), Cy5 (652 a 672 nm) a Cy7 (755 a 778 nm). Od té doby došlo k mnoha změnám a modifikacím v mikroskopii, analýze obrazu a byla vyvinuta nová generace DNA sond (Speicher, 2001).

Pro identifikaci pomocí vícebarevné FISH u bakterií se používají různě značené sondy. Například se může použít sonda CY5 pro bidifobakterie a FITC pro E.coli, poté bude každá bakterie světélkovat jinou barvou.

Kombinované fluorochromy by měly mít ostré emisní vrcholy, aby se zabránilo spektrální překryvu mezi sondami, čímž se eliminují problémy. Nejjasnější a nejvíce fotostabilní barvivo by se mělo používat pro vzorky s očekávajícím malým počtem bakterií.

#### **2.4.4. Fixace a hybridizace**

Před hybridizací musí být bakterie zafixovány a přizpůsobeny pro průnik fluorescentní sondy do buňky a chránit RNA proti rozkladu endogenními RNáza. Pro fixaci se běžně používají roztoky etanolu, metanolu, formaldehydu nebo formalinu.

Fixační podmínky se mohou různit a závisejí na cílovém organismu a na druhu vzorku nebo tkáni. Specifičnost lze nastavit změnou koncentrace formamidu nebo hybridizační teplotou. Formamid snižuje teplotu tání oslabením vodíkové vazby, tudíž umožňuje snížení teploty použitelné při zachování citlivosti. Efektivní fixace je důležitá pro uspokojující průběh reakce, ale bohužel je těžké ji optimalizovat. Obecně platí, že pro gramnegativní bakterie, se dá použít 3-4% formaldehyd nebo paraformaldehyd. Pro

grampozitivní organismy, se dá využít 50% etanol nebo etanol s formalinem v poměru 9:1 (Jurtshuk et al., 1992; Brown-Howland et al., 1992; Roller et al., 1994).

Po fixaci následuje hybridizace. Je to proces, při kterém se sonda komplementárně váže na rRNA. Hybridizace musí být prováděna za přesně daných podmínek, pro řádné navázání sondy do cílové sekvence RNA. Předehřátý hybridizační pufr obsahující fluorescenčně značené sondy komplementární k cílové RNA je aplikován ke vzorku. Hybridizace probíhá v tmavé vlhké hybridizační komůrce, obvykle při teplotách mezi 37-50 °C. Hybridizační doba se pohybuje v rozmezí od 30 minut až po několik hodin. Poté jsou vzorky opláchnuty destilovanou vodou, aby se odstranily nenavázané sondy. Promývací pufr je regulován různou koncentrací soli, aby se snížilo množství toxického odpadu (Lathe, 1985).

#### **2.4.5. Vyhodnocení**

K vyhodnocování FISH se používá konvenční epifluorescenční mikroskop s připojenou kamerou a analytický software umožňující digitalizovat a následně zpracovat snímky. Dále lze využít konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM - confocal Laser Scanning Microscope), poskytuje větší ostrost pořizovaných snímků a také přesnost prostorového uspořádání mikrobiálních společenstev v místě jejich přirozeného výskytu. Signály FISH mohou být zaznamenány také pomocí průtokové cytometrie (FCM – Flow Cytometry). Tato metoda se využívá pro automatizovanou kvantifikaci mikroorganismů ve vodě a dalších vzorcích, ale neposkytuje žádné informace o morfologii a uspořádání mikroorganismů a nelze tak rozlišit falešné pozitivní výsledky, jako jsou zbytky barviva a jiné obarvené materiály (Amann et al., 2001; Moter and Göbel, 2000).

#### **2.4.6. Falešné pozitivní výsledky**

Některé falešné pozitivní výsledky jsou způsobeny auto-fluorescencí některých mikroorganismů. U některých druhů kvasinek, bakterií rodu *Pseudomonas*, *Legionella*, cyanobakterií a druhů methanogenních bakterií se autofluorescence vyskytuje přirozeně. Autofluorescence lze také nalézt v materiálech kolem bakterií ve vzorcích z životního



prostředí, jako je aktivovaný kal, rostliny nebo pitná voda, kde je způsobena přírodními biologickými nebo anorganickými nečistotami.

Některé typy autofluorescence lze eliminovat vhodnými filtry, ale pokud je zkoumaný vzorek z neznámého složení, je nutné vždy předem autofluorescenci ověřit. V jiném případě může dojít k nespecifickému navázání FITC sond na chlorofyl, hlavně ve vzorcích z trávicího traktu přežvýkavců. Přesnost a specifická FISH závisí na kvalitě oligonukleotidové sondy. SONDY jsou odvozovány od sekvencí uložených v databázích, a jelikož jsou tyto databáze někdy nepřesné, mohou být i sondy z nich odvozené nespecifické a poskytovat tak falešné pozitivní signály. Lze využít sondy pro ověřování přesnosti, které jsou cíleny do různých oblastí 16S rRNA a označeny různými fluorochromy s různou excitační vlnovou délkou (Amann et al., 1995; Amann et al., 2001; Moter and Göbel, 2000).

#### **2.4.7. Falešné negativní výsledky**

Falešné negativní výsledky nevykazují žádné signály ve vzorku, i když by měl. Tyto výsledky jsou způsobeny několika faktory.

Malé množství buněk ve vzorku může způsobit, že pod mikroskopem nebudou žádné buňky pozorovatelné. Obvykle je velmi obtížné detekovat méně než  $10^3$  buněk/cm<sup>2</sup>, respektive méně než  $10^6$  buněk/ml vzorku. Nízká intenzita signálů může být způsobena špatnou přístupností rRNA pro sondy, kvůli její trojrozměrné struktuře. Také struktura buněčné stěny má vliv na pronikání sondy do buňky, obtížnější pronikání je do grampozitivních mikroorganismů. To lze kompenzovat použitím vhodných fixačních médií. Metabolicky neaktivní buňky obsahují velmi malé množství rRNA. Nízká fyziologická aktivita způsobuje slabší signály a neobjektivní kontrolu (Amann et al., 1995). Většina fluorochromů po excitaci rychle ztrácí na intenzitě, proces je nevratný a může nastat v době od několika sekund do několika minut. Proto je tedy vhodné používat stabilní kyanová barviva a upoutávací média, která sondu částečně ochrání. Proto je důležité uchovávat vzorky před sluncem (Moter and Göbel, 2000).

### **3. HYPOTÉZA**

Hypotéza 1: Pro detekci bifidobakterií lze použít různé metody. Metody kultivační a FISH budou aplikovány na stanovení bakterií v trávicím traktu telat. Počty bakterií budou srovnatelné.

Hypotéza 2: Počty bakterií stanovené metodou fluorescenční *in situ* hybridizace budou rozdílné oproti metodě kultivační.

## 4. CÍL PRÁCE

Pro kvantifikaci bakterií trávicího traktu se běžně používají selektivní pěstební prostředí. Ovšem ne všechny mikroorganismy jsou kultivovatelné, proto je cílem mé bakalářské práce stanovení bakterií ve vzorcích z trávicího traktu molekulárně-biologickou metodou fluorescenční *in situ* hybridizace v porovnání s kultivačním stanovením.

## 5. MATERIÁL A METODY

Pro stanovení byly použity dvě odlišné metody, které následně byly statisticky vyhodnocené. Pro celkový počet bakterií a bifidobakterií byla použita molekulárně genetická metoda fluorescence *in situ* hybridizace (FISH). Dále se jednalo o kultivační stanovení na selektivních médiích.

### 5.1. Ustájení telat

Bylo testováno 9 telat, která byla odchována na farmě Dvorec (Vrčeňská zemědělská a.s., Vrčeň, Plzeňský kraj). Telata byla ustájena v individuálních boxech. V prvních 4 dnech byla telata krmena mlezivem od své matky, dále pak mlékem od dojníc až do věku cca 3 měsíců. Na krmný den bylo podáváno minimálně množství 6 l mléka maximálně 8 l mléka. Od 7. Dne věku jim bylo podáváno granulované krmivo (ČOT – S BK GP 3) s ovsem a byl umožněn volný přístup k vodě. Telata jsou odchována v individuálních venkovních boudách a ve věku asi dvou měsíců jsou převezena do teletníku, kde je skupinové ustájení po 8 až 10 ks. Individuální venkovní bouda je používána při vzdušném odchovu telat po dobu jejich mléčné výživy. Telata jsou tímto způsobem ustájena individuálně ve venkovních klimatických podmínkách, tyto podmínky vytvářejí příznivé předpoklady pro dobrou kondici a zdravotní stav zvířat. V teletníku jsou ustájena skupinově a přecházejí na rostlinnou výživu v cca třech měsících. Žádné z testovaných telat nebylo ošetřeno antibiotiky a všechny telata byla narozena přirozenou cestou.

### 5.2. Odběr vzorků

Vzorku výkalů byly odebírány sterilními rukavicemi přímo z rekta do zkumavky s anaerobně připraveným Wilkins-Chalgren bujónem ve věku 2, 3, 5, 9, 14, 21. Vzorky výkalů byly ihned po odběru přeneseny do zkumavek naplněných Wilkins-Chalgren bujónem s 20% glycerinem a zamraženy. Wilkins-Chalgren bujón byl použit pro vytvoření ředících řad ze vzorků výkalů. Vzorky výkalů byly použity pro mikrobiologický rozbor a

analýzu pomocí fluorescence *in situ* hybridizace (FISH). Všechny metody jsou podrobněji popsány níže.

### 5.3. Kultivační stanovení

Kultivační výsledky byly získány z diplomové práce Jany Šelmátové. Bakterie trávicího traktu byly stanoveny pomocí selektivních prostředí. Příslušné naředěné vzorky byly převedeny do sterilních Petriho misek a přelity médii. Pro bifidobakterie, byl použit modifikovaný TPY agar s mupirocinem (100 mg/l) a kyselinou octovou (1 ml/l) podle Rada a Petr (2000), celkové počty anaerobních bakterií byly stanoveny na Wilkins-Chalgren agaru. Misky určené ke kultivaci bifidobakterií a anaerobních bakterií byly umístěny do anaerostatu s nízkoteplotním katalyzátorem (Oxoid BR 42). Anaerostat byl naplněn plyny CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub> v poměru 10 % : 90 %. Kultivace probíhala v anaerobním prostředí při 37 °C 72 hodin, Po kultivaci byly spočteny narostlé kolonie a výsledek byl vyjádřen jako log KTJ/g.

### 5.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) – fluid metoda

Pro kvalitní detekci bifidobakterií ve výkalech telat byla použita FISH souprava pro *Bifidobacterium* spp. a pro celkové počty bakterií metoda fluid (RiboTechnologies 2008). Součástí této sady jsou rodově specifické oligonukleotidové sondy značená dvěma různými barvami, které pronikají do buňky a po navázání na ribozomální RNA světélkují v epifluorescenčním mikroskopu (Langendijk et al., 1995).

Čerstvě odebrané vzorky výkalů byly naředěny v MPC1 pufru do koncentrace 0,1 g/ml, bylo přidáno asi 10 skleněných perel a vzorek byl promíchán. K odstranění hrubých nečistot byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 100 ot/min. Bylo odebráno 100 µl supernatanu, který obsahoval bakterie, přidáno 10 µl fixačního roztoku a buňky byly fixovány 4 hodiny při 4 °C. Po této době byly buňky centrifugovány 5 minut při 12000 otáčkách a 2x promyty MCP1 puftrem. Buňky byly resuspendovány ve 100 µl permeabilizačním roztoku A, který způsobil perforaci buněčné stěny. Následovala inkubace při -20 °C. Deset µl permeabilizovaných buněk bylo přidáno ke 100 µl předehřátého hybridizačního roztoku a hybridizováno 16 hodin ve tmě při 45 °C. Po

hybridizaci bylo odebráno 50  $\mu$ l suspenze, která byla promyta 4 ml přehřátého MCW1 po dobu 20 minut ve tmě. Potom byl celý obsah zkumavky zfiltrován přes membránový filtr, který byl umístěn na podložní sklíčko, na němž bylo nakapáno 6  $\mu$ l upoutávacího roztoku, dalších 6  $\mu$ l téhož roztoku bylo nepipetováno na povrch filtru, který byl následně překryt krycím sklíčkem. Buňky byly vizualizovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu Nikon E – 800 s filtrem FITC (495/520 nm), Cy5 (649/670 nm) excitace/emise, ve kterém buňky s navázanou specifickou sondou FITC zeleně světélkovaly a Cy5 světélkovaly červeně. Počet buněk byl stanoven pomocí softwaru Lucia 5.10. Počet buněk byl spočítán průměrně na 10 polích. Pro výpočet bakterií na gram vzorky se používal vzorec:

$$\text{Počet bakterií/1g vzorku} = \frac{X * M * Df}{S}$$

X -průměrný počet světélkujících buněk na snímku

M – celkový počet políček na efektivním povrchu filtru

Df – ředící faktor (50\*10\*5)

S – hmotnost vzorku v gramech

## 6. VÝSLEDKY

Stanovené počty bakterií jsou uvedeny v grafech č. 1, 2 a v příloze č. 1 jsou uvedeny změřené hodnoty. Výsledky stanovené metodou FISH a kultivační metodou byly mezi sebou statisticky porovnány.

Kultivační metodou byly ve vzorcích stanoveny celkové počty bakterií, průměrná stanovená hodnota byla 9,83 log KTJ/g. Dále byly stanoveny kultivačně bakterie *Bifidobacterium* spp, jejich průměrná hodnota byla 8,34 log KTJ/g. Pro stanovení bylo použito molekulárně-genetické metody FISH. Sondy byly značené buď FITC nebo Cy5 a byly specifické pro celkové počty a bifidobakterie. Průměrná hodnota pro celkové počty (CP) s použitím sondy značené FITC je 8,89 log KTJ/g a s použitím sondy značené Cy5 je průměrná hodnota 8,75 log KTJ/g. Stanovená průměrná hodnota bifidobakterií pomocí sondy značené FITC je 9,08 log KTJ/g a stanovená průměrná hodnota bifidobakterií pomocí sondy Cy5 je 8,99 log KTJ/g.

Bifidobakterie byly stanoveny kultivační metodou v rozmezí od 6,70 do 9,11 log KTJ/g. Metodou FISH se specifickou sondou pro bifidobakterie FITC v rozmezí od 8,82 do 9,3 log KTJ/g a pomocí sondy značené Cy5 v rozmezí od 8,89 do 9,26 log KTJ/g. Celkový počet bakterií byl stanoven kultivační metodou v rozmezí od 9,62 do 9,98 log KTJ/g. Metodou FISH se specifickou sondou pro celkové počty bakterií FITC v rozmezí 8,59 do 9,10 log KTJ/g a pomocí sondy značené Cy5 v rozmezí od 8,55 do 8,87 log KTJ/g.

Tabulka č. 4: Průměrné počty bakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) výsledky byly vyhodnocené analýzou rozptylu

bifidobakterie		průměr ± sm.odchylka	celkový počet anaerobních bakterií		průměr ± sm.odchylka
	FISH FITC	9,08 ± 0,20 <sup>A</sup>		FISH FITC	8,89 ± 0,23 <sup>A</sup>
	FISH CY5	8,99 ± 0,16 <sup>A</sup>		FISH CY5	8,75 ± 0,14 <sup>A</sup>
	Kultivačně	8,34 ± 0,85 <sup>A</sup>		Kultivačně	9,83 ± 0,14 <sup>B</sup>

Hodnoty ve sloupcích s odlišnými indexy se statisticky významně liší

Dále byly mezi sebou porovnány počty bakterií stanovené jednotlivými metodami v jednotlivých dnech. V tabulce č. 5 jsou porovnány výsledky stanovení bakterií metodou FISH při použití různých sond.

Tabulka č. 5: Počty bakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) stanovené v jednotlivých dnech metodou FISH s použitím sondy značené CY5 a sondy FITC

věk	FISH FITC	FISH CY5
2	9,21±0,54*	8,89±0,05*
3	8,96±0,37	8,96±0,15
5	9,03±0,20	9,07±0,26
9	8,82±0,13	8,83±0,23
14	9,10±0,34	8,91±0,42
21	9,38±0,14*	9,26±0,07*

\* P > 0,05

Mezi počty bifidobakterií stanovené metodou FISH s použitím specifické sondy pro bifidobakterie značené CY5 a značené FITC byly podobné a statisticky významně se nelišily. Rozdíly byly statisticky významné ve věku 2 a 21 dní na hladině významnosti (P > 0,05).

Tabulka č. 6: Počty bifidobakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) stanovené v jednotlivých dnech kultivačně a metodou FISH s použitím sondy značené CY5

Věk	FISH CY5	kultivačně
2	8,89±0,05**	6,70±1,86**
3	8,96±0,15	8,84±0,46
5	9,07±0,26	9,11±0,66
9	8,83±0,23*	8,50±0,29*
14	8,91±0,42*	8,38±0,66*
21	9,26±0,07**	8,52±0,81**

\* P > 0,05, \*\* P > 0,01

Mezi počty byly statisticky významné rozdíly ve věku 9 a 14 dní na hladině významnosti (P > 0,05) a ve věku 2 a 21 dní na hladině významnosti (P > 0,01). Ve věku 3 a 5 dní nebyly rozdíly statisticky významné. Bifidobakterie stanovené metodou FISH se sondou CY5, která je specifická pro bifidobakterie, vystoupaly ve věku 21 dní na hodnotu 9,26±0,07 log KTJ/g, a bifidobakterie stanovené kultivačně vystoupaly na hodnotu 8,52±0,81 log KTJ/g, na hladině významnosti (P > 0,01).



Tabulka č. 7: Počty bifidobakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) stanovené v jednotlivých dnech kultivačně a metodou FISH s použitím sondy značené FITC

věk	FISH FITC	kultivačně
2	9,21±0,54**	6,70±1,86**
3	8,96±0,37	8,84±0,46
5	9,03±0,20	9,11±0,66
9	8,82±0,13*	8,50±0,29*
14	9,1±0,34**	8,38±0,66**
21	9,38±0,14**	8,52±0,81**

\* P > 0,05, \*\* P > 0,01

Mezi počty byly statisticky významné rozdíly ve věku 9 dnu na hladině významnosti (P > 0,05) a ve věku 2, 14 a 21 dní na hladině významnosti (P > 0,01). Ve věku 3 a 5 dní nebyly rozdíly statisticky významné. Bifidobakterie stanovené metodou FISH se sondou CY5, která je specifická pro bifidobakterie, vystoupaly ve věku 21 dní na hodnotu 9,38±0,14log KTJ/g, a bakterie stanovené kultivačně vystoupaly na hodnotu 8,52±0,81 log KTJ/g, na hladině významnosti (P > 0,01).

Tabulka č. 8: Počty celkových anaerobních bakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) stanovené v jednotlivých dnech kultivačně a metodou FISH s použitím sondy značené CY5

věk	FISH FITC	FISH CY5
2	8,73±0,05	8,69±0,10
3	9,10±0,40**	8,64±0,21**
5	8,95±0,47	8,85±0,37
9	8,59±0,21	8,55±0,40
14	8,78±0,50	8,87±0,26
21	9,18±0,02	8,87±0,49

\*\* P > 0,01

Mezi počty byly statisticky významné rozdíly ve věku 3 dnu na hladině významnosti (P > 0,01). Ve věku 2, 5, 9, 14 a 21 dní nebyly rozdíly statisticky významné.

Tabulka č. 9: Počty celkových anaerobních bakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) stanovené v jednotlivých dnech kultivačně a metodou FISH s použitím sondy značené FITC

věk	FISH FITC	kultivačně
2	8,73±0,05*	9,62±0,75*
3	9,10±0,40*	9,90±0,42*
5	8,95±0,47**	9,98±0,29**
9	8,59±0,21**	9,69±0,27**
14	8,78±0,50*	9,91±0,48*
21	9,18±0,02*	9,86±0,37*

\* P > 0,05, \*\* P > 0,01

Mezi počty byly statisticky významné rozdíly ve věku 2, 3, 14 a 21 dní na hladině významnosti (P > 0,05) a ve věku 5 dní na hladině významnosti (P > 0,01).

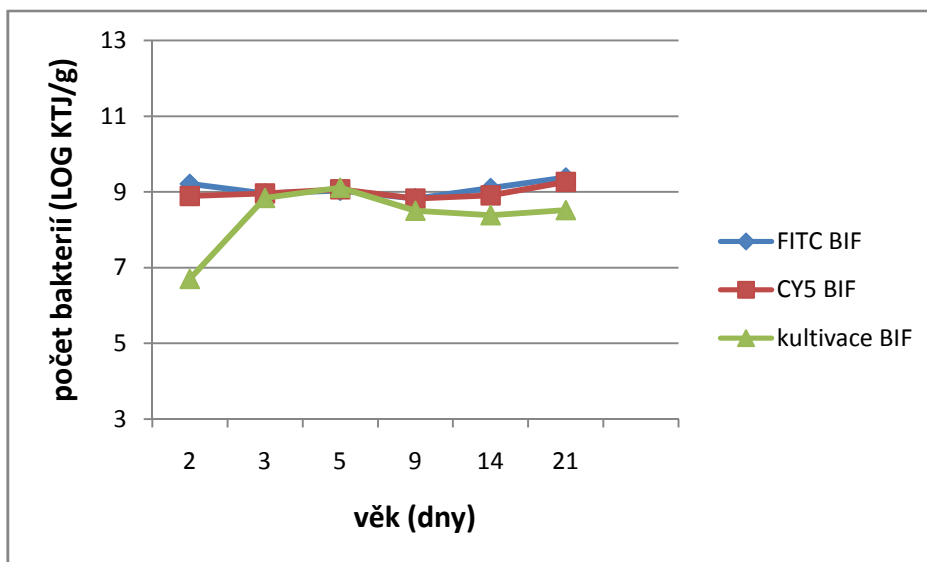
Tabulka č. 10: Počty celkových anaerobních bakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) stanovené v jednotlivých dnech kultivačně a metodou FISH s použitím sondy značené CY5

věk	FISH CY5	kultivačně
2	8,69±0,10*	9,62±0,75*
3	8,64±0,21**	9,90±0,42**
5	8,85±0,37**	9,98±0,29**
9	8,55±0,40**	9,69±0,27**
14	8,87±0,26**	9,91±0,48**
21	8,87±0,49*	9,86±0,37*

\* P > 0,05, \*\* P > 0,01

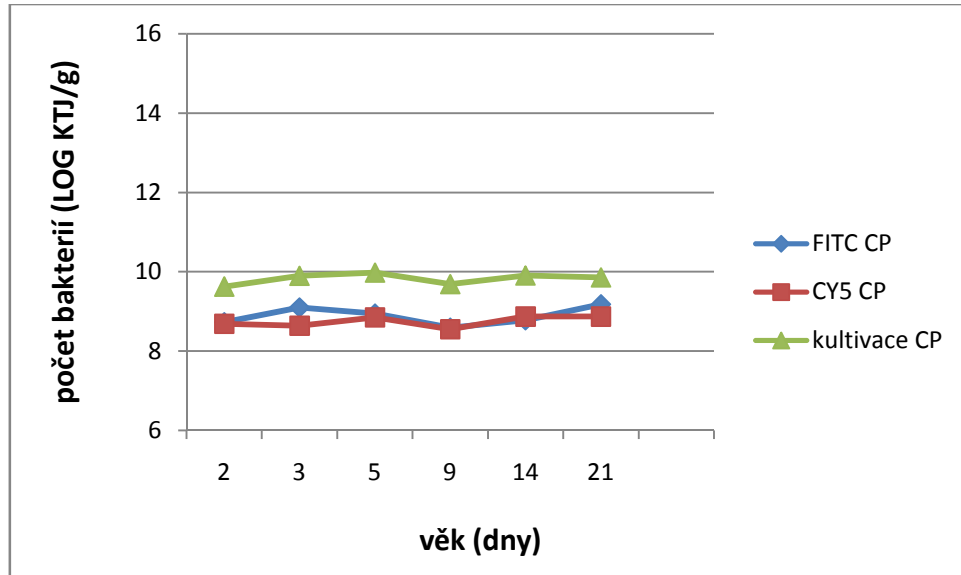
Mezi počty byly statisticky významné rozdíly ve věku 2 a 21 dní na hladině významnosti (P > 0,05) a ve věku 3, 5, 9 a 14 dní na hladině významnosti (P > 0,01).

Graf č. 1: Počty bifidobakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) ve stanoveném období od 2 do 21 dní pomocí metodou FISH při použití různých sond a kultivační metodou.



Z grafu je patrné, že počet bifidobakterií ve druhém dni věku je nejvyšší zaznamenaný metodou FISH s použitím sondy značené FITC a to v hodnotě  $9,21 \pm 0,54$  log KTJ/g. Naopak nejnižší hodnota ve druhém dni věku je pomocí kultivační metody  $6,70 \pm 1,86$  log KTJ/g, tato hodnota je i nejnižší za celé pozorované období, která poté prudce stoupla na hodnotu  $8,84 \pm 0,46$  log KTJ/g. Dále počet bifidobakterií stanovené kultivačně stoupají až do věku 5 dní do hodnoty  $9,11 \pm 0,66$  log KTJ/g, která je nejvyšší ve stanovené metodě, poté hodnoty klesají. Hodnoty stanovené FISH s použitím sondy FITC a sondy Cy5 jsou velmi podobné.

Graf č. 2: Počty celkových anaerobních bakterií ve výkalech telat (log KTJ/g ± sm. odchylka) ve stanoveném období od 2 do 21 dní pomocí metodou FISH při použití různých sond a kultivační metodou.



Z grafu je patrné, že celkové počty anaerobních bakterií stanovené metodou kultivační jsou vyšší než hodnoty stanovené metodou FISH. Nejvyšší hodnota stanovená kultivační metodou dosahuje  $9,98 \pm 0,29$  log KTJ/g ve věku 5 dní. Hodnoty stanovené metodou FISH při použití sondy FITC a sondy CY5 jsou velmi obdobné. Hodnoty stanovené FISH metodou při použití sondy FITC, ze začátku stoupaly na hodnotu  $9,10 \pm 0,40$  log KTJ/g, ale ve věku 3 dni, hodnoty klesly na nejnižší hodnotu  $8,59 \pm 0,21$  za sledované období pomocí této metody a poté hodnoty zase stoupaly. Takto to bylo i při stanovení metodou FISH při použití sondy CY5, akorát se lišily hodnoty, nejvyšší byla ve věku 5 dni  $8,85 \pm 0,37$  log KTJ/g, další sledovaný den byla hodnota nejnižší  $8,85 \pm 0,37$  log KTJ/g a poté hodnoty zase stoupaly.

## 7. DISKUZE

Pro detekci bifidobakterií a celkových počtů bakterií v trávicím traktu telat byly použity metody kultivační a molekulárně-genetická metoda FISH se sondami značenými FITC a Cy5. Vzorky byly odebírány ve věku 2 - 21 dní.

Z tabulky č. 4 je patrné, že mezi průměrnými počty bifidobakterií stanovenými třemi metodami nebyly statisticky významné rozdíly. Statisticky významný rozdíl na hladině významnosti ( $P > 0,01$ ), byl pozorován u celkových počtů anaerobních bakterií kultivační metodou a metodou FISH. Dále je to potvrzeno i v jednotlivých dnech v podrobné analýze.

Kultivační metodou byly bifidobakterie stanoveny v rozmezí od 6,70 do 9,11 log KTJ/g. Metodou FISH se specifickou sondou pro bifidobakterie značenou FITC v rozmezí od 8,82 do 9,3 log KTJ/g a pomocí sondy značené Cy5 v rozmezí od 8,89 do 9,26 log KTJ/g. Celkový počet bakterií byl stanoven kultivační metodou v rozmezí od 9,62 do 9,98 log KTJ/g. Metodou FISH se specifickou sondou pro celkové počty bakterií značenou FITC v rozmezí 8,59 do 9,10 log KTJ/g a pomocí sondy značené Cy5 v rozmezí od 8,55 do 8,87 log KTJ/g. Mezi počty bifidobakterií stanovenými metodou FISH s použitím sondy značené FITC a CY5 byly výsledky téměř shodné a rozdíly nebyly statisticky významné. Počty bifidobakterií stanovené kultivační metodou byly nižší oproti metodě FISH s použitím sondy značené CY5 a statisticky významně rozdílné ve věku 2 a 21 dní na hladině významnosti ( $P > 0,01$ ). Také počty bifidobakterií stanovené kultivační metodou byly nižší oproti metodě FISH s použitím sondy značené FITC a statisticky významně rozdílné ve věku 2, 14 a 21 dní na hladině významnosti ( $P > 0,01$ ). Počty celkových anaerobních bakterií stanovené metodou FISH s použitím sondy značené FITC a CY5 byly podobné a nebyly statisticky rozdílné. Mezi počty celkových anaerobních bakterií stanovených kultivační metodou a metodou FISH s použitím sondy značené CY5 byl statisticky významný rozdíl a to ve věku 3, 5, 9 a 14 dní věku na hladině významnosti ( $P > 0,01$ ).

Při použití metody FISH se specifickými sondami může být dosaženo vyšších počtů bakterií oproti kultivační metodě. To je způsobeno zejména tím, že metodou FISH lze detekovat jak poškozené buňky, tak i zrovna čerstvě mrtvé buňky, ale kultivační metodou je není možné detekovat. Metodou FISH však tyto buňky lze detekovat. Uvádí se, že většina druhů bakterií je nekultivovatelná a tedy nedetekovatelná, ale použitím

molekulárně-genetických metod jsou tyto bakterie detekovatelné. To také může být důvod vyšších počtů bakterií stanovených metodou FISH (Moter and Göbel, 2000).

Metoda FISH je rychlejší, časově nenáročná oproti metodě kultivační, na přípravu jednodušší. Pro stanovení bakterií v trávicím traktu může být použita také průtoková cytometrie. Není však výhodnější pro vyhodnocování, protože ve vzorkách stolice nemusí být obsaženy pouze bakterie, ale také například chlorofyl z rostlin, na který se můžou navázat specifické sondy FITC a tím by došlo k falešně pozitivním výsledkům. Při kultivačním stanovení anaerobních bakterií je třeba, aby se vzorky pracovalo rychle a za anaerobních podmínek. Tato metoda je časově náročná, protože je nutno vzorky kultivovat dokonce několik dní. Z výsledků uvedených v bakalářské práci vyplývá, že pro stanovení bifidobakterií je metoda FISH spolehlivější. Potvrdilo se, že při použití metody FISH může být dosahováno lehce vyšších výsledků než u kultivační metody (Nevoral et al., 2009).

Z výsledků bakalářské práce vyplývá, že celkové počty anaerobních bakterií stanovené kultivační metodou jsou srovnatelné s výsledky, které stanovovali Vlková et al., (2004) u kojenců. Dále z výsledků bakalářské práce vyplývá, že stanovené bifidobakterie metodou kultivační, dále metodou FISH s použitím značené sondy FITC a Cy5 nejsou statisticky rozdílné, což potvrzuje i Nevoral et al., (2009), který došel ke stejným názorům při vyhodnocování výsledků u kojenců.

Drakslarem et al., (2002) zaměřili studie na vývoj mikroflóry trávicího traktu lam od narození do 9 měsíců věku zvířat. Lamy byly krmeny kombinovanou výživou. V prvním dni života lam detekovali celkové anaerobní bakterie ve střevní sliznici v množství  $10^7$  KTJ/g, bifidobakterie v množství  $10^6$  KTJ/g. Počty bifidobakterií se pohybovaly na přibližně stejné hodnotě po celou dobu pozorování. Při porovnání s výsledky bakalářské práce se tyto hodnoty neshodují. Při mém stanovení pomocí metody FISH za použití sondy značené FITC a sondy Cy5 se bifidobakterie ve 2. dni věku pohybovaly kolem  $10^9$  KTJ/g. Ale z grafu č. 1 je viditelné, že ve 2. dni věku při kultivačním stanovení jsou bifidobakterie v počtu  $10^6$  KTJ/g, proto mohlo ze začátku u stanovení metody FISH dojít k falešně pozitivním výsledkům. Při pozdějším stanovení jsou počty bifidobakterií stanovené kultivační metodou vyšší, to může být způsobeno tím, že telata byla krmena mléčnou výživou.

Vlková et al., (2008) porovnávali výskyt bifidobakterií v trávicím traktu telat v závislosti na složení krmné dávky. Telata byla rozdělena do dvou skupin. Jedna skupina telat byla ustájena v individuálních boxech a v době sledování byla krmena výhradně mléčnou výživou. Druhá skupina telat byla také ustájena v individuálních boxech, ale byla

jim podávána kombinovaná dieta. Vzorčky výkalů byly odebírány z rekta a následně byly bakterie stanoveny kultivačně. Ve 4. dni věku telat byly zaznamenány velmi podobné počty bifidobakterií u obou skupin. U telat na mléčné výživě byl jejich počet  $7,63 \pm 1,11$  log KTJ/g, u mláďat na kombinované dietě  $7,74 \pm 1,25$  log KTJ/g. V této době se mikroflóra trávicího traktu ještě vyvíjí. Při druhém odběru byl sledován výrazný rozdíl v počtu bifidobakterií. Počty bifidobakterií se u telat na mléčné výživě zvýšil až na  $9,24 \pm 0,50$  log KTJ/g a v podobném množství byly zaznamenány až do konce studie. U mláďat na kombinované dietě došlo v 7. dni věku rovněž k navýšení počtů bifidobakterií, ale pouze na  $7,98 \pm 0,49$  log KTJ/g. Tento rozdíl ve vývoji počtu bifidobakterií je zřejmě dán rozdílným složením krmné dávky u obou skupin telat. Rozvoj bifidobakterií u telat na mléčné výživě byl tedy pravděpodobně stimulován mlékem od dojnic. Telata na mléčné výživě měla vyšší celkové počty anaerobních bakterií. V porovnání s výsledky bakalářské práce jsou výsledky velice podobné. Telata byla také ustájena v individuálních boxech a v prvních 4 dnech byla telata krmena mlezivem od své matky, dále pak mlékem od dojnic až do věku cca 3 měsíců. Z našich výsledků je viditelné, že bifidobakterie ve 2. dni věku stanovené kultivační metodou mají počty  $6,70 \pm 1,86$  log KTJ/g. Při dalším odběru, ve věku 5 dní, byl výrazný rozdíl v počtu bifidobakterií, tato hodnota stoupla na  $9,11 \pm 0,66$  log KTJ/g, dále jejich množství kleslo až na  $8,52 \pm 0,81$  log KTJ/g při posledním stanovení.

Vlková et al., (2008) vyhodnotili, že vyšší počty bifidobakterií jsou u telat na mléčné výživě oproti výživě kombinované. Vyšší počty bifidobakterií v trávicím traktu jsou žádoucí, protože bifidobakterie pozitivně ovlivňují mikroflóru trávicího traktu. Tento fakt vede ke snižování výskytu průjemových onemocnění, která jsou hlavním důvodem mortality telat (Ishihara et al., 2001; Anadón et al., 2006).

Z výsledků je viditelné, že použitá FISH sonda pro celkové počty bakterií nebyla úplně spolehlivá, protože výsledky jsou nižší než výsledky stanovené specifickou sondou pro bifidobakterie. To může být zapříčiněno různými důvody, nejčastěji se jedná o nenavázání specifických sond. V případě negativních výsledků lze uvažovat o chybě sondy, která mohla být stará, což mohlo způsobit degradaci nukleotidů. Další možností je, že se fluorescenční barvivo už vysvítilo a není tak dále pozorovatelné. K tomuto jevu může dojít, když je vzorek delší dobu na světle. Také závisí na tom, jak dlouho je vzorek v mikroskopu. Pokud je dlouho pod světlem, klesá jeho kvalita, a tedy i jeho schopnost buňky detekovat. Specifická sonda pro celkové bakterie se nám neosvědčila, protože počty celkových anaerobních bakterií by měly být vyšší, než výsledky bifidobakterií.

Vzhledem k podobnosti výsledků s jinými autory lze předpokládat, že kultivační metoda a metoda FISH pro bifidobakterie byly vhodně zvoleny a lze je spolehlivě použít pro stanovení počtů bakterií ve vzorcích stolice.



## 8. ZÁVĚR

Z výsledků bakalářské práce vyplývá, že počty bifidobakterií stanovené ve vzorcích výkalů telat metodou FISH s použitím různě značených sond jsou srovnatelné s výsledky získanými kultivační metodou. Kultivační metodou byly bifidobakterie stanoveny do hodnoty 9,11 log KTJ/g. Metodou FISH se specifickou sondou pro bifidobakterie značenou FITC v rozmezí od 8,82 do 9,3 log KTJ/g a pomocí sondy značené Cy5 v rozmezí od 8,89 do 9,26 log KTJ/g.

Použitá FISH sonda pro celkové počty bakterií nebyla vhodná, protože počty celkových anaerobních bakterií byly nižší než stanovené počty bifidobakterií.

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

Anadón, A., Martínez-Larranaga, MR., Aranzazu-Martinez, M. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment, Regul Toxicol Pharmacol 45, pp. 91-95.

Anonym 1. World Health Organization 2003. The World Health Report 2003 – shaping the future. [Http://www.who.int/whr/2003/en/](http://www.who.int/whr/2003/en/), last accessed 1 March 2005.

Billoo A.G., Memon M.A., Khaskheli S.A., Murtaza G., Iqbal K., Saeed Shekhani M., Siddiqi A.Q. (2006): Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. World J. Gastroenterol. 12(28): 4557–4560.

Bomba, A. 1997. Využitie probiotík vo výžive a v prevencii ochorení mláďat hospodárskych zvierat. In: Slovenský chov - príloha, roč. 2, 1997, č. 11, s. 9. Brno. 351 s.

Bunešová V., Vlková E., Grmanová M., Mrázek J., Killer J., Kopečný J., Rada V., Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves, *Department of Microbiology* (2012): 166-168.

Bunešová V., Vlková, E., Killer, J., Rada, V., Ročková, Š. 2012a. Identification of *Bifidobacterium* strains from faeces of lambs. Small Ruminant Research. 1-6.

Burton J.P., Wescombe P.A., Moore C.J., Chilcott C.N., Tagg J.R. (2006): Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. Appl. Environ. Microbiol. 72(4): 3050–3053

Bustin, S., A., 2004b: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT PCR) trends and problems. J. Mol. Endocrinol. 29 (1): 23-29.

Devriese L.A., Pot B., Collins M.D. (1993): Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. J. Appl. Bacteriol. 75: 399-408.

Devriese, L. A., Pot, B., Vandamme, L., Kersters, K. and Haesebrouck, F. (1995): Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin.

Duffy, L.C., Zielezny, M. A., Riepenhoff, – Talty, M. et al. 1994 a. Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. *Pediatr Res.* 35, pp. 690-695. edition. Elsevier, Amsterdam. 209 s.

Duffy, L. C., Zielezny, M. A., Riepenhoff, – Talty, M. et al. 1994 b. Reduction of virus shedding by *B.bifidum* in experimentally induced MRV infection. Statistical application for ELISA. *Dig Dis Sci.* 39, pp. 2334 – 2340.

Draksler, D., Locascio, M., Gonzáles, S., Olivek, G. (2002). The development of faecal flora in zouny Creole goats, *Small ruminant Res.* 46, pp. 67-70.

Facklam R.R., Sahn D.F., Teixeira L.M. (1999): *Enterococcus*. In: Murray P.R., Baron E. J., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Yolken R.H. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7: 297-305. ASM Press, Washington D.C.

Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V: Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl.* 441, 48-55 2003.

FAO/WHO (2002): *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. FAO/WHO, London. 11p.

Favier C.F., Vaughan E.E., de Vos W.M., Akkermans A.D.L. (2002): Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology.* 68: 219-226

Fiedler, F., Schaffler, M. J. & Stackebrandt, E. (1981). Biochemical and nucleic acid hybridisation studies on *Brevibacterium linens* and related strains. *Arch Microbiol* 129, 85±93.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66, pp. 35-378.

Gibson G.R., Rastall R. A. (2006): *Prebiotics: Development and Application*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex. 264 s.

Gilliand, S.E. (2001) probiotics and prebiotics. *Applied Dairy Microbiology* (eds. E.H. Marth & J.L. Steele), 2<sup>nd</sup> end., pp.327-344, Marcel Dekker, New York.

Gomes, Ana M. P. ; Malcata, F. Xavier - *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. ISSN 0924-2244. (1999), p. 139-157

Görner, F. - Valík, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé centrum 2004, s. 133-135, 225-262, ISBN 80-967064-9-7

Hammes W.P., Vogel R.F. (1995): The genus *Lactobacillus*. In: Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (ed.), *The genera of lactic acid bacteria*, 2: 19–54. Blackie Academic and Professional, London.

Hawkins, R. P., Pingree, S. (1990). „Divergent Psychological Processes in Constructing Social Reality from Mass Media Content.“ In Signorielli, N., Morgan, M. (et al.) *Cultivation Analysis: New Directions in Media Effects Research*. California: SAGE Publications

Holm F. (2001): Gut Health. 1-28. Zdroj: [www.flair-flow.com](http://www.flair-flow.com)

Holzapfel H. W., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2 Suppl): 365–373 <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>

Hunt, M., 2010 Real time PCR, University of South Carolina – School of medicine,

Chen B. Y., Janes H. W. (2002): PCR cloning protocols. Humana press, New Jersey. International Journal of Food Microbiology, 26(2), 187-197.

Ishira, N., Chu, D. C., Akachi, S., Juneja, L. R. (2001). Improvement of intestinal microflora balance and prevention of digestive and respiratory organ diseases in calves by green tea extracts, Livest Prod Sci 68: pp. 217-229.

Janderová B., Bendová O. (1999): Úvod do biologie kvasinek. Karolinum, Praha. 108.

Kalina T., Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha. 608 p.

Krejsek, J. - Kundlová, M. - Kolářková, M. Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatric pro praxi*, 2007, roč. 8, č. 3, s. 126-127.

Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.J., Kanphuis, G.F. Wilkinson, M.F., Welling, G.W. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. With genus-specific 16S rRNA-target probes and its application in fial simplex, *Appl Environ Microbiol.* 61, pp. 3069 – 3075.

Lan Z, Sever-Chroneos Z, Strobeck MW, et al: DNA-damage invokes mismatch repair dependent cyclin D1 attenuation and RB signaling pathways to inhibit CDK2. *J Biol Chem* 277:8372-8381, 2002

Lievin, V., Peiffer, I., Huddault, S. et al. 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut.* 47, pp. 646-652.

Lupp C., Finlay B.B. 2005. Intestinal microflora. *Curr. Biol.* 15(7): R235-6.

Matteuzzi M., Crocciani F., Brigidi P.: Antimicrobial susceptibility of Bifidobacterium. *Ann Microbiol Inst Pauster.* 134A, 339-349 1983.

Mitsuoka, T. 1992. The human gastrointestinal tract. In: B.J.B. Wood (Ed.): *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.* Elsevier Appl.Sci., London, p.69-114.

Misaki, K., Kawami, H., Tanaka, T., Handa, Y., Nakamura, M., Matsui, S., Matsuda, T., 2007. Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 26 (7), 1370-1379.

Nederlof, P.M., Robinson, D., Abuknesha, R., Wiegant, J., Hopman, A.H.N., Tanke, H.J., Raap, A.K. 1989. Three color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry.* 10: 20-27.

Nevoral, J.: Prebiotika, probiotika a symbiotika (on-line).2/2005, pp. 59-65. Dostupné z <http://pediatriepropraxi.cz>

Nevoral, J., Rada, V., Vlková, E., Bláhová, K., Bronský, J., Bubáková, D., Killer, J., (2009). Intestinal microbiota in exclusively breast-fed infants with blood-streaked stools. *Folia Microbiologica,* 54 (2), s. 167-171.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: pp. 279-289.

P.S. Bernard, C. T. Wittwet, *Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics,* American Association for Clinical Chemistry, 2002

Pepper I.L., Gerba C.P. (2004): *Environmental Microbiology: a laboratory manual.* Second

Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., Gobbato, N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci.* 78, pp. 1597-1606.

Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C. (2005): Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22(6): 495-512.

Polšteinová, J. 1988. Růstové-stimulační látky ve váživě hospodářských zvířat. Praha : UVTL, s. 71.

Potter, W. J. (1993). Cultivation Theory and Research. A Conceptual Critique. *Human Communication Research* 19(4): 564-601

Powledge, T. M. (2004): The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education* 28: 44 – 50

Rada, V., Koc, J., The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products *Milchwissenschaft*, 2000.55(2): p. 65-67.

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

Rada V., Tománková E., Killer J., Praha: ČZU 2006, *Potravinářská mikrobiologie*, pp 45-56, ISBN 80-213-1583-0

Requena T., Burton J., Matsuki T., Munro K., Simon M.A., Tanaka R., Watanabe K., Tannock G.W. (2002): Identification, detection, and enumeration of human Bifidobacterium species by PCR targeting the transaldolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2420-2427

Rose A., H., Harrison J., S. (1991): *The Yeast – Yeast organelles*. Academic press, Londýn. 9-16.

Rosypal, S., et al. (2001): *Terminologie molekulární biologie*. Brno; 1: 39

Rubes, J., Vozdova, M. and Kubickova, S. (1999). Aneuploidy in pig sperm: multicolor fluorescence in situ hybridization using probes for chromosomes 1, 10, and Y. *Cytogenetics and Cell Genetics* 85, 200-204.

Salminen, S., Ouwehand, A.C., Isolauri, E. 1998. Clinical application of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 563-572.

Satokari, R.M., Vaughan E.E., Akkermans A.D.L., Saarela M., de Vos V.M. (2001): Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 504-513

Scardovi V.: Genus *Bifidobacterium*, pp. 1418 -1434 in P. H. A. Sneath, N. S. , Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt (eds.) : *Bergey's "Manual of Systematic Bacteriology"*. Williams and Wilkins. Baltimore 1986.

Scolaro K.L. (2008): OTC product: VSL #3: the living shield. *J. Am. Pharm. Assoc.* 48(6): 156.

Sedláček Ivo (2007): *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita, Brno. 270 p.

Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T., Klenow S., Miene C., Munjal U., Stein K., Gleis M. 2009. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat. Res.-Rev Mutat. Res.* 682: 39-53.

Scheutz, F. a Strockbine NA. Genus *Escherichia*. In: BRENNER, DJ., KRIEG, NR. a STALEY, JT., *The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York : Springer, 2005, 2. vyd., sv. II, s. 607-624. ISBN 978-0-387-95040-2

Schneiderová P., DGGE- postup pro sledování střevní mikroflóry, 2008, <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=125&ch=1&typ=1&val=71888>

Smith, J. 1991. Probiotics - fact or fiction? In : *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, roč. 51, č. 4, pp. 539 – 570.



Speicher, M.R., Ballard, S.G., Ward, D.C. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet.* 12: 368-375.

Speicher, M.R. 2001. Multiplex-FISH (M-FISH) in clinical cytogenetics and research applications. *E.C.A. Newsletter.* No.7: 3-7.

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.

Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.J., Gibson G.R., Collins M.D., Dore J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65. 4799–4807

Šelmátová, Jana. *Podávání bifidobakterií telatům: diplomová práce.* česká zemědělská univerzita, 2011. 101p.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V. and Koptíková J. (2005): *Metody molekulární biologie.* Masarykova univerzita v Brně, 188p

Šmarda J, *Metody molekulární biologie*, 1. vydání, Brno, Vydavatelství MU, Brno-Kraví Hora, 2005, ISBN 80-210-3841-1

Takada, T., Matsumoto, K., Nomoto, K., (2004). Development of multi-color FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *Journal of Microbiological Methods*, 58 (3), s. 413-421.

Theunissen, J., Britz, T. J., Torriani, S. and Witthuhn, R. C. (2005): Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis *International Journal of Food Microbiology*, 98(1), 11-21.

Tortuero, F. 1973. Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chick on the growth, feed conversion malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. *Poultry Sci*, 52, 197-203.

Tvrdoň M, Báležová B., Praha: SNTL 1986 Kvasná mikrobiologie pp. 11-12

Votava M. (2005): Lékařská mikrobiologie obecná – Druhé přepracované vydání. Neptun,

Vlková, E., Rada, V., Bujnáková, D., Kmet, V. (2004). Enumeration, isolation and identification of bifidobacteria from infant feces. *Folia Microbiologica* 49 (2), s. 209-212.

Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I., Killer, J., Šmehilová, M. (2008). Occurrence of bifidobacterial in reces of calves fed milk or combined diet, *Arch. Anim. Nutr.* 62, pp. 359-365 .

Votava, M. aj. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun 2003, s.136-137, ISBN 80-902896-6-5

Vozdova, M., Machatkova, M., Kubickova, S., Zudova, D., Jokesova, E. and Rubes, J.(2001). Frequency of aneuploidy in pig oocytes matured in vitro and of the corresponding first polar bodies detected by fluorescent in situ hybridization. *Theriogenology* 56, 771-776.

Wagner, M., M. Schmid, S. Juretschko, K.H. Trebesius, A. Bubert, W. Goebel, and K.H. Schleifer. (1998). In Situ Detection of a Virulence Factor mRNA and 16s rRNA in *Listeria Monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*. 160:159-168

Walter J., Hertel C., Tannock G.W., Lis C.M., Munro K., Hammes W.P. (2001): Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2578-2585

Ward, P., Roy, D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait* 85. 23-32.

White, T. J., Madej, R., Persing, D. H. 1992. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry* vol. 29. 161-196.

Wilcox JN. Fundamental principles of in situ hybridization. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41 . 1725-1733, 1993.

Wilson K.H., Blichington R.B. (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2273-2278

Wilson, K. Walker, J. (2010): Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Cambridge University Press, 800p

Wintzingerode F.V., Gobel U.B., Stackebrandt E. (1997): Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology reviews*. 21: 213-229

Zoetendal E.G., van Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L., de Vos W.M (2002a): Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3401-3407

Zorzatto F., et al, Clinical and functional effect of a deletion in a COOH-terminal luminal loop of the skeletal muscle ryanodine receptor, *Human molecular genetics*, 2003