

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Selektivní stanovení druhů rodu *Bifidobacterium*  
v potravinách a potravních doplncích**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Tereza Jehličková**

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

© 2013 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Selektivní stanovení druhů rodu *Bifidobacterium* v potravinách a potravních doplňcích" 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. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne: 11.dubna 2013

Podpis autora práce: \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za podnětné připomínky a čas, který věnoval vedení mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Věře Bunešové PhD. a Ing. Šárce Ročkové PhD., za cenné rady, které mi v průběhu práce dávaly.

# Selektivní stanovení druhů rodu *Bifidobacterium* v potravinách a potravních doplňcích

---

## Selective enumeration of bifidobacterial species in food and food supplements

### Souhrn

Tato práce „Selektivní stanovení druhů rodu *Bifidobacterium* v potravinách a potravních doplňcích“ se v první části zabývá obecnou charakteristikou funkčních potravin a potravních doplňků, následně pak potravními doplňky s obsahem bakterií rodu *Bifidobacterium* a jejich stanovením.

V dnešní době jsou funkční potraviny velmi oblíbené, a stejně tak i potravní doplňky, se kterými jsou často zaměňovány. Probiotika, která se nejčastěji užívají ve formě kapslí či sypkého prášku, se v této podobě řadí mezi potravní doplňky, a v této formě byly také testovány. Mezi probiotika se řadí hlavně bakterie mléčného kvašení, jako jsou například laktobacily, streptokoky nebo laktokoky. Patří sem ale i propionové bakterie či bifidobakterie. Tato práce se zaměřila na selektivní stanovení druhů rodu *Bifidobacterium*.

Celkem bylo v této práci otestováno 10 potravních doplňků na 5ti pěstebních prostředích (WCh, MM, MT, MMe, SMM), kde cílem bylo vyvinutí selektivních médií pro jednotlivé druhy rodu *Bifidobacterium*. Sestavení jednotlivých selektivních médií probíhalo na základě informací získaných z fermentačních profilů jednotlivých druhů rodu *Bifidobacterium* a na základě výsledků z biochemických testů. Selektivní média byla sestavena pro následující druhy: *Bifidobacterium bifidum* (MM médium), *Bifidobacterium longum* (MT, MMe médium) a *Bifidobacterium breve* (SMM médium).

Bifidobakterie pocházející z potravních doplňků, byly nejdříve kultivovány, následně izolovány a nakonec byly čisté kultury identifikovány na úroveň rodu i druhu pomocí biochemických a molekulárně genetických metod. Jednalo se o metodu F6PPK, což je metoda využívající se k identifikaci na úroveň rodu pomocí detekce enzymu F6PPK. Následně byly

provedeny testy API 50 CHL a ANAEROtest 23, které se používají k druhové identifikaci. Nakonec byla využita molekulárně genetická metoda PCR za použití specifických primerů.

Výsledky kvantifikace byly takové, že nejvíce kolonií vyrostlo na MM a SMM médiu v počtech  $9,21 \log \text{KTJ} \pm 0,08 \text{ SD}$  (MM) a  $9,21 \pm 0,11 \text{ SD}$  (SMM). Na MT médiu narostlo  $9,09 \log \text{KTJ} \pm 0,24 \text{ SD}$ , na WCh  $9,06 \pm 0,09 \text{ SD}$  a nejméně narostlo na MMe médiu. Jednalo se o počty  $8,85 \pm 0,11 \text{ SD}$ .

Z hlediska selektivity médií výsledky ukazují, že prozatím ani jedno z testovaných médií není zcela selektivní. Pro *Bifidobacterium bifidum* se tedy jako perspektivní jeví MM médium, pro *Bifidobacterium longum* – MT médium a pro *Bifidobacterium breve* – SMM médium.

**Klíčová slova:** Bifidobakterie, probiotika, médium, funkční potraviny, potravní doplněk

## Summary

This work "Selective enumeration of bifidobacterial species in food and food supplements" in the first part deals with the general characteristics of functional foods and food supplements, subsequently food supplements containing bacteria of the genus *Bifidobacterium* and their enumeration.

Nowadays, the functional food is very popular, as well as food supplements, with which they are often mixed up. Probiotics, which is usually used in the form of capsules or bulk powder, in the form of one of the dietary supplements, and in this form has also been tested. Among probiotics belong mainly lactic acid bacteria, such as lactobacilli, streptococci or lactococci. It also includes propionic bacteria or bifidobacteria. This work focused on the selective enumeration of species of the genus *Bifidobacterium*.

Altogether, this study tested 10 food supplements in 5 growing environments (WCh, MM, MT, MMe, SMM), where the goal was to develop a selective media for each species of the genus *Bifidobacterium*. Combination of the selective media was based on information obtained from the fermentation profiles of individual species of the genus *Bifidobacterium* based on the results of biochemical tests. Selective media were prepared for the following species: *Bifidobacterium bifidum* (MM medium), *Bifidobacterium longum* (MT, MMe medium) and *Bifidobacterium breve* (SMM medium). Bifidobacteria from food supplements were first cultured and subsequently isolated and pure cultures were then identified to genus level and species using biochemical and molecular genetics methods. It is a method F6PPK, a method of using the identification to the genus level by detecting enzyme F6PPK. Subsequently, API 50 CHL and ANAEROtest 23, test were performed for species identification. Finally, species – specific PCR was done.

The results of quantification were such that most colonies grown on MM and SMM medium in the number of  $9.21 \pm 0.08$  log CFU SD (MM) and  $9.21 \pm 0.11$  SD (SMM). On MT medium grew  $9.09$  log CFU  $\pm 0.24$  SD, the WCh  $9.06 \pm 0.09$  SD and at least increased to MMe medium. It was a number of  $8.85 \pm 0.11$  SD.

In terms of media selectivity results have shown, that so far, none of the tested media are fully selective. But as promising seems to be MM medium for *Bifidobacterium bididum*, MT medium for *Bifidobacterium longum* and SMM medium for *Bifidobacterium breve*.

**Keywords:** Bifidobacteria, probiotics, medium, functional food, food supplement

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Funkční potraviny.....</b>	<b>3</b>
3.1.1    Legislativa a historie funkčních potravin .....	5
3.1.2    Rozdíl mezi potravinami pro zvláštní výživu a potravními doplňky.....	6
3.1.3    Rozdíl mezi léky a funkčními potravinami .....	7
<b>3.2 Prebiotika .....</b>	<b>7</b>
<b>3.3 Probiotika .....</b>	<b>10</b>
<b>3.4 Synbiotika .....</b>	<b>11</b>
<b>3.5 Rod <i>Bifidobacterium</i>.....</b>	<b>12</b>
3.5.1    Charakteristika .....	12
3.5.2    Vlastnosti .....	14
3.5.3    Výskyt.....	14
3.5.4    Význam a využití bifidobakterií.....	15
<b>3.6 Izolace a identifikace .....</b>	<b>16</b>
3.6.1    Obecná média pro kultivaci bifidobakterií .....	16
3.6.2    Média pro izolaci z gastrointestinálního traktu .....	17
3.6.3    Média pro izolaci z mléčných výrobků.....	19
<b>4 Metodika.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Testované výrobky .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Substrátové preference .....</b>	<b>22</b>
4.2.1    API 50 CHL.....	22
4.2.2    ANAERObtest 23 .....	23
<b>4.3 Kultivační média pro stanovení bifidobakterií.....</b>	<b>24</b>
4.3.1    Wilkins - Chalgren agar se sojovým peptonem a mupirocinem .....	25
4.3.2    Základní médium s přísávkem mupirocinu .....	25
<b>4.4 Mikrobiologický rozbor.....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Identifikace bifidobakterií .....</b>	<b>27</b>
4.5.1    Identifikace bifidobakterií.....	27
4.5.2    Mikroskopická kontrola .....	27
4.5.3    Fruktoso-6-fosfátový test (F6PPK) .....	27
4.5.4    Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	28
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>31</b>



5.1	Výběr selektivních médií.....	31
5.2	Kvantifikace rodu <i>Bifidobacterium</i> z výrobků .....	31
5.3	Porovnání testovaných médií .....	32
5.4	Identifikace izolátů pomocí PCR.....	33
6	Diskuse .....	37
7	Závěr .....	39
8	Seznam literatury.....	40
9	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	47
10	Samostatné přílohy .....	48
10.1	Příloha 1: Fermentační profily druhů rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	48

# 1 Úvod

Rod *Bifidobacterium*, řadící se mezi probiotické kultury, spolu s rodem *Lactobacillus*, *Lactococcus* nebo *Enterococcus* je přirozeným obyvatelům gastrointestinálního traktu, kde se nachází více než 2000 rodů bakterií. Bakterie rodu *Bifidobacterium* mají schopnost adherovat na střevní epitel a díky tomu tak snáze přežívat v trávicím traktu. Většina těchto bakterií žije v tlustém střevě, kde vytváří specifickou mikroflóru, která má příznivé účinky na zdraví hostitele, například tím, že zabraňuje nebo alespoň potlačuje růst hnilobných bakterií.

Bohužel se zde ale nemnoží, a proto je nutné, je do těla stále dodávat. Ale například u novorozenečných dětí jsou bifidobakterie v trávicím traktu hojně zastoupeny. S přibývajícím věkem se však jejich počty snižují a ve stáří mohou výjimečně i vymizet, z toho důvodu se bifidobakteriální kultury přidávají do potravin, jako jsou jogurty, kde se již přirozeně vyskytuje jako součást jogurtové kultury *Lactobacillus delbrueckii* susp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Nevýhodou těchto bakterií je fakt, že ne všechny jsou schopny procházet trávicím traktem ve vitálním stavu. Důvodem je, že ne všechny se dokážou přizpůsobit průchodu žaludkem, kde je velmi kyselé prostředí a stejně tak se přizpůsobit i silně zásaditému prostředí ve střevě.

Bifidobakteriální kultury se používají i ve formě potravních doplňků, což je v dnešní době velmi populární. Proto je důležité umět je kvantifikovat, stejně tak jako jasně a selektivně stanovit.

## 2 Cíl práce

Cílem této práce bylo vyvinout metody, jak selektivně stanovit druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve* v potravních doplňcích.

**Hypotéza:** Budou nalezeny selektivní faktory (specifické sacharidy, antimikrobiální látky), které umožní růst pouze některým druhům rodu *Bifidobacterium* na kultivačním médiu.

### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Funkční potraviny

Jako funkční potravina je označena potravina, která má kromě výživové hodnoty, ještě jinou, zdraví prospěšnou funkci, jako je účinek na zdraví konzumenta nebo jeho fyzický a duševní stav (Thanh-Sang Vo a Se-Kwon Kim, 2012).

Mezi funkční potraviny tak můžeme řadit potraviny původu čistě přírodního, potraviny fortifikované nebo potraviny s obohacující funkční složkou (Guo, 2009). Aby se efekt projevil, je třeba tyto potraviny konzumovat dlouhodobě, jako běžnou součást našeho denního jídelníčku, některé dokonce celoživotně (Shortt a O'Brien, 2004). Jako nejpoužívanější funkční složky jsou uváděny rostliny, obsahující fenolické chemikálie, probiotika, prebiotika a houby. Zároveň ale i peptidy, mlezivo, vaječný žloutek (Galland, 2013), kyselina listová, antioxidanty, fytosteroly a vápník (Vlková et al., 2009).

**Tabulka 1: Doba konzumace funkčních potravin, po níž se dá očekávat jejich přínos (podle Erbersdobler, 2002, upraveno)**

Prevence chorob	Účinné složky	počátek účinku		
		Krátkodobý (týdny)	Střednědobý (měsíce, roky)	Dlouhodobý (20-30 let)
<b><u>Srdečně cévní</u></b>				
Prevence	peptidy			+
Prevence	fytoosteroly			+
Prevence	probiotika	+	+	+
Prevence	kyselina listová			+
Prevence	antioxidanty			není jisté
Snížení krevního tlaku	peptidy	+		
Snížení krevního cholesterolu	např. fytosteroly	+		
Snížení krevních triacylglycerolů	probiotika	+	+	+
	n-3 mastné kyseliny	+		
<b><u>Rakovina</u></b>	antioxidanty			+
<b><u>Osteoporóza</u></b>	vápník, fytoestrogeny			+

Epidemiologické a randomizované klinické studie, které byly prováděny v různých zemích, prokázaly nebo alespoň navrhly, řadu zdravotních účinků souvisejících s funkčními potravinami, respektive jejich složkami. Ukázalo se, že mají vliv na některé pochody

v organismu, jako je například snížení rizika rakoviny, osteoporózy, srdečně - cévních chorob, gastrointestinálních chorob, zmírnění příznaků menopauzy, snížení krevního tlaku, udržení zdravých močových cest, antibakteriální a antivirovou činnost. Přírozně ovlivňují fyzický a duševní stav a zpomalují proces stárnutí. Tyto efekty funkčních potravin mohou být uváděny na obalech výrobků, což už se dnes objevuje častěji, než dříve (Grajek et al., 2005). Galland (2013) uvádí, že mezi nejčastěji zmiňované příznivé vlastnosti funkčních potravin patří: imunomodulace, hypolipidemie, protizánětlivé a ergogenní účinky.

Na dobrý zdravotní stav gastrointestinálního traktu má vliv mimo jiné i vláknina. Je to polysacharid, který je odolný vůči trávení a vstřebávání v horní části trávicího traktu (Slavin, 2008). Institute of Medicine – Washington (2002) doporučuje denní příjem vlákniny ve výši 14 g/1000 kcal. Ale například pro děti je toto doporučení nevhodné.

Doporučený příjem vlákniny pro děti se obvykle pohybuje pod 10g/den (Svačina et al., 2008), ačkoli horní hranice pro její příjem dána není. Na druhou stranu nadměrný příjem vlákniny může vyvolat nežádoucí gastrointestinální symptomy (Grabitske a Slavin, 2009). Doporučení pro její příjem je založen na důkazech, které poukazují na snížení výskytu kardiovaskulárních onemocnění a snížení tělesné hmotnosti v prospektivní kohortové studii (Tucker a Thomas, 2009). Mechanismus snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění je myšlenka, která je založena na snížení sérového cholesterolu, opožděném vstřebávání živin (zvýšená citlivost na inzulín a snížení triglyceridů), snížení krevního tlaku a účinku fytochemikálií, které cestují s vlákninou. Vyšší příjem vlákniny je také vázán na snížení krevního tlaku, zlepšení cukrovky a zlepšení stavu střev. Mechanismus pro dopad na tělesnou hmotnost, je méně jasný, ale může jít o složité interakce s hormonálními účinky (nižší postprandiální glykémie, snížení sekrece inzulínu), účinky samotné potraviny (žvýkání, nasycení) a střevními efekty, např. fermentace (Pereira a Ludwig, 2001).

**Tabulka 2: Příklady funkčních potravin (Anonym 1)**

<b>Příklady funkčních potravin</b>	
<b>Potravina</b>	<b>Účinek</b>
Fermentovaná mléka a jogurty s probiotickými kulturami	Zlepšení zažívacích funkcí
Margariny, jogurty, sýrové pomazánky	Rostlinné steroly a stanoly snižují hladinu cholesterolu a riziko srdečních chorob
Vejce obohacená omega-3 esenciálními mastnými kyselinami	3 - 4 vejce za týden dodají tělu takové množství n-3 mastných kyselin, které je doporučováno pro snížení rizika srdečních chorob.
Snídaňové cereálie	Přídavek kyseliny listové může snížit riziko narození dětí se spina bifida (vrozený rozštěp páteře)
Chléb, tyčinky typu müsli	Přídavek isoflavonů může snížit riziko vzniku rakoviny prsu a prostaty, srdečních chorob a osteoporózy

### 3.1.1 Legislativa a historie funkčních potravin

O funkčních potravinách se mezi experty, zabývajícími se výživou, začalo hodně mluvit na začátku 90. let, kdy ILSI (International Life Science Institute) přišla s projektem FUFOS (Functional Food Science in Europe), který představila Evropské komisi. Tento projekt využil znalostí asi 100 expertů na výživu, kteří se zabývali vědeckým zdůvodněním zdravotních tvrzení a hodnotili status funkčních potravin. Tento projekt trval zhruba 3 roky a v roce 1999 došlo pod vedením ILSI k diskusi evropských expertů na výživu, která vedla k přijetí konsensu „Scientific Concepts of Functional Foods in Europe," který přinesl pracovní definici pro funkční potraviny. Ta zahrnovala několik hlavních bodů, které definovaly, jak vypadá funkční potravina. Tyto body říkají, že to není tableta ani kapsle nebo jiná forma doplňku, ale že se jedná o běžnou potravinu. Dále, že její příznivý účinek na lidské zdraví musí být založen na vědeckém základě. Kromě výživové hodnoty musí mít příznivé účinky na lidské zdraví, měla konzumovat jako součást běžné stravy. Dodnes ale v ČR, ani EU, neexistuje žádný oficiální dokument, který by „funkční potraviny" definoval a uváděl pravidla a podmínky pro jejich výrobu. Existuje však řada předpisů, které sice přímo neuvádějí pojem „funkční potravina," ale s potravinami tohoto druhu úzce souvisejí. Jedná se především o předpisy, které se týkají označování potravin. Každá „funkční potravina" obsahuje na obalu jedno nebo více zdravotních tvrzení, která informují spotřebitele o příznivých účincích potraviny nebo její složky na lidský organismus (Anonym 2).

### **3.1.2 Rozdíl mezi potravinami pro zvláštní výživu a potravními doplňky**

Z vyhlášky o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití 54/2004 Sb. v platném znění, vyplývá, že „potraviny pro speciální výživu jsou potraviny, které se odlišují od běžných potravin buď svým zvláštním složením, nebo zvláštním výrobním postupem. Jsou vhodné pro výživové účely stanovené vyhláškou nebo přímo použitelným předpisem Evropského společenství. Při uvádění do oběhu musí být označen účel použití“ (Anonym 3).

#### **Výživové účely se stanovují podle zvláštních nutričních požadavků:**

- skupin osob, jejichž trávicí proces nebo látková přeměna je narušená, nebo
- skupin osob majících zvláštní fyziologický stav a které mohou mít specifické výhody z řízení spotřeby určitých látek v potravinách, nebo
- zdravých kojenců a malých dětí.

#### **Mezi druhy potravin určených pro zvláštní výživu patří tyto:**

- potraviny pro počáteční a pokračovací kojeneckou výživu a výživu malých dětí
- potraviny pro obilnou a ostatní výživu jinou než obilnou určenou pro výživu kojenců a malých dětí
- potraviny pro nízkenergetickou výživu určené ke snižování tělesné hmotnosti
- potraviny pro zvláštní lékařské účely
- potraviny bez fenylalaninu
- potraviny bezlepkové
- potraviny určené pro osoby s poruchami metabolismu sacharidů (diabetiky)
- potraviny s nízkým obsahem laktosy nebo bez laktosy
- potraviny s nízkým obsahem bílkovin
- potraviny určené pro sportovce a pro osoby při zvýšeném tělesném výkonu.

Doplňek stravy je podle zákona č. 110/1997 Sb. v platném znění o potravinách, definován jako „potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu, která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci a je určena k přímé spotřebě v malých, odměřených množstvích“ (Anonym 4).

### 3.1.3 Rozdíl mezi léky a funkčními potravinami

Lék je podle zákona č. 378/2007 Sb. v platném znění o léčivech definován jako „látka nebo kombinace látek mající léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě lidských onemocnění“ (Anonym 5).

Na druhé straně je z výzkumu známo, že funkční potraviny by měly poskytovat zdravotní výhody vyšší než normální nutriční hodnoty v denním dietním schématu, ale neměly by léčit. Ověřování rozsahu funkčních potravin, jejich vztahu k potravinám a lékům je zatím stále zkoumáno (Kwak a Jukes, 2000).

Diplock et al. (1999) uvádí, že vzhledem k tomu, že Evropská unie zatím žádnou legislativu, týkající se funkčních potravin, která by měla jednotný rámec, nevytvořila, je nutné, aby legislativně bylo vymezeno hlavně, jaké potraviny mohou být označeny jako funkční, co může být deklarováno na obalech (schválené zdravotní přínosy), jaké složky a v jakém obsahu jsou ve funkční potravíně obsaženy.

## 3.2 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelnou složkou potravin, která prospěšně ovlivňuje selektivní stimulaci růstu nebo aktivity jednoho či omezeného počtu bakterií v tlustém střevě, a tím zlepšuje zdraví hostitele (Gibson a Roberfroid, 1995).

Využívání prebiotik bylo odstartováno zejména kvůli problémům při používání probiotik. Některé probiotické mikroorganismy mají potíže přežít při průchodu žaludkem, případně tenkým střevem a následně pak osídlit střevo tlusté. To zejména kvůli velké konkurenci přirozené mikroflóry tlustého střeva (Roberfroid, 2002).

Jakákoliv potravina nebo substrát, který vstoupí do tlustého střeva, je potenciální prebiotikum. Hlavním substrátem v tlustém střevě, který umožňuje růst bifidobakterií, jsou oligosacharidy. Jsou odolné vůči trávicím enzymům, ale mohou být metabolizovány bakteriemi. Mezi oligosacharidy užívané jako prebiotikum, které byly zveřejněny po *in vitro* a *in vivo* studiích patří laktulosa, inulin, oligosacharidy ze sóji (rafinosa a stachyosa), isomaltooligosacharidy, glukooligosacharidy a xylooligosacharidy (Gibson a Fuller, 2000).



**Oligosacharidy plnicí funkci prebiotik musí splňovat tato kritéria (Roberfroid, 2007):**

- 1) odolnost vůči žaludeční kyselosti, odolnost vůči hydrolýze savčími enzymy a vůči gastrointestinální absorpci
- 2) fermentace intestinální mikroflórou
- 3) selektivní stimulace růstu a/nebo aktivity střevních bakterií, které přispívají ke zdraví a pohodě

**Tabulka 3: Prebiotický efekt různých oligosacharidů (podle Roberfroid, 2007, upraveno)**

	<b>Nestravitelnost</b>	<b>Fermentace</b>	<b>Selektivita</b>	<b>Status prebiotik</b>
<b>Inulin a oligofruktosa</b>	ano	ano	ano	ano
<b>Galaktooligosacharidy</b>	pravděpodobně	PV	ano	ano
<b>Laktulosa</b>	pravděpodobně	PV	ano	ano
<b>Isomaltooligosacharidy</b>	částečně	ano	spíš ano	ne
<b>Laktosacharosa</b>	ND	ND	spíš ano	ne
<b>Xylooligosacharidy</b>	ND	ND	spíš ano	ne
<b>Sojové oligosacharidy</b>	ND	ND	ND	ne
<b>Glukosacharidy</b>	ND	ND	ND	ne

ND- nedostupná data, PV- předběžné výsledky, nutný další výzkum

Hlavními konečnými produkty bakteriální fermentace v tlustém střevě jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem, jako je kyselina octová, propionová nebo máselná (Kvasničková, 2000).

Nesmějí však mít nežádoucí účinky jako je nadýmání, vyvolávání břišních křečí či dokonce průjmů. Tyto jevy jsou charakteristické, např. pro rafinosu, stachyosu a další příbuzné, méně zastoupené oligosacharidy v luštěninách (Kalač, 2002).

Pokud nestravitelný sacharid podporuje růst veškeré střevní mikroflóry tlustého střeva, působí, jako tzv. „colonic food“, což je v podstatě potrava pro tlusté střevo (Kvasničková, 2000).

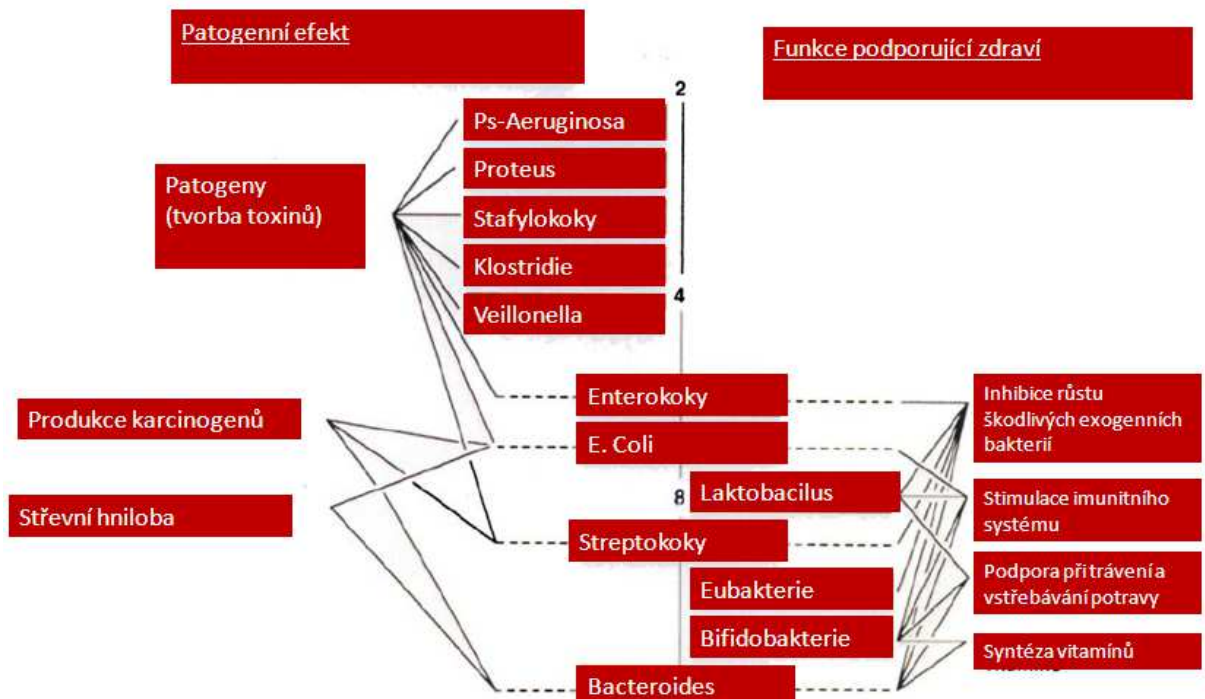
## Zdravotní přínosy schváleny EU Register on nutrition and health claims (anonym 6):

- Vlákna: zrychluje průchod tráveniny střevem  
zlepšuje funkce střev  
zvětšuje objem stolice
- Pektiny: při příjmu 10g v potravě redukují postparandiální glykemickou odpověď
- Chitosan: při příjmu 3g denně snižuje LDL cholesterol

## Kalač (2002) uvádí že:

- selektivní růst žádoucích bifidobakterií v tlustém střevě, tím se zároveň znevýhodňují potenciální patogenní bakterie, především klostridia
- snížení energetického příjmu na základě toho, že se dané látky nevstřebávají v tenkém střevě, ale podléhají až fermentaci na těkavé mastné kyseliny ve střevě tlustém. Ty mají nízkou energetickou hodnotu (<9 kJ/g)
- zvětšují objem stolice, klesá výskyt zácpy, údajně již při příjmu 3 - 10g nestravitelných oligosacharidů denně.

Obrázek 1: Koncepte prebiotik (podle Roberfroid, 2007, upraveno)



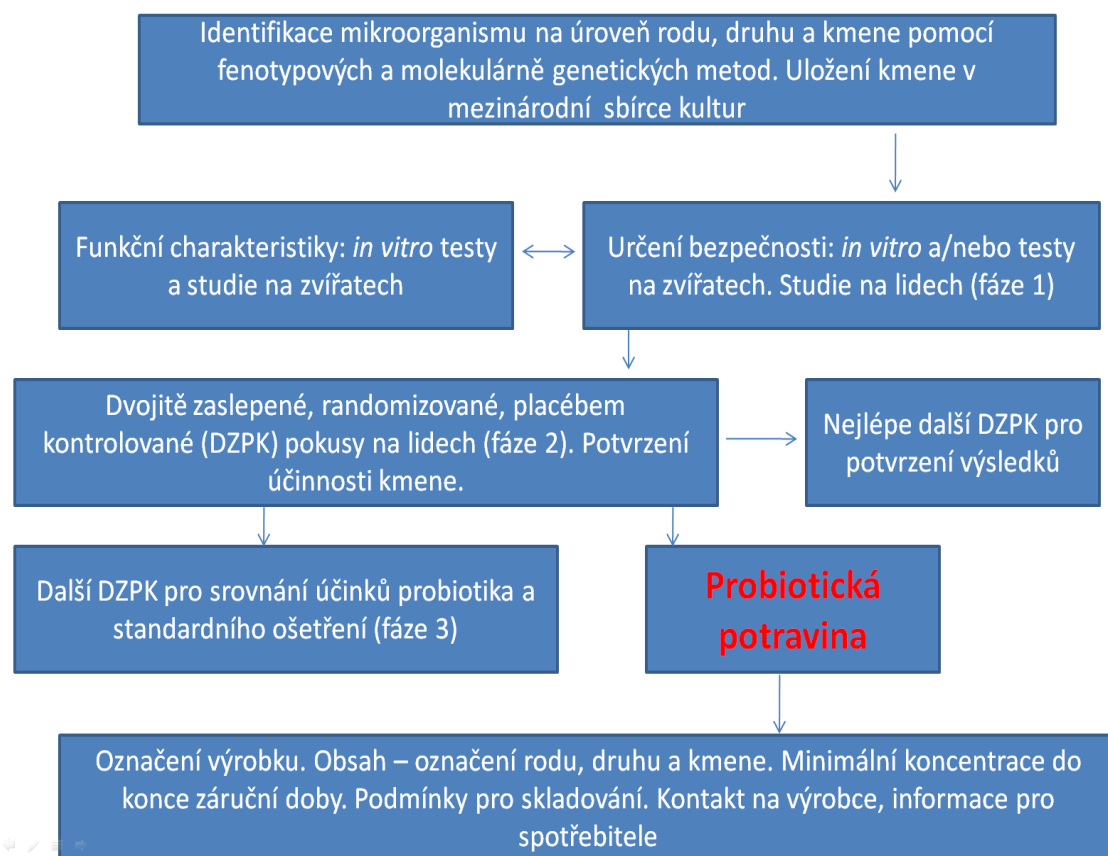
### 3.3 Probiotika

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v přiměřeném množství, přinášejí hostiteli zdravotní přínos (FAO/WHO, 2002).

Podle Havennaara (1992) se probiotika definují jako mono nebo směsné kultury živých organismů, které jestliže se aplikují člověku nebo zvířeti, tak prospěšně ovlivňují jeho hostitele zlepšením jeho střevní mikroflóry.

Zdravotní tvrzení uvedená ve vztahu k probiotickým mikroorganismům v potravinách se podle prohlášení Kanadského parlamentu řídí podsekcí 5(1) Food and Drug Act a měla by být vědecky ověřená. Food and Drug Act říká následující: „Žádná osoba nesmí označit, balit, léčit, zpracovat, prodávat nebo propagovat jakékoli potraviny způsobem, který je nepravdivý, zavádějící, klamavý nebo je pravděpodobné, že může vytvořit chybný dojem o charakteru, hodnotě, kvalitě, složení, nebo bezpečnosti potraviny“ (Anonym 7).

Obrázek 2: Schéma hodnocení probiotik pro použití v potravinách (podle FAO/WHO, 2002, upraveno)



Konzumace probiotik je spojována s řadou zdravotních přínosů, z nichž některé se považují za prokázané, jiné za pravděpodobné (Kalač, 2002). V řadě studií bylo prokázáno, že probiotické kultury stabilizují ekosystém střev (Kvasničková, 2000). EFSA dosud ale žádnému probiotiku zdravotní tvrzení neschválila, vyjma živých jogurtových kultur (*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*), kde říká, že živé kultury v jogurtu nebo kysaném mléčném výrobku zlepšují trávení laktosy u jedinců, kteří mají s trávením laktosy problémy (Anonym 6). Výroba probiotik se proto řídí předpisy pro potraviny (Rada, 2010).

**Z nejčastěji zveřejňovaných zdravotních přínosů jsou uváděny tyto:**

- tlumení alergií
- imunostimulační účinky
- prevence kolorektálního karcinomu
- zmírnění zácpy
- podpůrná terapie zánětlivých střevních onemocnění a průjmů
- ustavení či obnovení vyvážené mikroflóry tlustého střeva (Rada, 2010)
- snížení hladiny krevního celkového a LDL cholesterolu, čímž se podílí na prevenci srdečně-cévních onemocnění (Roberfroid, 2000)
- snížení výskytu infekce způsobené bakterií *Helicobacter pylori*
- snížení příznaků alergií
- příznivý efekt na metabolismus minerálů, zejména pak na hustotu a stabilitu kostí (Schrezenmeir a de Vrese, 2001).

### **3.4 Synbiotika**

Synbiotikum je definováno jako směs prebiotik a probiotik. Podporují přežívání a usídlení dodaných bakterií gastrointestinálním traktem tím, že selektivně stimulují růst nebo aktivují metabolismus jednoho druhu bakterie nebo omezeného počtu bakterií podporujících zdraví, čímž pozitivně působí na hostitele (Meile, 1998).

### 3.5 Rod *Bifidobacterium*

#### 3.5.1 Charakteristika

Rod *Bifidobacterium* jsou grampozitivní bakterie s pleomorfním tyčkovitým tvarem, katalasa negativní vyjma *Bifidobacterium asteroides* a *Bifidobacterium indicum* (Biavati a Mattarelli, 2012). Jsou to tyčky nepohyblivé, nesporotvorné a nesnášející příliš kyselé prostředí (Görner a Valík, 2004).

Rod *Bifidobacterium* jsou striktními anaeroby, ale díky přítomnosti CO<sub>2</sub> dokáží krátkou dobu kyslík tolerovat. Méně senzitivní kmeny mají nepatrnou schopnost tvořit katalasu. Bifidobakterie fermentují cukry odlišným způsobem než homo i heterofermentativní bakterie. Důvodem je nepřítomnost glukózo – 6 - fosfátdehydrogenasy a aldolázy (Maxa a Rada, 1996). Díky enzymu fruktózo – 6 - fosfoketolasy se fruktózo – 6 - fosfát štěpí na acetylfosfát a erytroso – 4 – fosfát, viz obrázek 3. Fosfolytické štěpení pyruvátů na kyselinu mravenčí a acetyl fosfát a redukce acetyl fosfátu na etanol často změň fermentační rovnováhu ve prospěch produkce acetátů a částečně kyseliny mravenčí a etanolu (Biavati a Mattarelli, 2012). Neprodukují CO<sub>2</sub>, kyselinu máselnou ani propionovou.

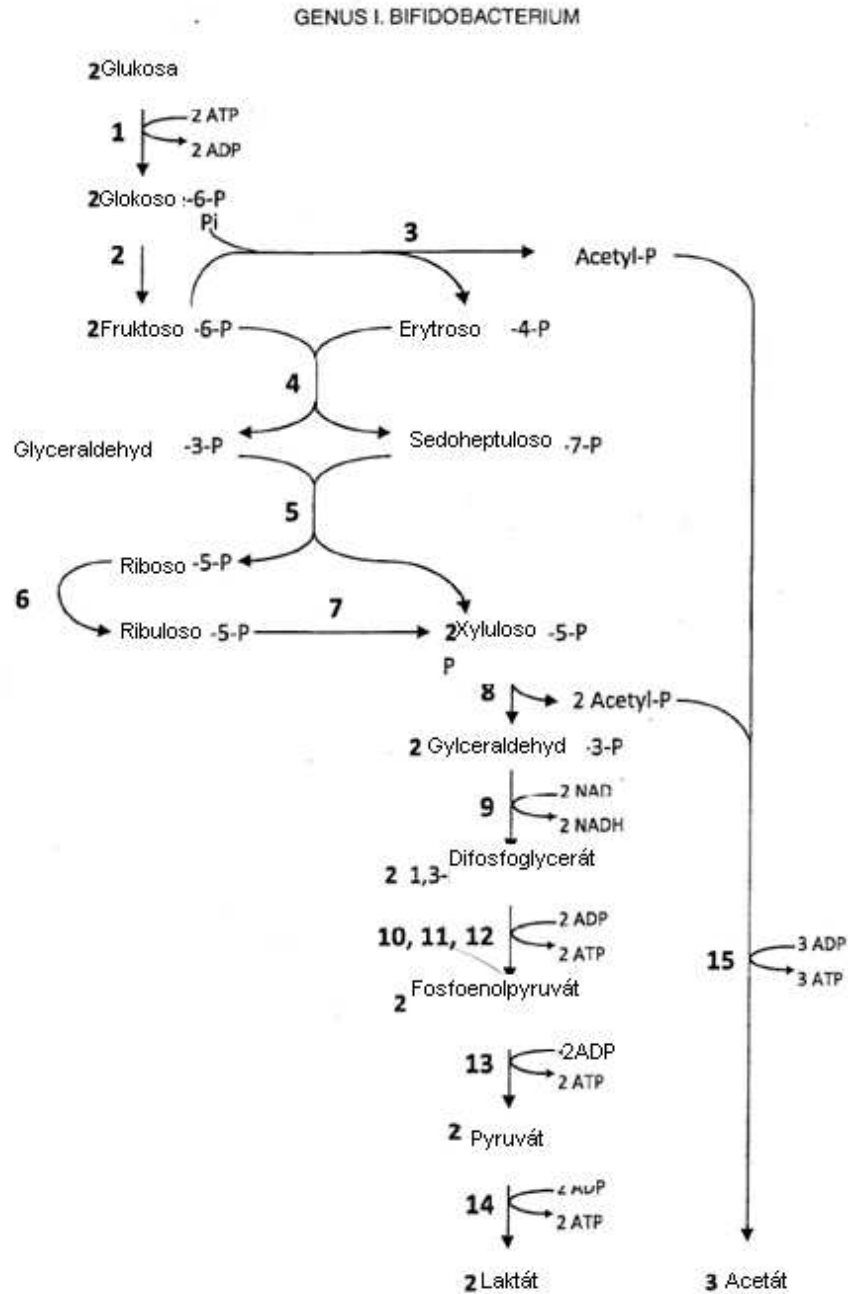
Hlavními produkty fermentace jsou kyselina octová a kyselina mléčná v poměru 3:2. Kyselina mléčná je převážně v L formě a je tudíž snadno metabolizovatelná dětským organismem (Maxa a Rada, 1996).

Za anaerobních podmínek vznikající H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inaktivuje klíčový enzym fermentace cukrů bifidobakterií – F6PPK (Rašić a Kurman, 1983). Optimální teplota růstu je 37 – 41 °C, jsou to tedy bakterie mezofilní, minimální teplota pro růst je 25 – 28 °C. Optimální pH je 6,5 až 7. Při pH 4,5 - 5 a 8 - 8,5 nerostou s výjimkou *Bifidobacterium thermacidophilum*, které roste při pH 4,5 (Biavati a Mattarelli, 2012).

Rod *Bifidobacterium* se dříve spolu s členem rodu *Lactobacillus* uváděly, že náleží mezi bakterie mléčného kvašení, a to i přes to, že jsou fylogeneticky nepříbuzné. To však už neplatí. Rod *Bifidobacterium* tvoří vlastní specifickou skupinu. Patří do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales*, čeledi *Bifidobacteriaceae* a rodu *Bifidobacterium*. Do stejné třídy patří například řád *Actinomycetales*, pod který patří čeledi *Actinomycetaceae*, *Micrococcaceae* nebo *Streptomycetaceae* (Sedláček, 2007). Evoluční

vztahy mezi bakteriemi mléčného kvašení byly stanoveny porovnáním zejména sekvence genu pro 16S rRNA (Ventura et al., 2003).

Obrázek 3: Metabolismus hexos (podle Biavati a Mattarelli, 2012, upraveno)



1, Hexokinasa (EC 2.7.1.2); 2, Glukoso-6-fosfát isomerasa (EC 5.3.1.9); 3, Fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa (EC 4.1.2.22); 4, Transaldosa (EC 2.2.1.2); 5, Transketolasa (EC 2.2.1.1); 6, Riboso-5-fosfát isomerasa (EC 5.3.1.6); 7, Ribuloso-5-glyceraldehyd-3-fosfát epimerasa (EC 4.1.2.9); 8, Xyluloso-5-fosfát fosfoketolasa (EC 4.1.2.9); 9, Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (EC 1.2.1.12); 10, Fosfoglycerát kinasa (EC 2.7.2.3.); 11, Fosfoglycermutasa (EC 5.4.2.1); 12, Enolasa (EC 4.2.1.11); 13, Pyruvát kinasa (EC 2.7.8.1.40); 14, Laktát dehydrogenasa (EC 1.1.1.27); 15, Acetát kinasa (EC 2.7.2.1).

### 3.5.2 Vlastnosti

Podstatnou vlastností prospěšných bakterií, jako jsou bifidobakterie, je schopnost adherovat na střevní epitel. Navázáním bifidobakterií na povrch střevních stěn se stimuluje jejich obnovování. Mechanismus vazby není zatím zcela vyjasněn (Maxa a Rada, 1996).

### 3.5.3 Výskyt

Bifidobakterie jsou obyvatelé trávicího traktu drobných i velkých zvířat. Nejvyšší počty jsou nalézány ve výkalech kojenců, kde se nachází převážně druhy *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum*. Zatímco u dospělých se nacházejí hlavně druhy *Bifidobacterium adolescentis* a *Bifidobacterium longum*. U telat a kuřat dominuje *Bifidobacterium pseudolongum*. U selat se po narození vyskytuje především *Bifidobacterium pseudolongum* a později pak *Bifidobacterium thermophilum*, který byl rovněž izolován z trávicího traktu prasat, telat a kuřat (Mitsuoka, 1984).

**Tabulka 4: Původ druhů rodu *Bifidobacterium* (podle Russell et al., 2011, upraveno)**

Druh	Poprvé identifikována z	Izoloval
<i>B. actinocoloniiforme</i>	trávicí trakt čmeláka stolice dospělých lidí, bachor skotu, odpadní voda a lidská	Killer et al. (2010a)
<i>B. adolescentis</i>	vagína	Reuter (1963)
<i>B. angulatum</i>	odpadní voda, stolice dospělých lidí	Scardovi and Crociani (1974)
<i>B. animalis</i>		
susp. <i>Animalis</i>	výkaly zvířat	Scardovi and Trovattelli (1974)
susp. <i>lactis</i>	jogurt	Meile et al. (1997)
<i>B. asteroides</i>	trávicí trakt včely medonosné	Scardovi and Trovattelli (1969)
<i>B. bifidum</i>	výkaly dospělých lidí a kojenců, lidská vagína	Orla-Jensen (1924)
<i>B. bohemicum</i>	trávicí trakt čmeláka	Killer et al. (2010a)
<i>B. boum</i>	bachor skotu, výkaly selat	Scardovi et al. (1979)
<i>B. bombi</i>	trávicí trakt čmeláka	Killer et al. (2009b)
<i>B. breve</i>	stolice kojenců a telat na mléčné výživě, lidská vagína, odpadní vody	Reuter (1963)
<i>B. catenulatum</i>	stolice kojenců a dospělých lidí, odpadní vody	Scardovi and Crociani (1974)
<i>B. choerinum</i>	výkaly selat a odpadní vody	Scardovi et al. (1979)
<i>B. coryneforme</i>	trávicí trakt včely medonosné	Biavati et al. (1982)
<i>B. crudilactis</i>	syrové mléko, sýry ze syrového mléka	Delcenserie et al., 2007
<i>B. cuniculi</i>	výkaly králíků	Scardovi et al. (1979)
<i>B. dentium</i>	lidský zubní kaz a dutina ústní, stolice dospělých lidí, zánět a slepé střevo	Scardovi and Crociani (1974)
<i>B. gallicum</i>	lidská stolice	Lauer (1990)
<i>B. gallinarum</i>	slepé střevo kuřete	Watabe et al. (1983)
<i>B. indicum</i>	trávicí trakt včely medonosné	Scardovi and Trovattelli (1969)
<i>B. infantis</i>	stolice kojenců a telat na mléčné výživě	Reuter (1963)
<i>B. longum</i>		

subsp. <i>longum</i>	stolice dospělých lidí	Reuter (1963)
subsp. <i>infantis</i>	stolice kojenců	Reuter (1963)
subsp. <i>suis</i>	výkaly selat	Matteuzzi et al. (1971)
<i>B. magnum</i>	výkaly králíků	Scardovi and Zani (1974)
<i>B. merycicum</i>	bachor skotu	Biavati and Mattarelli (1991)
<i>B. minimum</i>	odpadní vody	Biavati et al. (1982)
<i>B. mongoliense</i>	výrobky z kysaného kobyliho mléka z Mongolska	Watanabe et al. (2009)
<i>B. pseudocatenulatum</i>	stolice kojenců	Scardovi et al. (1979)
<i>B. pseudolongum</i>	stolice kojenců a telat na mléčné výživě, odpadní vody	Yaeshima and Fujisawa (1992)
subsp. <i>pseudolongum</i>	výkaly prasat, kuřat, býků, telat, krys a morčat	Mitsuoka (1969)
	výkaly telat, krys, králíků, jehňat, odpadní vody a bachor	
subsp. <i>globosum</i>	přežvýkavců	Biavati et al. (1982)
<i>B. psychraerophilum</i>	výkaly prasat	Simpson et al. (2004)
<i>B. pullorum</i>	výkaly kuřat	Trovatelli et al. (1974)
<i>B. ruminantium</i>	bachor skotu	Biavati and Mattarelli (1991)
<i>B. saeculare</i>	výkaly králíků	Biavati et al. (1991)
<i>B. scardovii</i>	lidská krev	Hoyles et al. (2002)
<i>B. stercoris</i>	lidská stolice	Kim et al. (2010)
<i>B. subtile</i>	odpadní vody	Biavati et al. (1982)
<i>B. thermacidophilum</i>	odpadní vody z anaerobního fermentoru	Dong et al. (2000)
subsp. <i>theracidophilum</i>		
<i>B. thermophilum</i>	výkaly selat	Mitsuoka (1969)
subsp. <i>porcinum</i>		
<i>B. tsurumiense</i>	zubní plak křečka	Okamoto et al. (2008)

### 3.5.4 Význam a využití bifidobakterií

Bifidobakterie jsou probiotické mikroorganismy, které jsou široce používány v potravinářském průmyslu (Miranda et al., 2011).

Největší význam mají bifidobakterie u kojených nebo i uměle přikrmovaných novorozenců. Trávicí trakt novorozeného dítěte je prakticky sterilní. První mikroflóra se dostane do zažívacího traktu při průchodu vaginou během porodu a dále s prvními kapkami mateřského mléka - kolostra nebo s prvními dávkami umělé směsi. U kojených dětí se předpokládá, že mateřské mléko zajistí svým vhodným složením osídlení intestinálního traktu bifidobakteriemi (Modler et al., 1990). Později počet bifidobakterií ve střevě klesá a začínají dominovat anaerobní bakterie rodů *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Faecalobacterium* a *Peptostreptococcus*, přičemž doplňkovou mikroflóru tvoří laktobacily, enterokoky, koliformní a ostatní bakterie. V pozdějším věku tvoří bifidobakterie jen 5 - 10% z celkové střevní mikroflóry (Mitsuoka, 1990). Složení mikroflóry trávicího traktu zdravých lidí, při správné životosprávě, bývá konstantní. Kardinální změna může nastat především při léčbě antibiotiky, sulfonamidy a dalšími chemoterapeutickými léky, ozařováním, stresy,



a také stárnutím, kdy se přirozeně oslabuje imunitní systém člověka. Výsledkem působení těchto faktorů pak bývá zvýšení počtu bakterií v tenkém střevě, zvláště pak enterokoků, enterobakterií a klostridií, zatímco bifidobakterie jsou redukovány nebo zcela zmizí. Nepřítomnosti bifidobakterií v trávicím traktu člověka indikuje jeho nenormální stav a pravděpodobně i zdravotní problémy (Maxa a Rada, 1996).

Uvádí se, že v prvním vývojovém období je ve střevě zdravých dětí 90% bifidobakterií z celkového počtu bakterií (Molder et al., 1990).

Bylo prokázáno, že střevní mikroflóra reguluje ukládání tuku v těle a že poruchy v jeho složení mohou vést k rozvoji určitých metabolických onemocnění. Bifidobakterie se nalézají v trávicím traktu (GIT) a na základě jejich metabolické aktivity bylo prokázáno, že příznivě ovlivňují lidské zdraví. Uvádí se, že inhibují kolonizaci střeva patogenními mikroorganismy a mají antikarcinogenní, imunostimulační a antiprůjmové vlastnosti. Stejně tak jako pomáhají při zmírnění nesnášenlivosti na laktosu a mají schopnost snížit hladinu cholesterolu v krvi (Russell et al., 2011).

### **3.6 Izolace a identifikace**

#### **3.6.1 Obecná média pro kultivaci bifidobakterií**

Živné půdy pro bifidobakterie jsou užitečné pro rutinní stanovení počtu bifidobakterií (Roy, 2001). Pro izolaci a stanovení počtu bifidobakterií v přirozeně se vyskytujících prostředích bylo navrženo velké množství médií. Přidávky zahrnují mateřské mléko, rajčatový džus, jaterní nebo masový extrakt a různé peptony. Navíc byla přidávána antibiotika a další přísady, aby bylo docíleno větší selektivity - kanamycin, neomycin, kyselina propionová, chlorid lithný, rafinosa, propionát sodný, paramomycin (Biavati a Mattarelli, 2012).

V následující tabulce je uvedeno porovnání nejvíce používaných agarů a jejich složek.

Tabulka 5: Složení agarů používaných ke stanovení bifidobakterií (podle Rada a Maxa, 2002, upraveno)

INGREDIENCE	OZNAČENÍ AGARU - množství v g·l <sup>-1</sup>				
	BL agar a BS složky	TPY	modif. TPY dle Maxy	MRS	modifikovaný MRS
Ověř defibrinovaná krev	50				
Masový extract	2,4			8	
Pepton (Proteose)	10			10	10
Pepton	5		5		
Sójový pepton (Phytone)	3	5	5		
Kvasničný extrakt (autolyzát)	5				
Játrový extrakt	3,2				
Trypton		10			
Enzymatický hydrolyzát kaseinu			5		
L-cystein hydrochlorid	0,5	0,5	0,5		0,5
Glukosa	10	5	5	20	20
Rozpustný škrob	0,5				
Octan sodný				5	5
Citran amonný				2	2
FeCl <sub>3</sub>		Stopy	Stopy		
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0,25	0,25		
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O		0,5			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	2	2	2	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1				
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1		0,5	0,2	0,2
NaCl	0,01				
MnSO <sub>4</sub>	0,007			0,05	0,05
CaCl <sub>2</sub>		0,15	0,15		
Tween 80 (ml)	1	1	1	1	1
Odpěňovací látka	0,2				
Agar	15	15	15	15	13 – 15
BS složka na 1l BL agaru					
Propionát sodný	15				
Paromomycin sulfát	0,05				
Neomycin sulfát	0,2				
Chlorid litný	3				
pH	6,8	6,5	6,5	6,4	6,9 -7,0

### 3.6.2 Média pro izolaci z gastrointestinálního traktu

V roce 1991 Henri Beerens provedl studii, ve které chtěl dosáhnout rozvoje v oblasti selektivních médií pro rod *Bifidobacterium*. Jako základní použil Columbia médium (Pasteur Production), které doplnil o glukosu (5 g/l), cystein hydrochlorid (0,5 g/l) a agar (5 g/l). Finální koncentrace agaru byla 15 g/l a pH 7,3. Jako další médium v této studii byl použit

Brain Heart bujón (BioMérieux) doplněn o kvasničný extrakt (5 g/l) a cystein hydrochlorid (0,5 g/l). Toto médium bylo následně upraveno na finální pH, které je 7,2. Abychom dosáhli tuhé podoby tohoto média je potřeba přidat agar (20 g/l). K docílení selektivity těchto médií, byla přidána kyselina propionová, která byla přidána jak do agaru, tak do bujónu v koncentraci 5 až 10 ml/l, pH bylo upraveno na 5 použitím 1N NaOH. Tato média se nemusí sterilovat.

Tamime et al. v článku z roku 1995 uvádí jako další z médií, která se používají pro izolaci z gastrointestinálního traktu Rogosa agar s přídavkem 5 – bromo – 4 – chloro – 3 - indol –  $\beta$  – D – glukopyranosidu (40  $\mu$ g/ml) a upravený MRS agar s přídavkem neomycin sulfátu (100 mg/l), nalixidové kyseliny (15 mg/l) a lithium chloridu (3 g/l).

Rada a Petr (2002) použili TPY agar doplněný o mupirocinu (100 mg/l) a ledovou kyselinu octovou (1 ml/l). Toto médium (MTPY agar) bylo účinné pro stanovení počtu bifidobakterií ve výkalech zvířat (11 druhů). Na druhé straně, méně než 50% izolátů z prasečích výkalů bylo identifikováno jako *Bifidobacterium* sp. pomocí tohoto média. Proto byl MTPY agar doplněn o kolistin (25 mg/l). Výsledky naznačují, že selektivní média pro bifidobakterie by měla být vybírána podle původu a druhu testovaných vzorků.

Tato kombinace se používá též s Wilkins - Chalgren agarem (Bunešová et al., 2012). V roce 2002 byla provedena studie, která sledovala populaci rodu *Bifidobacterium* na výkalech sajících selat. Jako média byla použita RB agar (Raffinose - *Bifidobacterium*), který se skládal z propionátu (15 g/l), lithium chloridu (3 g/l), který byl v médiu použit jako inhibiční látka, rafinosy, jako zdroje uhlíku (7,5 g/l) a kaseinu (5g/l), jako zdroje proteinů (Hartemink, 1996). Dále pak modifikovaný WS agar (Wilkins - Chalgren) a Beerens agar. Ukázalo se, že tato média nejsou příliš selektivní pro rod *Bifidobacterium* ve výkalech selat. Největší výskyt rodu *Bifidobacterium* byl prokázán na WS agaru (Mikkelsen et al., 2002).

**Tabulka 6: Seznam kmenů bifidobakterií použitých ve výše popsané studii (podle Rada a Petr, 2002, upraveno)**

Kmeny:	Původ:
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Fermentované mléčné kysané výrobky
<i>B. asteroides</i>	Trávicí trakt včely
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29 521
<i>B. bifidum</i>	CCM 3762
<i>B. breve</i>	ATCC 15 700
<i>B. infantis</i>	ATCC 17 930
<i>B. longum</i>	ATCC 15 707
<i>B. longum</i> 1	Dětská stolice
<i>B. longum</i> 2	Dětská stolice
<i>B. pseudolongum</i>	Fermentované mléčné kysané výrobky
<i>B. pseudolongum</i>	Slepé střevo králíka
<i>Bifidobacterium sp.</i>	Výkaly telete
<i>Bifidobacterium sp.</i>	Slepé střevo nosnice
<i>Bifidobacterium sp.</i>	Vole nosnice

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, USA

CCM = Czech Collection of Microorganisms, Brno,

### 3.6.3 Média pro izolaci z mléčných výrobků

Bifidobakterie se běžně používají pro výrobu fermentovaných mlék, samostatně nebo v kombinaci s jinými bakteriemi mléčného kvašení. Populace bifidobakterií ve fermentovaném mléce by měly být přes  $10^6/g$  do konce záruční doby výrobku. Proto jsou potřeba rychlé a spolehlivé metody k rutinnímu určení počáteční očkovací látky a odhadnutí skladovacího času, po který zůstávají bifidobakterie životaschopné. Desková kultivační metoda je stále preferována při měření kvality v mléčných výrobcích. Je proto nutné, mít médium, které selektivně podporuje růst bifidobakterií, zatímco ostatní bakterie jsou potlačeny (Roy, 2001). V roce 1998 byla provedena studie, která testovala 6 selektivních médií a 2 diferenciální. Bylo zjištěno, že je nesmírně obtížné, při výskytu směsné kultury, oddělit jeden druh bifidobakterií od druhého. Jako nejvýhodnější pro rutinní stanovení bifidobakterií od směsných kultur v mléce se po této studii jevil AMC agar (Payne et al., 1998).

Z velkého počtu dostupných selektivních médií by mohlo být vyvozeno, že neexistuje žádné standardní médium pro detekci bifidobakterií. Přesto Columbia agar, základní médium doplněné o lithium chlorid a propionát sodný a MRS médium, doplněné o neomycin,

paramomycyn, nalidixovou kyselinu a lithium chlorid, mohou být doporučeny pro selektivní stanovení bifidobakterií v mléčných výrobcích (Roy, 2001).

V dnešní době se podle normy pro mléčné výrobky ISO 29981 jako médium pro stanovení počtu bifidobakterií uvádí TOS - MUP médium. Médium obsahuje transgalactosylované oligosacharidy a mupirocin. Toto médium je selektivní.

Od roku 2013 je na české trhu dostupné nové médium, BSM - Agar (Sigma - Aldrich). Toto médium umožňuje selektivní výčet bifidobakterií v mléčných výrobcích pomocí techniky počítání kolonií za anaerobních podmínek. BSM (Bifidus selective medium) je k dispozici jako agar nebo jako bujon. Toto médium obsahuje přidanou barevnou reakci, která upozorňuje na přítomnost kolonií rodu *Bifidobacterium*. Toto médium se používá pro rychlou a snadnou kontrolu kvality mléčných výrobků (Anonym 8).

**Tabulka 7: Složení TOS média**

Pepton z kaseinu	10 g/ l
Kvasničný autolyzát	1,0 g/ l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g/ l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,8 g/ l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,0 g/ l
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g/ l
L-cystein HCl . H <sub>2</sub> O	0,5 g/ l
Propionát sodný	15 g/ l
Galaktooligosacharid TOS	10 g/ l
Pepton z kaseinu	15 g/ l
Voda	950ml
pH..... 6,7	

## 4 Metodika

### 4.1 Testované výrobky

Celkem bylo testováno 10 probiotických výrobků českých i zahraničních firem. Výrobky byly skladovány v ledničce ve formě zatavených sáčků nebo kapslí při teplotě 4 °C. Všechny výrobky byly testovány před koncem expirační doby. V tabulce číslo 1 je uveden podrobný seznam výrobků a v tabulce číslo 2 jsou uvedeny výrobcem deklarované druhy bifidobakterií.

Tabulka 8: Výrobci

Název výrobku:	Výrobce:	Expirační doba:	Testováno:
Adult dophilus	Harmonium International Inc, Kanada	I.13	XI.11
Children dophilus	Harmonium International Inc, Kanada	VII.12	I.12
Liftea probioactiv s vitamínem B	Biomedica s.r.o., ČR	VI.13	II.12
Dětská Liftea	Biomedica s.r.o., ČR	I.13	I.12
Biopron Premium	Valosun a. s., ČR	IX.13	III.12
BiopronValosun	Valosun a. s., ČR	XI.12	IV.12
Biopron Junior	Valosun a. s., ČR	IX.13	VIII.12
APO - Baby Probio	CELL BIOTECH EUROPE A/S, Dánsko	VIII.12	V.12
APO – lactobacillus 10+	CELL BIOTECH EUROPE A/S, Dánsko	XII.12	X.12
APO – lactobacillus ATB	CELL BIOTECH EUROPE A/S, Dánsko	III.13	XI.12

Tabulka 9: Deklarované druhy rodu *Bifidobacterium*

Název výrobku:	Deklarované druhy bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> :
Adult dophilus	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Children dophilus	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Liftea probioactiv s vit. B	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Dětská Liftea	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Biopron Premium	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
BiopronValosun	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Biopron Junior	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>
APO - Baby Probio	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>
APO - lactobacillus 10+	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
APO - lactobacillus ATB	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>

Stanovení počtu životaschopných anaerobních bakterií bylo prováděno metodou *in vitro*. Byla použita různá selektivní agarová média pro kultivaci bakterií rodu *Bifidobacterium*. Jednalo se o média pro stanovení celkového počtu *Bifidobacterium* sp., tedy

o detekci všech druhů tohoto rodu. Dále pak byla na základě substrátových preferencí jednotlivých druhů připravena média pro selektivní kvantifikaci druhů *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*. Jejich substrátové preference byly zjištěny díky provedení testů API 50 CHL (BioMérieux, Francie) a ANAEROTestu 23 (Erba - Lachema, ČR) na sbírkových kmenech a dalších, již identifikovaných izolátech ze sbírky KMVD.

## 4.2 Substrátové preference

### 4.2.1 API 50 CHL

API 50 CHL (BioMérieux, Francie) je standardizovaný systém 50 biochemických testů určených k bakteriální identifikaci pomocí fermentačních profilů mikroorganismů.

#### Postup:

Penicilínka nebo zkumavka s narostlou kulturou byla asepticky slita do zkumavky určené k centrifugaci. Vzorek byl odstředěn po dobu 3 min při 9000 g. Poté byl vzorek slit a sediment byl opláchnut 0,5 ml fosfátového pufru a znovu byl slit. Sediment byl důkladně promíchán injekční stříkačkou o objemu 1ml v 0,5 ml fosfátového pufru a opět byl odstředěn na 3 min při 9000 g. Když byl vzorek odstředěn, byl odstraněn supernatant a následně byl vzorek propláchnut v 0,5 ml fosfátového pufru. Poté byl vzorek znovu slit. Sediment byl důkladně promíchán v 1 ml fosfátového pufru a natáhnut do 1ml injekční stříkačky. Vzniklý roztok byl kapán do suspenzního média (5 ml) s cílem získat 2. zákalový stupeň zákalu dle McFarlandovy zákalové stupnice. Počet kapek, které byly nakapány do média, byl vynásoben dvakrát, a toto množství bylo aplikováno do média (10 ml) pro kit API 50 CHL. Složení média je uvedeno v následující tabulce. Poté byl test anaerobně uzavřen do anaerostatu inkubován 48 hodin při teplotě 37 °C.

**Tabulka 10: Složení média pro API 50 CH**

Suspenzní médium 2 a 5 ml	demineralizovaná voda
API 50 CHL médium 10 ml	Polypepton - 10 g
	Kvasničný autolyzát - 5 g
	Tween 80 - 1 ml
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 2 g
	CH <sub>3</sub> COONa. 5 H <sub>2</sub> O - 5 g
	Diamonium citrát - 2 g
	MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O - 0,20 g
	MgSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O - 0,05 g
	Bromkresolová červeň - 0,17 g
	Demineralizovaná voda 100 ml

#### Vyhodnocení:

Vyhodnocení bylo provedeno dvakrát, po 24 hodinách a po 48 hodinách. Do speciálních formulářů byla zapisována čísla od 0 do 3, podle stupně a barvy zákalu substrátu.

Vyhodnocení reakce bylo provedeno následujícím způsobem:

- 0 → negativní reakce (fialové zbarvení)
  - 1 → negativní reakce (zelenofialové zbarvení)
  - 2 → pozitivní reakce (zelenožluté zbarvení)
  - 3 → pozitivní reakce (žluté zbarvení)
- Esculin - pozitivní reakce je zbarvena do černa

#### **4.2.2 ANAEROTest 23**

ANAEROTest 23 (Erba - Lachema, Česká republika) je test, který se využívá k identifikaci anaerobních bakterií, vyskytujících se nejčastěji v klinickém materiálu a v potravinách.

#### Postup:

Do ependorfeek bylo odměřeno 2 ml kultury a bylo odstředěno při 14500 g po dobu 3 minut. Poté byl obsah slit a opláchnut v 0,5 ml fosfátového pufru, který byl po opláchnutí vyliť. Dále bylo přidáno 2 ml nového fosfátového pufru, promícháno pomocí injekční



stříkačky a nakonec opět odstředěno. Následně bylo odebráno 1 ml fosfátového pufru do injekční stříkačky a následně bylo vše promícháno s odstředěnou kulturou, která byla po promíchání natažena spolu s fosfátovým pufrem zpět do injekční stříkačky.

Podle McFarlandovy stupnice byl vytvořen 3. zákalový stupeň a poté byl sterilní stříkačkou po kapkách aplikován na destičky anaerotestu. Nakonec byl přidán parafínový olej, který zabraňuje úniku plynů během kultivace. Anaerostat byl následně anaerobně uzavřen a kultivován při 37 °C po dobu 48 hodin.

Při vyhodnocení bylo zakápnuto do poslední jamky v Anaerotestu 23 látkou indol a nitráty.

### Vyhodnocení:

Vyhodnocovalo se po 24 a 48 hodinách do speciálního formuláře na základě barevných změn podle předlohy pomocí znamének plus a mínus. Plus znamená pozitivní reakci a mínus negativní. U esculinu je pozitivní černé zbarvení.

**Tabulka 11: Tabulka pro vyhodnocování Anaerotestu 23 (Anonym 9)**

1		H	G	F	E	D	C	B	A
	+	IND	GSI	MIT	FRU	GAL	LAC	MIZ	URF
	-								
2		H	G	F	E	D	C	B	A
	+	IND	SUC	SAL	TRF	MAN	RHA	NAG	LGL
	-								
3		H	G	F	E	D	C	B	A
	+	ESL	MNS	SAP	CEL	XYL	ABA	SOR	COH
	-								

### 4.3 Kultivační média pro stanovení bifidobakterií

Konkrétně se jednalo o modifikovaný Wilkins - Chalgren agar (Oxoid) s mupirocinem (Bunešová et al., 2012) a základní médium (viz tabulka 12) s mupirocinem a s přidavkem různých zdrojů uhlíku. Pro stanovení celkového počtu bifidobakterií byl použit Wilkins - Chalgren agar s mupirocinem, pro stanovení rodu *Bifidobacterium bifidum* MM agar (mucin + mupirocin), pro stanovení rodu *Bifidobacterium breve* byl použit SMM agar (sorbitol, mupirocin, manitol), kde jako zdroj uhlíku byly použity sacharidy sorbitol a manitol. Pro stanovení rodu *Bifidobacterium longum* bylo nejdříve testováno médium MMe (mupirocin, melecitosa), kde jako zdroj uhlíku byl použit sacharid melecitosa a následně pak

MT agar (mupirocin, turanosa), kde jako zdroj uhlíku byla použita turanosa. Podrobné složení použitých médií je uvedeno v následující kapitole.

#### 4.3.1 Wilkins - Chalgren agar se sojovým peptonem a mupirocinem

Toto médium bylo použito pro kultivaci celkového počtu rodu *Bifidobacterium*.

##### Příprava:

Doporučené množství agaru (43 g/l), 5 g/l sojového peptonu, 5 g/l cysteinu a 1 g/l tween 80 bylo rozmícháno v destilované vodě, rozvařeno a sterilováno po dobu 60 minut, při teplotě 110 °C. Poté byl agar umístěn do vodní lázně a vytemperován na 48 °C. Po vytemperování byl přidán mupirocin (50 mg/l).

Tabulka 12: Složení média Wilkins - Chalgren

Kasein	10 g/ l
Želatina	10 g/ l
Kvasničný autolyzát	5,0 g/ l
Chlorid sodný	5,0 g/ l
Dextrosa	1,0 g/ l
L- arginin	1,0 g/ l
Pyruvát sodný	1,0 g/ l
Hemin	0,005 g/ l
Vitamin K	0,0005 g/ l
Agar	15 g/ l
pH 7,1 ± 0,2 při 25 °C	
Sojový pepton	5 g/ l
Mupirocin	50 mg/ l

#### 4.3.2 Základní médium s přidavkem mupirocinu

Jako základní médium bylo použito médium se složením uvedeným v tabulce číslo 13. Toto médium bylo použito pro kultivaci bakterií rodu *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve*. Pro kultivaci každého rodu byl použit jiný zdroj uhlíku.

**Tabulka 13: Složení základního média**

Trypton	5,0 g/ l
Živný bujón	5,0 g/ l
Kvasničný autolyzát	2,5 g/ l
Tween 80	0,5 ml/ l
Cystein	0,25 g/ l
Technický agar	10 g/ l
*Zdroj uhlíku:	a) 20 g/ l
a)Mucin	b) 10g/ l
b)Melecitosa/Turanosa/Sorbitol+Manitol	
pH.....7,4	
Bromkresolová červeň (1 % roztok v etanolu)	1 ml/ l
Mupirocin	50 mg/ l

\*Při mucinu - selektivní pro *B.bifidum*, při melecitose a turanose - selektivní pro *B. longum*, při sorbitolu a manitou - selektivní pro *B. breve*

#### 4.4 Mikrobiologický rozbor

Bylo naváženo 1g výrobku a rozpuštěno v 9 ml bujónu (trypton 5 g/l, živný bujón 5 g/l, kvasničný autolyzát 2,5 g/l, tween 80 0,5 ml, cystein 0,25 g/l, pH 7). Byla vytvořena ředící řada desítkovým způsobem, vždy podle množství bifidobakterií uvedeného na příbalovém letáku, standardně ale od  $10^{-1}$  do  $10^{-9}$ . Poté bylo aplikováno 0,5 ml roztoku z příslušného ředění na Petriho misky a přelito určeným médiem. Anaerobní bakterie byly poté kultivovány v anaerostatu s katalyzátorem (Oxoid, HP 11) a v atmosféře  $\text{CO}_2/\text{H}_2$  (20 % : 80 %) při 37 °C po dobu zhruba 48 hodin. Po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie a vybrané kolonie z nejvyšších ředění vyizolovány do živého bujónu, který se nechal inkubovat při 37 °C po dobu 24 hodin.

## 4.5 Identifikace bifidobakterií

### 4.5.1 Identifikace bifidobakterií

Po anaerobní kultivaci bylo z každého média vyizolováno 6 kolonií z nejvyšších ředění. Byly asepticky vypíchnuty sterilní kličkou z agaru do bujónu (sojový pepton 5 g/l, cystein 0,5 g/l, tween 80 1 ml/l). Vzorky byly kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.

### 4.5.2 Mikroskopická kontrola

Po inkubaci byl vzorek prohlédnut pod světelným mikroskopem (Nikon 104 C), aby se zjistilo, zda není kontaminován, a byla ověřena morfologie bakterií. Rod *Bifidobacterium* jsou nepravidelné tyčinky a jejich morfologie je vlastnost, která napomáhá při jejich identifikaci.

### 4.5.3 Fruktoso-6-fosfátový test (F6PPK)

Rodová identifikace bifidobakterií byla provedena pomocí testu na detekci enzymu fruktoso – 6 - fosfoketolasy (F6PPK - test).

#### Činidla:

- 1) Fosfátový pufr - 0,36 g  $K_2 HPO_4$  ; 0,10 g  $KH_2 PO_4$  ; 0,15 g cysteinu, 300 ml destilované vody; pH 6,5
- 2) 120 mg NaF; 200 mg Na-indoacetátu, 20 ml destilované vody
- 3) 4,17 g hydroxylaminu; 30 ml destilované vody; pH upravit na 6,5 pomocí 2 ml 40 % NaOH
- 4) 3 g TCA; 20 ml destilované vody
- 5) 2,48 ml HCl; 17,52 ml destilované vody
- 6) 1 g  $FeCl_3$  ; 62  $\mu$ l koncentrované (35 %) HCl; 20 ml destilované vody
- 7) 290 mg fruktoso – 6 - fosfátu; 5,5 ml destilované vody

#### Postup:

Narostlé kultury byly přelity do zkumavek, které jsou určeny k centrifugaci a byly doplněny  $H_2O$ , aby byl objem zkumavek stejný. Poté byly při 20 °C při 9000 g po dobu 8 minut stočeny. Následně byl slit supernatant a sediment byl opláchnut a rozmíchán roztokem číslo 1. Bylo přidáno 0,2 ml CTAB a byly kultivovány 5 min. při pokojové teplotě. Potom bylo přidáno 0,125 ml činidla č. 2 a 0,2 ml roztoku F6PPK a vše bylo promícháno. Zkumavky byly umístěny do vodní lázně na dobu 30 minut, kde byly při teplotě 37 °C inkubovány.

V dalším kroku bylo přidáno 0,750 ml činidla č. 3, kterým byla zastavena enzymatická reakce. Následně byly opět 10 minut inkubovány při pokojové teplotě. Jako poslední bylo přidáno 0,5 ml činidel č. 4 a 5 pro okyselení a 0,5 ml činidla č. 6 pro vytvoření barevné reakce.

#### Vyhodnocení:

Na základě barevné změny byly vzorky vyhodnoceny. Pozitivní reakce se projeví fialovým zbarvením, které je tvořeno komplexní sloučeninou, která má absorpční maximum při 505 nm (Biavati a Mattarelli, 2012). Negativní reakce se projeví žlutým zbarvením.

#### **4.5.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Identifikace jak na rodovou, tak na druhovou úroveň byla provedena pomocí metody PCR s použitím specifických primerů. K této identifikaci bylo potřeba vyizolovat bakteriální DNA.

#### Izolace DNA:

Do 1,5 ml ependorfy bylo napipetováno 1ml čistých, narostlých kultur bifidobakterií. Poté bylo vše odstředěno při 14500 g po dobu 3 minut. Obsah ependorfy byl následně slit a bylo přidáno 100 µl PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystem) a vše promícháno pipetou. Tato ependorfka byla následně umístěna do termobloku (typ Ependorf, Německo), kde byla zahřívána po dobu 10 minut na teplotu 99 °C. Potom byla zchlazena na pokojovou teplotu a opět odstředěna na 3 minuty při 14500 g. Nakonec bylo z vrchu odpipetováno 50 µl supernatantu do nové ependorfy.

#### Příprava PCR reakce:

PCR směs (1 vzorek, 25µml):

- 1) 12,5 µl DRAM Tack Green Muster Mix
- 2) 9,5 µl H<sub>2</sub>O (Fermentas)
- 3) 1 µl primer 1
- 4) 1 µl primer 2
- 5) DNA/ vzorek

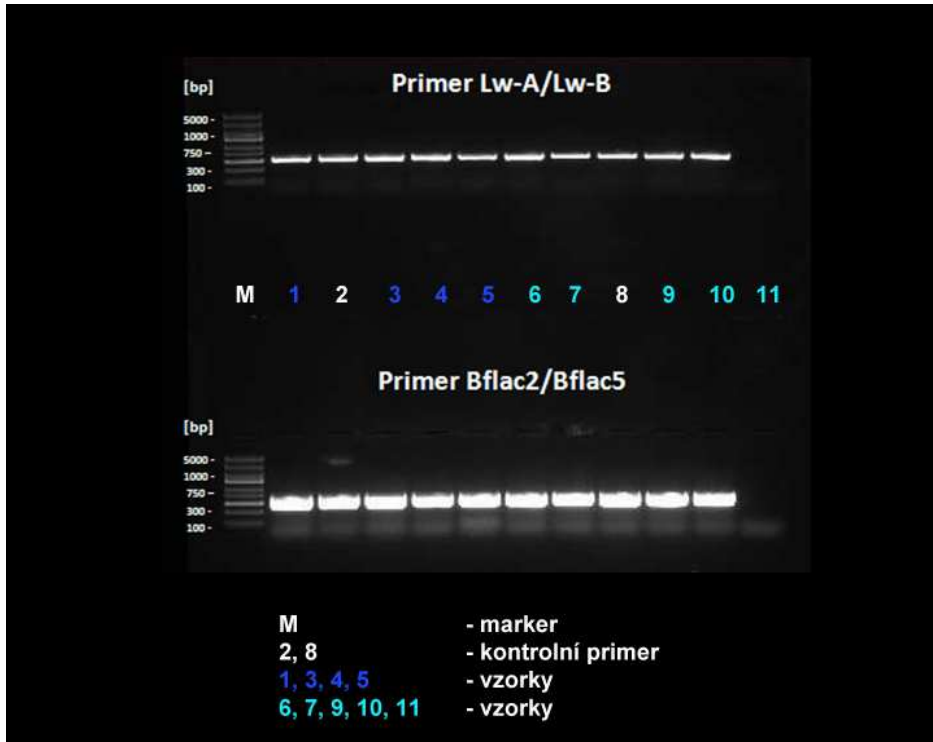
**Tabulka 14: Seznam specifických primerů pro rod *Bifidobacterium***

Druhy	Primer	Nukleotidová skvence (Matsuki et al., 2003; Mayer et al., 2007)	Annealingová teplot (°C)	PCR produktt (bp)
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bif162	GGGTGGTAATGCCGGATG	59	523
	Bif662	CCACCGTTACACCGGGAA		
<i>B. bifidum</i>	BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	59	278
	BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCAAA		
<i>B. breve</i>	BiBRE-1	CCGGATGCTCCATCACAC	57	288
	BiBRE-2	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT		
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	BiLON-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	59	831
	BiLON-2	GGGAAGCCGTATCTCTACGA		
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	BiINF-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	59	828
	BiINF-2	GGAAACCCCATCTCTGGGAT		
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	Bflac2	GTGGAGACACGGTTTCCC	64	680
	Bflac5	CACACCACACAATCCAATAC		
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	LW-1	GCACGGTTTCGGCCGTG	55	567
	LW-2	GGGAAACCGTGTCTCCAC		

#### Příprava gelu:

Pro přípravu gelu byl použit 50krát naředěný TAE PUFRR. Směs 100 ml TAE PUFRRU (složení: tris 242,3 g/l; EDTA – Na<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 18,6 g/l; kyselina sírová 60,05 g/l; ředěný 1:50) a 1g agarosy (Serva), vše bylo smícháno a následně umístěno na 3 minuty do mikrovlnné trouby. V průběhu 3 minut to bylo vše několikrát promícháno. Po vyjmutí bylo přidáno 5μl GelrRedu (Biotum) a bylo vpraveno do formy pro gel. Po ztuhnutí a vychlazení byl gel vložen do elektroforézy, která byla naplněná 50krát zředěným TAEpufrem. Do jednotlivých jamek v gelu byly nepipetovány vzorky (5 μl). Do první a poslední jamky byla nanášena srovnávací DNA – GeneRuller™ Express DNA Ladder (Fermentas) Poté byla elektroforéza puštěna na 50 minut při napětí 80 V. Následně byl vzorek vložen do zařízení (Biorad), které vizualizuje DNA fragmenty vzorků pomocí UV záření. Pozitivní reakce se projevila svítícím bandem.

Obrázek 4: PCR profil pod UV světlem



Tyto všechny přísady byly napipetovány v množství 24  $\mu$ l do ependorfeek. K tomu následně bylo přidáno 1  $\mu$ l DNA (pro rezervu bylo někdy přidáno 1,5  $\mu$ l). Daný vzorek byl řádně promíchán a vložen do termocykléru, který byl nastaven na daný primer. Pozitivní vzorky v UV světle zářily.

## 5 Výsledky

### 5.1 Výběr selektivních médií

Na základě informací o fermentačních profilech jednotlivých druhů rodu *Bifidobacterium*, které jsme získali z materiálů Wood a Holzapfel (1999) a biochemických testů, které jsme uskutečnili na KMVD, jsme zjistili, že *B. bifidum* pozitivně fermentuje laktosu, fruktosu, galaktosu, meliniosu a z 11 – 89 % fermentuje pozitivně i sukrosu. *B. longum* z 11- 89 % pozitivně fermentuje xylosu a manosu, 100 % pak L – arabinosu, rafinosu, D – ribosu, laktosu, melecitosu, fruktosu, galaktosu, sukrosu, maltosu a meliniosu. *B. breve* má podobný fermentační profil jako *B. longum*, liší se ale v pozitivní fermentaci manosy, salicinu a z 11 – 89 % pozitivní fermentace sorbitolu, inulinu, celobiosy, melecitosy, threosy a manitou, v ostatních pozitivně fermentujících cukrech se shodují.

Na základě těchto výsledků jsme zvolili složení konkrétního selektivního média. Fermentační profily jednotlivých druhů bifidobakterií jsou uvedeny v příloze.

### 5.2 Kvantifikace rodu *Bifidobacterium* z výrobků

Ke stanovení počtů bakterií rodu *Bifidobacterium* bylo využito 10 výrobků, které jsou dostupné v lékárnách či drogeriích. Bakterie byly kultivovány a kvantifikovány na 5 různých pěstebních prostředích.

V níže uvedené tabulce (tabulce číslo 15) jsou uvedeny počty vyrostlých kolonií z jednotlivých výrobků na konkrétních pěstebních prostředích. U 3 testovaných výrobků nevyrostly kolonie na žádném agaru nebo po následné izolaci a identifikaci bylo zjištěno, že se nejedná o rod *Bifidobacterium*. Jednalo se o výrobky APO - baby probio (Cell biotech Europe), APO – lactobacillus 10+ (Cell biotech Europe) a APO – lactobacillus ATB (Cell biotech Europe).

Po vyizolování kolonií byla provedena detekce na přítomnost enzymu F6PPK, která potvrdila u 7 zbývajících výrobků, že se jedná o bakterie rodu *Bifidobacterium*.



**Tabulka 15: Počty kolonií v jednotlivých výrobcích (log KTJ)**

		<b>Celkové počty</b>	<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. breve</i>
	<b>Výrobek:</b>	<b>WCh+MUP</b>	<b>MT</b>	<b>MM</b>	<b>MMe</b>	<b>SMM</b>
1	Adult dophilus	8,44 ± 0,14 <sup>a</sup>	9,08 ± 0,05 <sup>b</sup>	9,06 ± 0,03 <sup>c</sup>	8,97 ± 0,02 <sup>b</sup>	8,89 ± 0,08 <sup>a</sup>
2	Children dophilus	9,08 ± 0,08 <sup>b</sup>	*	9,54 ± 0,04 <sup>de</sup>	9,17 ± 0,06 <sup>c</sup>	X
3	Liftea probioactiv s vit. B	9,30 ± 0,19 <sup>c</sup>	9,69 ± 0,37 <sup>c</sup>	9,42 ± 0,15 <sup>d</sup>	*	X
4	Dětská Liftea	9,65 ± 0,01 <sup>d</sup>	*	9,58 ± 0,12 <sup>e</sup>	8,41 ± 0,06 <sup>a</sup>	X
5	Biopron Premium	9,47 ± 0,1 <sup>d</sup>	9,30 ± 0,19 <sup>bc</sup>	9,49 ± 0,06 <sup>de</sup>	*	9,43 ± 0,05 <sup>b</sup>
6	Biopron Valosun	8,27 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,30 ± 0 <sup>a</sup>	8,51 ± 0,13 <sup>b</sup>	*	9,31 ± 0,21 <sup>b</sup>
7	Biopron Junior	9,21 ± 0,02 <sup>bc</sup>	X	8,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	X	X
8	APO - Baby Probio	0	0	0	0	0
9	APO - lactobacillus 10+	0	0	0	0	0
10	APO - lactobacillus ATB	0	0	0	0	0
	<b>Průměr:</b>	<b>9,06 ± 0,09</b>	<b>9,09 ± 0,24</b>	<b>9,21 ± 0,08</b>	<b>8,85 ± 0,05</b>	<b>9,21 ± 0,11</b>

X - výrobek nedeklaroval *Bifidobacterium breve*; 0 - Nic nevyrostlo nebo se nejednalo o rod *Bifidobacterium*; \*- bylo využito jiné médium

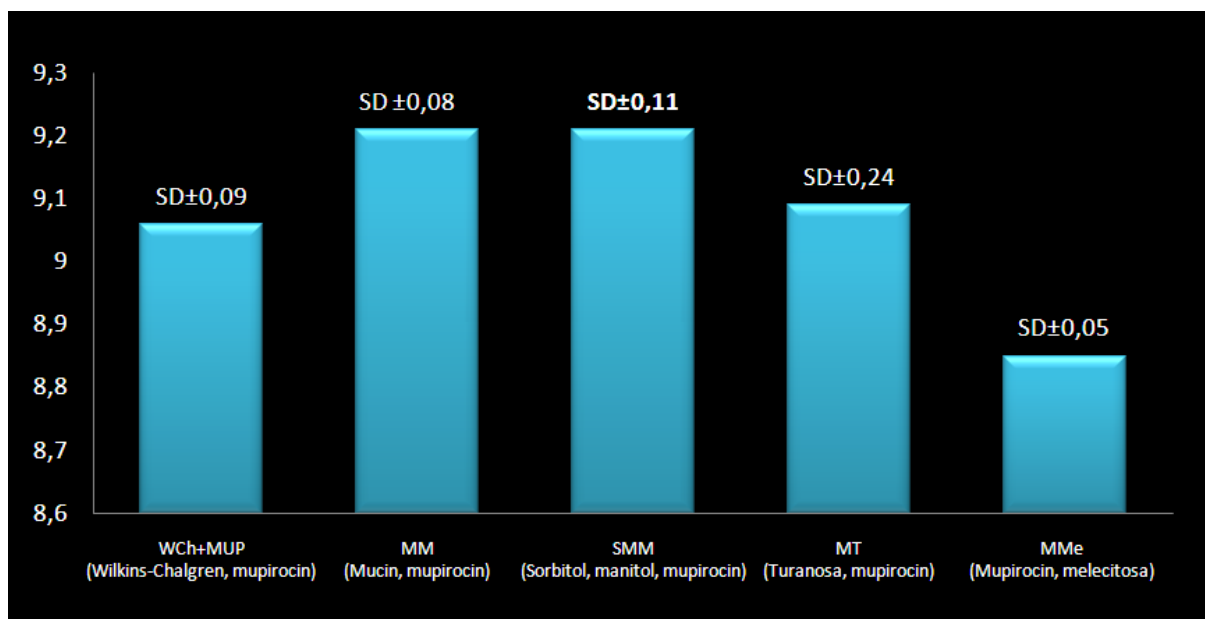
Všechny hodnoty jsou průměry (v log KTJ/g) ze tří měření ± SD.

Hodnoty ve sloupcích s různými indexy se statisticky významně liší (P < 0,005).

### 5.3 Porovnání testovaných médií

Průměrné počty kolonií na WCh (Wilkins - Chalgren) agaru byly 9,06 log KTJ ± 0,09 SD, na MT médiu 9,09 log KTJ ± 0,24 SD, na MMe médiu 8,85 log KTJ ± 0,05 SD, na MM 9,21 log KTJ ± 0,08 SD a na SMM médiu 9,21 log KTJ ± 0,11 SD. Z toho je zřejmé, že nejlépe rostly kolonie rodu *Bifidobacterium* na médiu SMM, které by mělo být zároveň selektivním médiem pro druh *Bifidobacterium breve* a MM médiu, které na tom bylo velmi podobně, hodnota log KTJ byla 9,21 ± 0,08 SD. Rozdíl byl tedy jen v SD. Počty kolonií na médiích MT a WCh byly podobné, jejich statistické hodnoty se příliš nelišily. Nejhuř ale kolonie rostly na MMe médiu, které bylo na začátku testování používáno jako selektivní médium pro druh *Bifidobacterium longum*. Grafické znázornění průměrných hodnot je uvedeno v grafu číslo 1.

Graf 1: Průměrné počty kolonií na různých médiích (log KTJ)



#### 5.4 Identifikace izolátů pomocí PCR

Pro podrobnější identifikaci bakterií byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR) za použití druhově specifických primerů. Tato metoda upřesnila, jaké bifidobakteriální druhy se nám podařilo vykultivovat na jednotlivých pěstebních prostředích.

V následující tabulce (tabulce číslo 16) jsou uvedené deklarované druhy bifidobakterií u testovaných výrobků a výsledky identifikace pomocí PCR. Z této tabulky je vidět, že ve výrobcích se objevují i jiné druhy rodu *Bifidobacterium*, než které výrobci deklarují na příbalových letácích, a zároveň, že druhy, které deklarované jsou, se často neobjevují. Naříklad u výrobků Liftea Dětská a Liftea ProbioActiv s vitamínem B, byl PCR potvrzen pouze výskyt *B. animalis* susp. *lactis*, který ale ve výrobku není vůbec deklarován, stejně tak u výrobku Biopron Junior. U výrobku Adult Dophilus se nám podařilo identifikovat všechny deklarované druhy, navíc se zde navíc objevilo *B. animalis* susp. *lactis*, a to s nejvyšším zastoupením. U výrobku Children Dophilus bylo identifikováno jak *B. bifidum*, tak *B. longum*, které by se podle výrobců mělo ve výrobku objevit v 15 %. Nám se ho podařilo identifikovat ve 39 % a ještě jsme navíc v tomto výrobku identifikovali také *B. animalis* susp. *lactis*. Výrobek Biopron Valosun deklaruje *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum*, nám se ale podařilo izolovat a identifikovat pouze *B. longum*, *B. bifidum* a namísto *B. breve* jsme identifikovali *B. animalis* susp. *lactis*.

Ani výrobek Biopron Premium v našem testu z hlediska deklarovaných druhů nedopadl nejlépe. Zde se nám podařilo identifikovat deklarované druhy *B. bifidum* a *B. longum*, a navíc ještě *B. animalis* susp. *lactis*.

**Tabulka 16: Deklarované druhy rodu *Bifidobacterium* ve výrobku versus výsledek PCR**

Název výrobku:	Deklarované druhy bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> :	Identifikované druhy pomocí PCR:
Adult Dophilus	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i>
Children Dophilus	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i>
Liftea ProbioActiv s vit. B	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i>
Dětská Liftea	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i>
Biopron Premium	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i>
BiopronValosun	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i>
Biopron Junior	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i>
APO - Baby Probio	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	X
APO - lactobacillus 10+	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	X
APO - lactobacillus ATB	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	X

X – z výrobku se nepodařilo izolovat a identifikovat bifidobakterie

Tabulka číslo 17 nám ukazuje, jaké druhy bifidobakterií rostly na konkrétním médiu. Vidíme tedy, že z celkového hlediska 100 % selektivní nebylo žádné. Na MM médiu narostlo u 3 výrobků ze 7 úspěšně otestovaných pouze *B. bifidum*. U 3 výrobků, Biopron Junior, Liftea ProbioActiv s vitamínem B a Dětská Liftea, na tomto médiu vyrostlo pouze *B. animalis* susp. *lactis* a u výrobku Biopron Premium se na MM médiu kromě *B. bifidum* objevilo dokonce i *B. longum*. Na MT médiu rostlo vždy buď *B. longum* a *B. animalis* susp. *lactis* společně nebo *B. animalis* susp. *lactis*. *B. longum* samotné se na MT médiu nepodařilo identifikovat ani jednou. Co se týče MMe média, tady se nám podařilo

identifikovat u jednoho výrobku pouze *B. longum*, a to u výrobku Children Dophilus, jinak byly výsledky různé. U výrobku Adult Dophilus se na MMe médiu objevilo *B. longum* společně s *B. bifidum* a u Dětské Liftea se nám podařilo identifikovat pouze *B. animalis* susp. *lactis*. Co se týče SMM média, tak to bylo testováno u 3 výrobků. U výrobku Adult Dophilus se osvědčilo 100 %, tedy identifikováno bylo pouze *B. breve*, v ostatních případech tomu bylo jinak. U výrobků Biopron Premium ani Biopron Valosun se nám *B. breve* identifikovat vůbec nepodařilo. Na SMM médiu u výrobku Biopron Premium jsme identifikovali *B. longum* a *B. bifidum*. U druhé zmiňovaného, tedy u výrobku Biopron Valosun, jsme identifikovali *B. bifidum*, *B. longum* a *B. animalis* susp. *lactis*.

Na WCh médiu podle očekávání rostly všechny 4 druhy, tedy *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve* i *B. animalis* susp. *lactis*.

**Tabulka 17: Identifikace bakterií rodu *Bifidobacterium* pomocí rodové PCR**

Výrobek (deklarované druhy)	Médium	F6PPK (+/-)	PCR identifikované kmeny (počet kmenů)
<b>Adult Dophilus</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> )	WCh	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (2); <i>B. bifidum</i> (1); <i>B. longum</i> (2); <i>B. breve</i> (1)
	MM	6/0	<i>B. bifidum</i> (6)
	MT	6/0	<i>B. longum</i> (4); <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (2)
	MMe	6/0	<i>B. longum</i> (5); <i>B. bifidum</i> (1)
	SMM	6/0	<i>B. breve</i> (6)
<b>Children Dophilus</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> )	WCh	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (1); <i>B. bifidum</i> (2); <i>B. longum</i> (1); <i>B. breve</i> (2)
	MM	6/0	<i>B. bifidum</i> (6)
	MMe	6/0	<i>B. longum</i> (6)
<b>Liftea ProbioActiv s vit. B</b> ( <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> )	WCh	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
	MM	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
	MT	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
<b>Dětská Liftea</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> )	WCh	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
	MM	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
	MMe	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
<b>Biopron Premium</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> )	WCh	6/0	<i>B. longum</i> (4); <i>B. bifidum</i> (2)
	MM	5/1	<i>B. bifidum</i> (4); <i>B. longum</i> (1)
	MT	6/0	* <i>B. longum</i> (5); <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (2)
	SMM	6/0	<i>B. longum</i> (4); <i>B. bifidum</i> (2)
<b>Boipron Valosun</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> )	WCh	6/0	<i>B. bifidum</i> (4); <i>B. longum</i> (1); <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (1)
	MM	6/0	<i>B. bifidum</i> (6)
	MT	6/0	* <i>B. longum</i> (5); <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (2)
	SMM	6/0	<i>B. bifidum</i> (3); <i>B. longum</i> (2); <i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (1)
<b>Biopron Junior</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> )	WCh	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
	MM	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
	MT	6/0	<i>B. animalis</i> susp. <i>lactis</i> (6)
<b>APO - Baby Probio</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> )	WCh	0/6	
	MM	0/6	
	SMM	0/6	
<b>APO - lactobacillus 10+</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> )	WCh	0/6	
	MM	0/6	
	MT	0/6	
	SMM	0/6	
<b>APO - lactobacillus ATB</b> ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> )	WCh	0/6	
	MM	0/6	
	MT	0/6	
	SMM	0/6	

\*Jednalo se pravděpodobně o kontaminaci, svítíl primer BLON i BLACT

## 6 Diskuse

V této práci jsem testovala 10 výrobků na 5 pěstebních prostředích. Cílem bylo otestování výrobků a snaha o vyvinutí selektivních médií pro jednotlivé druhy rodu *Bifidobacterium*.

Jednalo se o média WCh, MM, MT, MMe a SMM.

**Tabulka 18: Název média a příslušný druh rodu *Bifidobacterium***

Zkratka:		Druhy bifidobakterií:
WCh	Wilkins-Chalgren	CP
MM	Mupirocin, mucin	<i>B. bifidum</i>
MT	Mupirocin, turanosa	<i>B. longum</i>
MMe	Mupirocin, melecitosa	<i>B. longum</i>
SMM	Sorbitol, manitol, mupirocin	<i>B. breve</i>

Rada a Petr (2000) testovali média Wilkins - Chalgren agar (WCh; Oxoid) s přidáním ledové kyseliny octové (1 ml/l) a mupirocinu (100 mg/l) a upravený TPY agar (MTPY; ADSA, Španělsko) s ledovou kyselinou octovou (1 ml/l) a mupirocinem (100 mg/l) s cílem navržení selektivního média pro izolaci glukózu nefermentujících bifidobakterií z trávicího traktu. Kdy toto médium, MTPY, bylo shledáno jako vysoce selektivní a vhodné pro izolaci glukosu fermentujících i nefermentujících bifidobakterií. Tento modifikovaný agar byl úspěšně použit například pro izolaci a kvantifikaci bifidobakterií u telat (Vlková et al., 2010) a jehňat (Bunešová et al, 2011).

TPY agar není v současné době komerčně dostupný, z toho důvodu bylo toto médium nahrazeno médiem jiným. Jednalo se o Wilkins - Chalgren agar s mupirocinem doplněným o sojový 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 (1 ml/l). Toto médium použila Bunešová et al. (2012) například pro izolaci kmene *B. animalis* susp. *lactis* z gastrointestinálního traktu psů, a také z jogurtů.

V této bakalářské práci bylo pak toto médium použito pro stanovení celkového počtu bifidobakterií, kdy však nebyla do média přidávána kyselina octová. Kyselina octová se používá v případě izolace bifidobakterií z trávicího traktu, tedy ze stolice či výkalů zvířat, kde působí selektivně vůči ostatním přítomným bakteriím, které jsou citlivé na nízké pH. Námi testované probiotické doplňky obsahovaly kromě bifidobakterií také laktobacily a

probiotické koky (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* susp. *lactis*). Zde jako selektivní faktor působí právě mupirocin, tudíž není třeba dodávat ještě kyselinu octovou. Selektivita média byla zde potvrzena výsledky testu na detekci enzymu F6PPK. Médium WCh bylo shledáno jako plně selektivní pro rod *Bifidobacterium*.

Mucin, což je glykoprotein nacházející se v epitelových tkáních a ve značném množství i ve slinách (Andrianifahanana et al., 2006), je jediným zdrojem uhlíku pro druh *B. bifidum* (Crocian et al., 1994). Tento multifunkční glykoprotein měl zaručit, že MM médium bude díky jeho přidavku sloužit, jako selektivní médium právě pro druh *B. bifidum*. To se při našem testování bifidobakterií z probiotických doplňků potvrdilo jen u některých výrobků (Adult Dophilus, Children Dophilus, Biopron Premium, Biopron Valosun). Na MM agaru rostl i poddruh *B. animalis* susp. *lactis* (Liftea ProbioActiv s vitamínem B., Dětská Liftea a Biopron Junior), což je odolný druh, který snáze přežívá v různých potravinách a výživových doplňcích, proto je do nich velmi často přidáván. Pravděpodobně je to tím, že *B. animalis* susp. *lactis* má velmi široký fermentační profil a také vysokou hodnotu redoxpotenciálu, z čehož vyplývá, že má oproti jiným druhům rodu *Bifidobacterium* zvýšenou odolnost vůči kyslíku, což u anaerobních bakterií velká výhoda. Tento druh byl schopen růst na všech námi testovaných pěstebních prostředích. Tento druh nemá výrazné substrátové preference.

*Bifidobacterium longum* bylo na začátku této práce testováno na médiu MMe (mupirocin, melecitosa), kde jako zdroj uhlíku byl použit sacharid melecitosa, ale ukázalo se, že toto médium není dostatečně selektivní, proto se dále pro stanovení tohoto rodu používal MT agar (mupirocin, turanosa). I přesto se na tomto médiu často objevoval opět poddruh *B. animalis* susp. *lactis*. Při rodové identifikaci se u izolátů ze 2 výrobků stalo, že se objevil pozitivní jak primer na *B. longum*, tak na *B. animalis* susp. *lactis*. Použité primery byly spolehlivé, takže se jednalo buď o chybné nastavení teploty při reakci, nebo o kontaminaci způsobenou při izolaci. Aby se zabránilo chybě při rodové identifikaci, byly při PCR použity pozitivní a negativní vzorky kontroly, tedy vzorky se sbírkovými kmeny.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout metody k selektivnímu stanovení jednotlivých druhů rodu *Bifidobacterium*. Celkem bylo otestováno 10 výrobků na 5ti pěstebních prostředích, kde výsledkem bylo zjištění, že testovaná média nejsou zatím dostatečně selektivní. Jednotlivé druhy rodu *Bifidobacterium* rostly lépe na médiích, která pro ně byla vytvořena, ale je potřeba jednotlivá média ještě lépe propracovat a pravděpodobně změnit některé komponenty, aby se zlepšila jejich selektivita, médium bylo 100 % spolehlivé a nedocházelo ke kontaminaci média jinými druhy rodu *Bifidobacterium*.

Pro *Bifidobacterium bifidum* se tedy jako perspektivní jeví MM médium, pro *Bifidobacterium longum* – MT médium a pro *Bifidobacterium breve* – SMM médium.



## 8 Seznam literatury

Andrianifahanana, M., Moniaux, N., Batra, S. K. 2006. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1765. 189 – 222.

Anonym 1: Příklady funkčních potravin, dostupné z:

<<http://www.eufic.org/article/cs/nutrition/functional-foods/artid/funkcni-potravin/>>  
[cit.: 5.2.2013]

Anonym 2: Legislativa a historie funkčních potravin, dostupné z:

<<http://www.vyzivaspol.cz/clanky-casopis/funkcni-potraviny-a-legislativa.html>>  
[cit.: 5.2.2013]

Anonym 3: Vyhláška 54/2004 Sb., dostupné z:

<<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006190&docType=ART&nid=11307>>  
[cit.: 28.3.2013]

Anonym 4: Zákon 110/1997 Sb., dostupné z:

<[http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe\\_uplna-zneni\\_zakon-1997-110-viceoblasti.html](http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-1997-110-viceoblasti.html)>  
[cit.: 28.3.2013]

Anonym 5: Zákon 378/2007 Sb., dostupné z:

<[http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-ostatni\\_uplna-zneni\\_zakon-2007-378-o-lecivech.html](http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-ostatni_uplna-zneni_zakon-2007-378-o-lecivech.html)>  
[cit.: 28.3.2013]

Anonym 6: EU Register on nutrition and health claims, dostupné z:

<<http://ec.europa.eu/nuhclaims/>>  
[cit.: 22.3.2013]

Anonym 7: Food and Drug Act, dostupné z:

[http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/probiotics\\_guidance-orientation\\_probiotiques-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/probiotics_guidance-orientation_probiotiques-eng.php)

[cit.: 21.2.2013]

Anonym 8: 2012. Selective agar for enumeration of Bifidoacteria. *Microbiology focus*. 4. 7.

Anonym 9: Erba – Lachema, ANAEROTest 23, dostupné z:

[https://www.eralachema.com/attachments/MLT\\_katalog\\_CZ.pdf](https://www.eralachema.com/attachments/MLT_katalog_CZ.pdf)

[cit.: 25.3.2013]

Beerens, H. 1991. Detection of Bifidobacteria by Using Propionic Acid as Selective Agent. *Applied and Environmental Microbiology*. 8. 2418 - 2419.

Biavati, B., Mattarelli, P. 2012. Genus Bifidobacter. In: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Second edition (edited by Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujilo, E. M., Suzuki, K. I., Ludwig, W., Whitman, B. W.). Volume 5. Springer. New York. 171 - 223.

Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Ročková, Š., Svobodová, I., Jebavý, L., Kmet, V. 2012. Bifidobacterium animalis subsp. lactis strains isolated from dog faeces. *Veterinary Microbiology*. 160. 501 – 505.

Bunešová, V., Doming, K. J., Killer, J., Vlková, E., Kopečný, J., Mrázek, J., Ročková, Š., Rada, V. 2011. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotics use in calves. *Anaerobe*. 1 – 3.

Crocian, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., Biavati, B. 1994. Degradation of komplex carbohydrates by Bifidobacterium spp. *International Journal of Food Microbiology*. 24. 199 – 210.

Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*. 81. 1 – 27.

- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. s. 1.: Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Gibson, G. R., Fuller, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *The Journal of Nutrition*. 130. 391 – 395.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125. 1410 - 1412.
- Görner ,F., Valík L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. Malé Centrum. Bratislava. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- Grabitske, H. A., Slavin, J. L. 2009. Gastrointestinal effects of low-digestible carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49. 327 – 60.
- Grajek, W., Olejnik, A., Sip, A. 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functionalfoods. *Acta Biochimica Polonica*. 52. 665 – 671.
- Guo, M. 2009. Functional foods: principles and technology. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. USA. 358 s. ISBN: Neuvedeno.
- Hartemink, R., Kok, B. J., Weenk, G. H., Rombouts, F. M. 1996. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar a new selective medium for bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 27. 33 - 43.
- Havenaar, R. 1992. Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease* (Ed.: Wood, J. B. J.). Elsevier Applied Science Publishers. *International Journal of Food Microbiology*. 69. 167 - 182. ISBN: Neuvedeno.
- ISO 29981: 2010 / IDF 220: 2010.
- Kalač, P. 2002. Funkční potraviny – Kroky ke zdraví. Nakladatelství Dona. České Budějovice. 130 s. ISBN: 80 – 7322029 - 6.

- Kvasničková, A. 2000. Sacharidy pro funkční potraviny: Probiotika – prebiotika – synbiotika. ÚZPI. Praha. 81 s. ISBN: 80 - 7271 - 001 - X.
- Kwak, N. S., Jukes, D .J. 2000. Functional foods. Part 1: the development of regulátory concept. Food control. 12. 99 - 107.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R. 2003. Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. Current Issues in Intestinal Microbiology. 4. 61–69.
- Maxa, V., Rada, V. 1996. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. ÚZPI. Praha. 42 s. ISBN: 80 – 85120 – 57 - 7.
- Mayer, H. K., 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.
- Meile, L. 1998. Mikroorganismen in Lebensmitteln: Umsetzung des probiotischen Konzepts. Lebensmittel-Technologie. 31. 68 - 72.
- Mikkelsen, L. L., Bendixen, Ch., Jakobsen, M., Jensen, B. B. 2002. Enumeration of Bifidobacteria in Gastrointestinal Samples from piglets. Applied and Enviromental Microbiology. 69. 654 – 658.
- Miranda, R. O., Neto, G. G., de Freitas, R., de Carvalho, A. F., Nero, L. A. 2011. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm™ AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. Food Microbiology. 28. 1509 - 13.
- Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. Bifidobacteria Microflora. 1. 3 - 24.
- Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. Journal of Industrial Microbiology. 6. 263 - 268.

- Modler, H. W., McKellar, R. C., Yaguchi, M. 1990. Canadian Food Science Technik. 23. 29-41.
- Payne, J. F., Morris, A. E. J., Beers, P. 1998. Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. In milk. Journal of Applied Microbiology. 86. 353 - 358.
- Pereira, M.A., Ludwig, D.S. 2001. Dietary fiber and body-weight regulation - Observations and mechanisms. Pediatric Clinics of North America. 48. 969 – 80.
- Rada V., Petr J, 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. Veterinary Medicine – Czech, 47. 1 – 4.
- Rada, V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. Interní medicína pro praxi. 12. 92 - 97. ISSN: 1212 - 7299.
- Rada, V., Maxa, V. 2002. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. ÚZPI Praha. 11 - 14.
- Rada, V., Petr, J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose nonfermenting bifidobacteria from hen caeca. Journal of Microbiological Methods. 43. 127-132.
- Rasic, J. L., Kurmann, J. A. 1983. Bifidobacteria and Their Role: Microbiolog, Nutrition.-Physiologic., Medic.,Technic.Aspects (Experientia Supplementum). Birkhäuser Basel.Switzerland. 295. ISBN: 3764312149.
- Roberfroid, M. 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. Digestive and liver disease. 34. 105 - 110.
- Roberfroid, M. B. 2000. Prebiotics and probiotics: Are they functional food?. American Journal of Clinical Nutrition. 71. 1682 – 1687.
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: The koncept Revisited 1,2. The Journal of Nutrition. 137. 830-837.

- Roy, D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 69. 167 - 182.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 88 – 105.
- Sedláček, I. 2007. *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita. Brno. 270 s. ISBN: 80 – 210 – 4207 - 9.
- Shortt, C., O'Brien, J. 2004. *Handbook of functional dairy products*. Boca Raton. London: CRC Press. 293 s. ISBN: 1 – 58716 – 077 - 3.
- Schrezenmeir, J., de Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching and definitiv. *American Journal of Clinical Nutrition*. 32. 361 – 364.
- Slavin, J. L. 2008. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *Journal of American Diet Association*. 108. 1716 – 31.
- Svačina, Š., Bretšnajderová, A., Holcátová, I., Horáček, J., Kovářová, K., Kreuzbergová, J., Müllerová, D., Peiskerová, M., Rušavý, Z., Sulková, S., Šmahelová, A. 2008. *Klinická dietologie*. Grada Publishing. Praha. 384 s. ISBN: 978 – 247 – 2256 – 6.
- Tamine, A. Y., Marshall, V. M. E., Robinson, R. K. 1995. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*. 62. 151 - 187.
- Thanh-Sang Vo, Se-Kwon Kim. 2012. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional food. *Journal of Functional Food*. 5. 16 – 27.
- Tucker, L. A., Thomas, K. S. 2009. Increasing total fiber intake reduces risk of weight and fat gains in women. *Journal of Nutrition*. 139. 576 – 81.
- Ventura, M., Canchaya, C., Meylan, V., Klaenhammer, T. R., Zinkl, R. 2003. Analysis Characterization, and Loci of the *tuf* Genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*

Species and Their Direct Application for Species Identification. Applied and environmental microbiology. 69. 6908 – 6922.

Vlková, E., Grmanová, M., Rada, V., Tlapáková, I., Kopecký, R. 2009. Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. Czech Journal of Animal Science. 54. 552 - 565. ISSN: 1212-1819.

Vlková, E., Grmanová, M., Killer, J., Mrázek, J., Kopečný, J., Bunešová, V., Rada, V. 2010. Survival of Bifidobacteria Administered to Calves. Folia Microbiology. 5. 390 – 392.

Wood, B. J. B., Holzappel, W. H. 1999. Genera of lactic acid bacteria. Springer-Verlag. New York. 420 s. ISBN: 075140215X.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

CTAB = citridium bromid

F6PPK = fruktoso – 6 - fosfát (fosfoketolasa)

GIT = gastrointestinální trakt

MM = Mucin, mupirocin médium

MMe = Mupirocin, melecitosa médium

MRS = De Man, rogosa, sharpe

MT = Mupirocin, turanosa médium

MTPY = Modifikovaný tryptone, phytone, yeast agar

MUP = Mupirocin

KTJ = kolonie tvořící jednotky

PCR = Polymerázová řetězová reakce

SMM = Sorbitol, manitol, mupirocin médium

TOS = Transgalaktosylované oligosacharidy

TPY = Tryptone, phytone, yeast agar

WCh = Wilkins – Chalgren médium



# 10 Samostatné přílohy

## 10.1 Příloha 1: Fermentační profily druhů rodu *Bifidobacterium*

(Wood a Holzapfel, 1999)

Figure 8.1 The fermentative characteristics of the species of the genus *Bifidobacterium*\*

	Sorbitol	l-Arabinose	Raffinose	D-Ribose	Starch	Lactose	Inulin	Cellulose	Melzitose	Glucuronate	Xylose	Mannose	Fructose	Galactose	Sucrose	Maltose	Threhalose	Melintose	Mannitol	Salicin	
1. <i>B. bifidum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. <i>B. longum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. <i>B. infantis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. <i>B. breve</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. <i>B. adolescentis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6. <i>B. angulatum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7. <i>B. catenulatum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8. <i>B. pseudocatenulatum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9. <i>B. dentium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10. <i>B. globosum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11. <i>B. pseudolongum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12. <i>B. cuniculi</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13. <i>B. choerinum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14. <i>B. animalis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15. <i>B. thermophilum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16. <i>B. boum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17. <i>B. magnum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18. <i>B. pullorum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19. <i>B. gallinarum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20. <i>B. suis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21. <i>B. minimum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22. <i>B. subtile</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23. <i>B. coryneforme</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24. <i>B. asteroides</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25. <i>B. indicum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26. <i>B. gallicum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27. <i>B. ruminantium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28. <i>B. merycicum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29. <i>B. seaculare</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*Symbols: d, 11–89% of strains are positive; ND, not determined; ±, when positive it is weakly fermented.