

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Selektivní stanovení bifidobakterií v potravních doplňcích  
a mléčných kysaných výrobcích**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Tereza Jehličková**

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

**Konzultant práce: Ing. Věra Bunešová, PhD.**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Selektivní stanovení bifidobakterií v potravních doplncích a mléčných kysaných výrobcích" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne: 18.března 2015

Podpis autora práce: \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

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

Dále bych ráda poděkovala Ing. Věře Bunešové, PhD. za cenné rady, které mi v průběhu práce dávala.

# Selektivní stanovení bifidobakterií v potravních doplňcích a mléčných kysaných výrobcích

---

## Selective enumeration of bifidobacteria in food supplements and fermented milk products

### Souhrn

Tato práce „Selektivní stanovení bifidobakterií v potravních doplňcích a mléčných kysaných výrobcích“ je orientována na otestování médií určených ke kvantifikaci rodu *Bifidobacterium* a navržení nových, druhově specifických médií určených pro druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve*. V této práci byly otestovány čisté kultury rodu *Bifidobacterium*, dále 16 komerčně dostupných probiotických výrobků, z toho 13 doplňků stravy a 3 jogurty. Testování bylo provedeno na 5 pěstebních prostředích určených ke kvantifikaci rodu *Bifidobacterium*, tedy na normou ISO 29981/IDF 220:2010 (Merck, Německo) doporučeném TOS médiu doplněném o antibiotikum mupirocin (100 mg/l), TOS médiu (Yakult), komerčně vyráběném BSM médiu (Sigma-Aldrich), BSM médiu doplněném o mupirocin (100 mg/l) a na Wilkins–Chalgren (Oxoid) agaru s mupirocinem (100 mg/l) doplněném o sójový pepton (5 g/l), L-cystein (0,5 g/l), Tween 80 (1 ml/l) a ledovou kyselinu octovou (1 ml/l), což je komerčně připravený agar, který byl modifikovaný na katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU. Dále byla navržena druhově specifická média: mupirocin-turanosa médium (MT), manitol-sorbitol-mupirocin médium (MSM) a mupirocin-mucin médium (MM). Sacharidy použité v sestavených druhově specifických médiích slouží jako selektivní faktory pro konkrétní druhy bifidobakterií. Tato práce se zaměřuje na sledování schopnosti růstu jednotlivých druhů bifidobakterií na těchto výše zmíněných pěstebních prostředích. Z výsledků této práce vyplývá, že nejvyšší počty bifidobakterií rostly na TOS médiu bez mupirocinu. Tento výsledek byl však dán tím, že na TOS médiu bez mupirocinu byly později identifikovány i jiné bakterie než jen bakterie rodu *Bifidobacterium*. TOS médium je tedy méně selektivní než ostatní doporučovaná média pro kvantifikaci rodu *Bifidobacterium* obohacená o mupirocin (100 mg/l), kde všechny izoláty byly identifikovány jako rod *Bifidobacterium*.

Izoláty pocházející z komerčně dostupných probiotických doplňků stravy a z jogurtů, byly identifikovány na úroveň rodu a druhu. Rodová identifikace byla provedena pomocí detekce enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy (F6PPK), což je enzym specifický pro rod *Bifidobacterium*. Druhová identifikace byla pak provedena pomocí molekulárně genetických metod, konkrétně se jednalo o polymerázovou řetězovou reakci (PCR), za použití rodově specifických primerů. Při sestavování druhově specifických médií bylo vycházeno z biochemických testů API 50 CHL a ANAEROtest 23, pomocí kterých byly zjištěny substrátové preference konkrétních druhů bifidobakterií nebo bylo vycházeno z již známých faktů (utilizace mucinu), v případě *Bifidobacterium bifidum*. Druhově specifická média byla sestavena pro *Bifidobacterium bifidum*, kde byl jako zdroj uhlíku a zároveň selektivní faktor vybrán mucin (20 g/l). Toto médium bylo ještě pro zvýšení selektivity doplněno o mupirocin (100 mg/l). Pro *Bifidobacterium longum* bylo navrženo médium doplněné o turanosu (10 g/l) a mupirocin (100 mg/l). Pro *Bifidobacterium breve* bylo navrženo médium doplněné o manitol (10 g/l), sorbitol (10 g/l) a mupirocin (100 mg/l). Nejvíce selektivní se ukázalo médium navržené pro *Bifidobacterium bifidum*, kde bylo *Bifidobacterium bifidum* identifikováno v 79 %, na médiu pro *Bifidobacterium longum* byl tento druh identifikován v 67 % a na médiu navrženém pro *Bifidobacterium breve* byl tento druh identifikován v 71 %. Ani jedno z nově navržených druhově specifických médií nebylo zcela selektivní, nicméně pro *Bifidobacterium bifidum* se tedy jako perspektivní jeví médium obohacené o mucin a mupirocin, pro *Bifidobacterium longum* se jako perspektivní jeví médium obohacené o turanosu a mupirocin a pro *Bifidobacterium breve* se jako perspektivní jeví médium obohacené o sorbitol, manitol a mupirocin. Poslední část této práce je věnovaná ověření informací uvedených na obalech komerčně dostupných probiotických preparátů, tedy ověření faktu, zda se informace uvedené na obalech shodují s výsledky identifikace izolátů z těchto výrobků provedené v rámci této práce. Deklarované druhy bifidobakterií byly identifikovány, ale v některých výrobcích identifikace potvrdila i výskyt druhů, které na obale uvedeny nebyly.

**Klíčová slova:** Bifidobakterie, probiotika, médium, selektivita, potravní doplněk

## Summary

The aim of this study, “Selective enumeration of bifidobacteria in food supplements and fermented milk products” was to test media designed for quantification of the genus *Bifidobacterium* and also preparing new species-specific media for *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* species.

In this study, the pure culture of *Bifidobacterium* as well as 16 commercially available probiotic products, 13 probiotics supplements and 3 yogurts, were tested. The testing was performed on five cultivation media designed to quantify the genus *Bifidobacterium*: the standard ISO 29981/IDF 220:2010 (Merck, Germany) recommended TOS medium enriched by the antibiotic mupirocin (100 mg/l), TOS medium (Yakult), commercially produced BSM medium (Sigma-Aldrich), BSM medium enriched mupirocin (100 mg/l) and Wilkins- Chalgren (Oxoid) agar with mupirocin (100 mg/l). Wilkins-Chalgren (Oxoid) agar was also supplemented with soy peptone (5 g/l), L-cysteine (0,5 g/l), Tween 80 (1 ml/l) and glacial acetic acid (1 ml/l), which is a commercially prepared agar, modified at the Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Czech University of Life Sciences Prague.

Furthermore the specific-species media were designed and produced. Mupirocin, turanose medium (MT), mannitol, sorbitol, mupirocin medium (MSM) and mupirocin, mucin medium (MM). Carbohydrates used in specific-species media were used as selective factors for specific species of *Bifidobacteria*.

This study focused on observing ability of growth of different species of bifidobacteria in these previously mentioned cultivation media. The results of this study show, that the highest numbers of bifidobacteria appeared on the TOS medium without mupirocin. This result was given through the fact, that on the TOS medium without mupirocin, bacterial genera other, than bifidobacteria were identified. TOS medium is thus less selective than the other recommended media proposed for quantifying of the genus *Bifidobacterium* enriched with mupirocin (100 mg/l), where all isolates were identified as genus *Bifidobacterium*.

Isolates from commercially available probiotic supplements and also isolates from yogurts were identified to the genus and species level. The genus identification was carried out by the detection of fructose-6-phosphate fosfoketolase (F6PPK), which is an enzyme specific for the genus *Bifidobacterium*. Species identification was made by using molecular genetic techniques, specifically a polymerase chain reaction (PCR), using the genus specific primers.

Specific-species media were constructed on the base of the information that came from a biochemical test API 50 CHL and ANAERObtest 23, through which the substrate preferences

of specific bifidobacterial species were detected, or in the case of *Bifidobacterium bifidum* the result from already known facts (utilization of mucin).

Specific-species medium was prepared for *Bifidobacterium bifidum*, where mucin (20g/l) was the sole carbon source as a selective factor. Mupirocin (100 mg/l) was an additional selective factor. For *Bifidobacterium longum*, the medium supplemented with turanose (10 g/l) and mupirocin (100 mg/l) was prepared. For *Bifidobacterium breve*, the medium supplemented with mannitol (10 g/l), sorbitol (10 g/l) and mupirocin (100 mg/l) was prepared.

The most selective medium was the medium designed for *Bifidobacterium bifidum*, where the *Bifidobacterium bifidum* has been identified in 79 %, on a medium for *Bifidobacterium longum*, specific species was identified in 67 % and on a medium designed for *Bifidobacterium breve* specific species was identified in 71 %.

Neither of the newly designed specific-species media were entirely selective, however, *Bifidobacterium bifidum* appears to be a perspective medium supplemented with mucin and mupirocin. For *Bifidobacterium longum* a perspective medium seems to be the medium supplemented with turanose and mupirocin and for *Bifidobacterium breve* a perspective medium seems to be the medium enriched by sorbitol, mannitol, and mupirocin.

The last aim of this study was verification of the information on the packaging of commercially available probiotics, thus verifying the fact that the information on the packaging are in line with the results of identification of isolates of these products made in this study. Declared bifidobacteria species were identified, but in some cases other species which were not mentioned on the packaging were also found.

**Key words:** *Bifidobacterium*, probiotics, medium, selectivity, food supplement

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Rod <i>Bifidobacterium</i> .....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Charakteristika bifidobakterií.....	11
2.1.2	Morfologie a fyziologické vlastnosti.....	17
2.1.3	Kultivace bifidobakterií.....	18
2.1.3.1	Neselektivní média .....	19
2.1.3.2	Selektivní média .....	20
2.1.4	Izolace a identifikace bifidobakterií.....	24
2.1.4.1	Rodová .....	24
2.1.4.1.1	F6PPK .....	24
2.1.4.2	Druhová.....	25
2.1.4.2.1	PCR .....	25
2.1.4.2.2	Biochemické testy .....	29
2.1.4.2.2.1	ANAEROTest 23.....	29
2.1.4.2.2.2	API® 50 CHL .....	30
2.1.4.2.2.3	API 20A® .....	31
2.1.4.2.3	MALDI–TOF MS .....	31
<b>2.2</b>	<b>Probiotika.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3</b>	<b>Prebiotika .....</b>	<b>36</b>
<b>2.4</b>	<b>Synbiotika .....</b>	<b>39</b>
<b>2.5</b>	<b>Mléčné kysané výrobky a jejich charakteristika.....</b>	<b>41</b>
2.5.1	Mléčné kvašení.....	42
2.5.1.1	Homofermentativní .....	42
2.5.1.2	Heterofermentativní .....	43
2.5.1.3	Fakultaivně heterofermentativní .....	44
2.5.1.4	Fermentace bifidobakterií .....	44
2.5.2	Druhy mléčných kysaných výrobků.....	45
2.5.3	Stanovení, izolace a identifikace bifidobakterií z mléčných kysaných výrobků .	47
<b>3</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>50</b>



<b>3.1</b>	<b>Hypotéza.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Testované výrobky .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Kultivační média .....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Základní média pro bifidobakterie .....	53
4.2.1.1	BSM (Bifidus Selective Medium).....	53
4.2.1.2	TOS .....	54
4.2.2	Selektivní média pro bifidobakterie .....	55
4.2.2.1	BSM-MUP .....	55
4.2.2.2	TOS-MUP .....	55
4.2.2.3	WSP-MUP.....	56
4.2.3	Navržená druhově specifická média pro bifidobakterie.....	57
4.2.4	Mikrobiologický rozbor .....	58
<b>4.3</b>	<b>Identifikace .....</b>	<b>59</b>
4.3.1	Rodová .....	59
4.3.1.1	F6PPK .....	60
4.3.2	Druhová.....	61
4.3.2.1	ANAERObest 23.....	61
4.3.2.2	API 50 CH.....	63
4.3.2.3	PCR .....	65
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy.....</b>	<b>107</b>

# 1 Úvod

Mikroorganismy nás, jako lidstvo, obklopují už od nepaměti. Jsou nedílnou součástí našich životů a můžou mít velký vliv na lidský organismus.

Lidské střevo obsahuje cca  $10^{14}$  mikroorganismů, což je 10krát více, než je buněk v lidském těle. Tato střevní mikrobiota může mít negativní vliv na zdraví hostitele, ale může jeho zdraví i pozitivně stimulovat. Proto je žádoucí, aby střevo bylo osídleno „správnou“ mikrobiotou. Mezi tuto žádoucí mikrobiotu jsou řazeny takzvané probiotické organismy, které tím, že osídlují lidské střevo, chrání hostitele. Tyto mikroorganismy zabraňují nebo alespoň částečně potlačují růst hnilobných bakterií. Probiotické mikroorganismy také mohou produkovat řadu vitamínů skupiny B a K, mohou regulovat vývoj střev, regulovat ukládání tuků, mohou zkvašovat organické látky a posilovat imunitní systém.

Mezi nejznámější probiotické rody mikroorganismů patří *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Saccharomyces*. Zejména rod *Bifidobacterium* má schopnost adherovat na střevní epitel a díky tomu tak snáze přežívat v trávicím traktu a je přirozeným obyvatelem trávicího traktu.

Probiotika jsou definována dle FAO/WHO (2002), jako živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v přiměřeném množství, přinášejí hostiteli zdravotní přínos. Probiotické mikroorganismy jsou v dnešní době velmi populární, můžeme je nalézt jednak v běžné stravě, například v kysaném zelí, ve fermentovaných mléčných výrobcích (jogurt, acidofilní mléko, kefír), kde se přirozeně vyskytují jako součást čistých mlékařských kultur, tak ale i ve formě doplňků stravy. Proto je důležité umět je kvantifikovat, stejně tak jako jasně a spolehlivě selektivně stanovit.

Nevýhodou probiotických mikroorganismů je fakt, že ne všechny jsou schopny projít trávicím traktem ve vitálním stavu. Důvodem je na jedné straně jejich neschopnost přizpůsobit se příliš kyselému prostředí žaludku, jehož pH se může pohybovat kolem 2 a na straně druhé silně zásadité prostředí tenkého střeva. Probiotické výrobky je proto třeba testovat nejen na množství živých bakterií, ale i na přítomnost konkrétních druhů, které jsou vlastní lidskému trávicímu traktu.

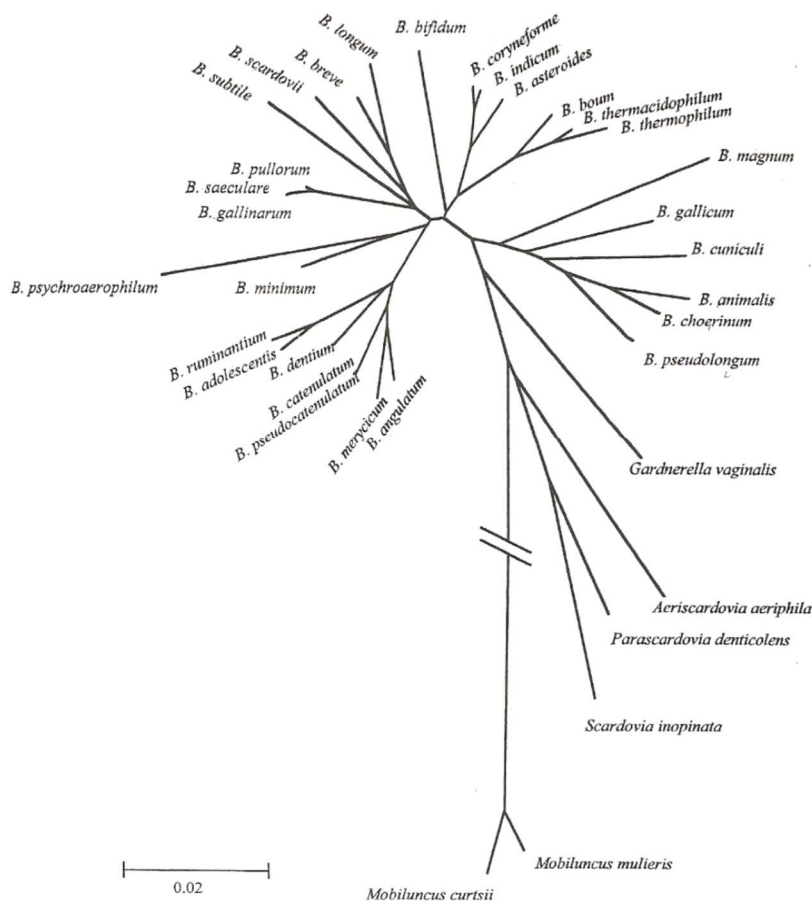
## 2 Literární rešerše

### 2.1 Rod *Bifidobacterium*

#### 2.1.1 Charakteristika bifidobakterií

První bifidobakterií byly izolovány v období let 1899-1900 Henrym Tissierem, který vyzoroval, že mají nepravidelný tvar podobající se písmenu Y. První bifidobakterie byly vyzolovány z mateřského mléka matky a posléze pak z trávicího traktu dítěte. Tyto první izoláty byly pojmenovány *Bacillus bifidus* (Tissier, 1900). Později Orla-Jensen, v roce 1924, navrhl, aby bifidobakterie tvořily vlastní rod (Orla-Jensen, 1924) a to na základě analýzy vyzolovaného genu, který dokazoval, že se rod *Bifidobacterium* nachází na pomezí mezi bakteriemi propionového a mléčného kvašení (Leahy et al., 2005). V padesátých letech dvacátého století bylo zjištěno, že bifidobakterie dokáží fermentovat některé uhlíkaté sloučeniny v závislosti na tom, o jaký druh rodu *Bifidobacterium* se jedná (Biavati, et al., 2000), nicméně v průběhu celého dvacátého století nebyl úplně jasný taxonomický konsensus ohledně tohoto rodu, proto byly bifidobakterie zařazovány spolu s rodem *Lactobacillus* mezi bakterie mléčného kvašení, a to i přes

Obrázek 1: Fylogenetický strom (podle Dellaglio a Felis, 2005, upraveno)



to, že jsou fylogeneticky nepříbuzné (Sedláček, 2007). Hlavními produkty metabolismu bifidobakterií jsou acetát a laktát v poměru 3:2 (Biavati a Mattarelli, 2012).

Bylo to jednak díky jejich pleomorfnímu tvaru, tak jejich obligátním fermentačním vlastnostem (Klein et al., 1998). Tyto evoluční vztahy mezi bakteriemi mléčného kvašení, tak jak je známe dnes, byly stanoveny až později, při porovnání zejména sekvence jejich genu pro 16S rRNA (Ventura et al., 2003).

Dnes se rod *Bifidobacterium* řadí do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales*, čeledi *Bifidobacteriaceae* a nakonec pak do samostatného rodu *Bifidobacterium* (Sedláček, 2007), kde je známo okolo 37 druhů bifidobakterií, které byly rozděleny do několika skupin na základě identifikace provedené pomocí sekvence genu pro 16S rRNA (Turroni et al., 2011). Na obrázku číslo 1 je znázorněn fylogenetický vztah mezi druhy čeledi *Bifidobacteriaceae*, na základě analýzy genu, který kóduje 16S RNA.

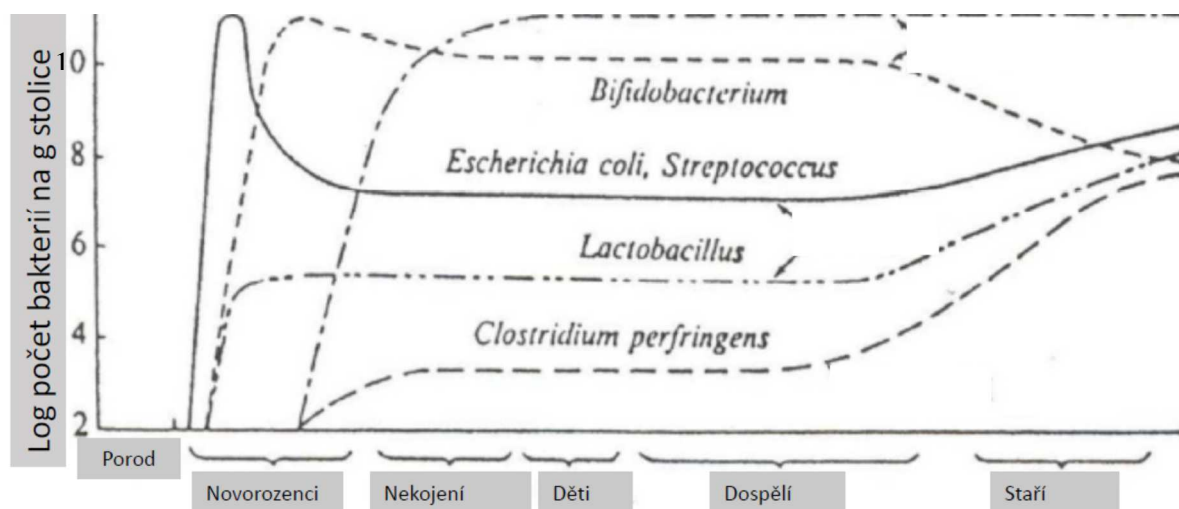
Rod *Bifidobacterium* je rodem, který je řazen mezi probiotické mikroorganismy s velmi širokým využitím a stejně tak i širokým rozsahem výskytu (Miranda et al., 2011).

Je to rod, který kolonizuje především GIT a to v oblasti střeva, dutiny ústní a dále se pak hojně vyskytuje v oblasti pochvy. Bifidobakterie tvoří základní složku střevní mikrobioty, která je důležitá pro lidský imunitní systém. Rod *Bifidobacterium* ho stimuluje a zároveň podporuje mukózní bariéru, což má za následek zvýšení obranyschopnosti jedince a odolnosti střev vůči patogenům (Matto et al., 2004).

Velmi důležité je bifidobakteriální osídlování střevní mikrobioty u kojených či uměle přikrmovaných novorozenců. Novorozené dítě se rodí s téměř sterilním trávicím traktem, jeho osídlování začíná při průchodu vaginou během porodu a dále pak při kojení, či podávání umělé směsi (Modler et al., 1990). Již dva dny po porodu nalezneme ve střevě novorozence okolo  $10^9$  až  $10^{10}$  bakterií na gram stolice, ale může se stát, že osídlování střev je z důvodů příliš sterilní porodní hygieny, výživy, či způsobu porodu opožděné (Biavati et al., 2000). Avšak u kojených novorozenců se předpokládá standardní způsob bifidobakteriálního osídlování střev díky mateřskému mléku, které je prvním probiotikem, se kterým se novorozenec setkává (Modler et al., 1990). Kasein, který je obsažen v mateřském mléce stimuluje růst bifidobakterií a zároveň napomáhá v boji proti patogenům, jako je například *Escherichia coli* nebo *Candida albicans*, které napadají střevní epithel (Biavati et al., 2000). Uvádí se, že v prvním vývojovém období má zdravý novorozenec osídlený trávicí trakt z 90-95 % bifidobakteriemi, které s přibývajícím věkem klesají (Schell et al., 2002). Později po porodu počet bifidobakterií v trávicím traktu klesá a začínají převažovat anaerobní bakterie rodů *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* a *Peptostreptococcus*, přičemž doplňkovou mikrobiotu tvoří

laktobacily, enterokoky, koliformní a ostatní bakterie. V pozdějším věku tvoří bifidobakterie jen 5-10 % z celkové střevní mikrobioty (Mitsuoka, 1990). Obrázek číslo 2 znázorňuje průběh osídlování GIT.

Obrázek 2: Změny v osídlování střevní mikrobioty během života (podle Mitsuoka, 1992, upraveno)



Mikrobiota trávicího traktu u zdravých lidí bývá za normálních, standardních, okolností konstantní. Změny nastávají až ve chvíli, kdy je náš organismus vystavován působení sulfonamidů, antibiotik nebo dalších chemoterapeutik. Změny střevní mikrobioty nastávají také při stresu nebo během stárnutí, kdy dochází k přirozenému oslabení imunitního systému a zároveň k úbytku bifidobakterií, které mohou být i zcela zredukovány. Na druhé straně dochází ke zvýšení počtu bakterií rodu *Enterococcus*, *Enterobacter* a *Clostridium* (Maxa a Rada, 1996).

U bakterií rodu *Bifidobacterium* byly zjištěny některé jejich konkrétní zdravotní přínosy. Grajek et al. (2005) uvádí, že ten to rod má jak antikancerogenní, tak atnicholesterolemický účinek. Zároveň bylo prokázáno, že bifidobakterie nalézající se v trávicím traktu pozitivně ovlivňují zdraví hostitele tím, že zabraňují kolonizaci střeva patogenními organismy a zvyšují tak obranyschopnost organismu jedince. Také bylo zjištěno, že rod *Bifidobacterium* napomáhá jedincům, kteří trpí laktosovou intolerancí nebo laktosovou insuficiencí, bifidobakterie mají antiprůjmový účinek (Russell et al., 2011).

Jak již bylo zmíněno výše, bifidobakterie jsou obyvateli trávicího traktu a to jak lidí, tak ale i mnoha dalších organismů. Podrobnější informace o tom, kde všude se bifidobakterie vyskytují, je uvedeno v tabulce číslo 1.

**Tabulka 1: Původ druhů rodu *Bifidobacterium* (podle Russell et al., 2011, upraveno)**

<b>kmen</b>	<b>vyizoloval</b>	<b>stolice dospělého člověka</b>	<b>stolice dítěte</b>	<b>ženská vagína</b>	<b>stolice kuřat</b>	<b>stolice prasat</b>	<b>stolice selat</b>	<b>stolice králíků</b>	<b>bachor skotu</b>	<b>odpadní vody</b>	<b>střevo čmeláka</b>	<b>střevo včely</b>
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	Killer et al. (2010a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Reuter (1963)	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Scardovi a Crociani (1974)	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Scardovi a Trovatelli (1974)	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Scardovi a Trovatelli (1969)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Orla-Jensen (1924)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	Killer et al. (2010a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bifidobacterium boum</i>	Scardovi et al. (1979)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium bombi</i>	Killer et al. (2009b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bifidobacterium breve</i>	Reuter (1963)	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Scardovi a Crociani (1974)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Scardovi et al. (1979)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	Biavati et al. (1982)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	Scardovi et al. (1979)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Scardovi a Crociani (1974)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Lauer (1990)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Scardovi a Trovatelli (1969)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

**Tabulka 1- pokračování**

kmen	vyizoloval	stolice dospělého člověka	stolice dítěte	ženská vagína	stolice kuřat	stolice prasat	stolice selat	stolice králíků	bachor skotu	odpadní vody	střevo čmeláka	střevo včely
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Reuter (1963)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	Reuter (1963)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium magnum</i>	Scardovi a Zani (1974)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium minimum</i>	Biavati et al. (1982)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	Biavati et al. (1991)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Scardovi et al. (1979)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Mitsuoka (1969)	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	Simpson et al. (2004)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	Trovatelli et al. (1974)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium ruminantum</i>	Biavati et al. (1991)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	Biavati et al. (1991)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Hoyles et al. (2002)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium subtilis</i>	Kim et al. (2010)	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium subtile</i>	Biavati et al. (1982)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	Mitsuoka (1969)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>	Okamoto et al. (2008)	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-



### 2.1.2 Morfologie a fyziologické vlastnosti

Rod *Bifidobacterium* má velmi charakteristickou jak morfologii, tak fyziologii (Leahy et al, 2005). Jsou to nepohyblivé tyčinky s velmi vysokou morfologickou variabilitou, v závislosti na půdě, na které jsou kultivovány. Můžou vypadat jako malé, krátké, či střední tyčinky, které se zašpičatují na konci nebo to mohou být tyčinky kyjovitého tvaru. Bifidobakterie mohou mít i drobné výrůstky, ohyby (Shortt a O'Brien, 2004). Velmi často se ale jejich větvení podobá písmenům V a Y (Leahy et al, 2005) a vyskytují se buď jednotlivě, nebo tvoří řetězce, či shluky (Russell et al., 2011). Na obrázcích, které jsou přiloženy na konci práce, v přílohách číslo 1, 2, 3 a 4 je mikroskopický obraz *Bifidobacterium* spp.

Rod *Bifidobacterium* jsou tedy chemoorganotrofní, gram-pozitivní, pleomorfní, nesporotvorné tyčinky (Scardovi, 1986). Katalasa negativní, vzácně může být katalasa pozitivní, a to když dochází k růstu na vzduchu, který je doplněný o 10 % oxidu uhličitého (Sedláček, 2007). Touto výjimkou jsou druhy *Bifidobacterium asteroides* a *Bifidobacterium indicum* (Biavati a Mattarelli, 2012).

Rod *Bifidobacterium* jsou striktními anaeroby, ale v přítomnosti oxidu uhličitého jsou schopni kyslík po krátkou dobu tolerovat a dokáží v tomto prostředí i růst (Dellaglio a Felis, 2005). Některé druhy, konkrétně se jedná o již zmíněné *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides* (Russell, et al., 2011).

Bifidobakterie jsou mikroorganismy acidotolerantní, kdy optimální pH pro jejich růst se uvádí mezi 6,5-7,0. Při pH které je 4,5-5, případně 8-8,5, bifidobakterie nerostou (Roy, 2001). Výjimkou je *Bifidobacterium thermacidophilum*, které roste i při pH 4,5 a teplotě 49,5 °C (Simpson et al., 2004), stejně tak jsou výjimkou *Bifidobacterium animalis* a *Bifidobacterium lactis*, které přežijí expozici pH 3,5 (Matsumoto, 2005). Co se týče acidotolerantnosti bifidobakterií, tak například *Bifidobacterium bifidum* je k nízkému pH více citlivé než třeba *Bifidobacterium longum* (Lourens-Hattingh et al., 2001).

Protože jsou to bakterie mesofilní, optimální teplota růstu se pohybuje mezi 37–41 °C, minimální teplota se pak uvádí 25–28 °C (Biavati a Mattarelli, 2012). Nedokáží růst při teplotách pod 20 °C a nad 46 °C, vyjma *Bifidobacterium psychroerophilum*, které roste i při 4°C (Simpson et al., 2004).

Buněčné stěny bifidobakterií mají charakteristickou strukturu gram-pozitivních bakterií, tedy stěnu tvořenou z tlusté vrstvy peptidoglykanu, který obsahuje polysacharidy, proteiny a kyselinu teichovou. Složení aminokyselin v základním tetrapeptidu peptidoglykanu se může

lišit mezi různými druhy, ale dokonce i mezi kmeny stejného druhu, což může být využito k jejich identifikaci (Lauer a Kandler, 1983).

Ke svému růstu potřebují bifidobakterie zdroje sacharidů, dusíku, nízký oxidačně- redoxní potenciál (Lourens-Hattingh et al., 2001), stejně tak jako železo a jiné další sloučeniny (Ventura et al., 2004). Vzhledem k tomu, že jsou bifidobakterie velmi citlivé na kyslík, mají tak omezenou životaschopnost. Ta se dá ale zvýšit takzvanými růstovými, bifidogenními, faktory, kterými jsou pepton, dextrin, cystein, threonin, kvasničný extrakt, hydrolyzáty kaseinu anebo prebiotika jako například inulin, galaktooligosacharidy nebo fruktooligosacharidy (Doleyres a Lacroix, 2005). Dále jsou to laktulosa ( $\beta$ - galaktozidofruktóza) a nebo N-acetyl-D-glukosamin, který ve své sloučenině obsahuje sacharidy (Görner a Valík, 2004).

Bifidobakterie jsou sacharolytické mikroorganismy a všechny mají schopnost fermentovat glukosu, fruktosu a galaktosu (Leahy et al, 2005).

Díky enzymu fruktoso-6-fosfoketolasy, který je specifický pouze pro rod *Bifidobacterium* jsou hlavními produkty fermentace kyselina octová a kyselina mléčná v poměru 3:2 (Biavati a Mattarelli, 2012). Dalšími produkty jsou malé množství ethanolu, mravenčanu a sukcinátu (Šilhánková, 2008).

Odolnost rodu *Bifidobacterium* vůči antibiotikům je různá. Jsou citlivé vůči tetracyklinům, metronidazolu, neomycinu a penicilinu. Úplnou rezistenci mají na aminoglykosidy, streptomycin a mupirocin a naopak kompletně vyhubit se dají pomocí erytromycinu a spiramycinu (Reyed, 2007).

### **2.1.3 Kultivace bifidobakterií**

Rod *Bifidobacterium* je rodem, který je hojně využíván hlavně v potravinářském průmyslu (Miranda et al., 2011), proto je důležité, aby byla vyvinuta funkční média pro jejich snadnou, rychlou kultivaci a následnou identifikaci. Mezi nejčastěji používané kmeny se řadí *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Roy, 2001).

Živné půdy jsou ideální způsob, jak rutinně stanovit rod *Bifidobacterium* (Roy, 2001). Proto již bylo navrženo velké množství médií, která se snažila selektivně stanovit tento rod (Biavati a Mattarelli, 2012). Při jejich sestavování je nezbytné, aby byla respektována fyziologie těchto mikroorganismů, a to z toho důvodu, že každý druh má rozdílné požadavky na výživu, má jinou toleranci ke kyslíku, k antibiotikům (Charteris et al, 1997), mají rozdílný

oxidačně-redukční potenciál, potřebují specifické pH během růstu, stejně tak jako je pro ně velmi důležité pH připravovaného média (Roy, 2001).

Dalším velmi důležitým parametrem při sestavování médií je, aby médium selektivně podporovalo růst bifidobakterií, zatímco růst ostatních bakterií je potlačován (Pacher a Kneifel, 1996).

Aby bylo docíleno co největší selektivity, jsou do médií přidávány takzvané selektivní faktory, kterými jsou různé druhy sacharidů (rafinosa, turanosa, melecitosa), antibiotika (kanamycin, neomycin, paramomycin), peptony, masový/jaterní extrakt, kyselina propionová nebo třeba mateřské mléko a různé další (Biavati a Mattarelli, 2012).

### 2.1.3.1 Neselektivní média

Za neselektivní média jsou obecně brána ta média, na kterých kromě požadovaného rodu bakterií mohou růst i rody jiné. Jsou velmi často používána při rutinním stanovování (kvantifikaci) rodu *Bifidobacterium* ve fermentovaných mléčných výrobcích, které tento rod obsahují, za účelem zjištění doby životaschopnosti těchto mikroorganismů a původního inokula (Roy, 2001). Na neselektivních médiích často dochází k tomu, že kromě kolonií bifidobakterií se zde vyskytují ještě kolonie laktobacilů, či streptokoků, které jsou od sebe morfologicky nerozeznatelné. Proto je potřeba bifidobakterie izolovat na selektivních živných půdách (Biavati a Mattarelli, 2012). V tabulce číslo 2 jsou uvedena některá neselektivní média.

Scardovi v roce 1986 přišel s návrhem složení komplexního, neselektivního média, které nazval **TPY** (Tryptone Phytone Yeast extract). Toto médium umožňuje růst jak bakterií mléčného kvašení, tak bifidobakterií. Aby bylo docíleno selektivity, bylo nutné do tohoto neselektivního TPY média, přidat různé selektivní faktory, kterými v tomto případě byla různá chemoterapeutika a antibiotika (Scardovi, 1986). Přesné složení TPY média je uvedeno v příloze číslo 5.

**Tabulka 2: Neselektivní média (podle Roy, 2001, upraveno)**

<b>Zkratka média:</b>	<b>Název média:</b>	<b>Přídavek:</b>	<b>Reference:</b>
<b>MRS</b>	De Man,Rogosa, Sharpe	žádný	De Man et al., 1960
<b>TPY</b>	Tryptone Phytone Yeast	žádný	Scardovi, 1986
<b>BL</b>	BL Glucose Blood-Liver	žádný	Mitsuoka et al., 1965
<b>CLB</b>	Columbia	žádný	Ellner et al., 1966
<b>LCL</b>	Liver Cystine Lactose (Blaurock)	žádný	Rasic, 1990
<b>RCM</b>	Reinforced Clostridia Medium	žádný	Grinsted a Hirsch, 1954
<b>W</b>	Wilkins Chalgren agar	žádný	Wilkins a Chalgren, 1976
<b>W+SP</b>	Wilkins Chalgren agar + sojový pepton	sojový pepton	Wilkins a Chalgren, 1976
<b>mMRS+ blood</b>	Modifikovaný MRS + krev	L-cystein-HCl, 0,05 %, ovčí krev 10 ml	Pacher a Kneifel, 1996
<b>mBL</b>	Modifikovaný BL bez krve	L-cystein-HCl, 0,05 %	Arroyo et al., 1995
<b>mRCM</b>	Modifikovaný RCM	laktosa 1,0 %, ovčí krev 50 ml	Reuter, 1990

### 2.1.3.2 Selektivní média

V roce 1981 Resnick a Levin sestavili médium pro izolaci bakterií *Bifidobacterium* spp., které nazvali **YN-6** a bylo složeno z kvasničného extraktu (0,2 g), agaru (1,5 g), polypeptonu (1 g), chloridu sodného (0,32 g) a L-cystein hydrochloridu (0,003 g). To vše bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody. Toto médium bylo upraveno na pH 7 před autoklávem. Jako selektivní faktory zde byly použity kyselina nalixidová (80 µg/ml), neomycin sulfát (2,5 µg/ml) a bromcresolová zeleň (300 µg/ml).

Chang et al. (1983) modifikovali **MRS** agar, který obohatili o cystein, azid sodný a přidali čínskou modř. Tato modifikace odlišovala rod *Bifidobacterium* tím, že jejich kolonie měly intenzivnější zbarvení a byly tak snáze identifikovatelné.

Muñoa a Pares v roce 1988 sestavili selektivně diferenciační médium, které nazvali **BIM-25** a použili ho pro izolaci a kvantifikaci bifidobakterií ve vodním prostředí. Toto médium, které má základ z média používaného pro klostridie, bylo obohaceno přídavkem kyseliny nalidixové (0,02 g/l), polymyxinu B sulfátu (0,0085 g/l), kanamycinu (0,05 g/l) a jodoacetátu (Muñoa a Pares, 1988).

Dalším člověkem, který se podílel na rozvoji selektivních médií, byl Henri Beerens, který v roce 1991 **modifikoval Columbia médium** (Pasteur Production) a to tak, že ho 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 (Beerens, 1990).

Melissa et al. (1993) se pokusili selektivně stanovit *Bifidobacterium bifidum* ve smíšených probiotických výrobcích. Použili k tomu modifikovaný **VF-Bouillon** agar, který obohatili o lithium chlorid (0,5 mg/ml), laurylsulfát sodný (20 µg/ml), propionát sodný (5 mg/ml) a neomycin sulfát (10 µg/ml). Na začátku zvolili koncentraci 3 g/l lithium chloridu, který přidali z důvodu inhibice růstu *Lactobacillus acidophilus*. Následně ale zjistili, že tato koncentrace není zcela vhodná, protože má inhibiční vliv nejen na *Lactobacillus acidophilus*, ale i na růst *Bifidobacterium bifidum*. Za optimální koncentraci zvolili na základě experimentu koncentraci 0,5 mg/ml. Na základě výsledků Millera a Finegolda z roku 1967, kteří zjistili, že většina kmenů rodu *Bifidobacterium* je rezistentní na neomycin, přidali Melissa et al. (1993) toto antibiotikum i do svého, potencionálně selektivního, média.

Rada a Petr v roce 2000 přišli s médiem, které nazvali **MTPY**. Jako základ použili TPY agar, který doplnili o mupirocin (100 mg/l) a ledovou kyselinu octovou (1 ml/l). Toto médium bylo funkční při stanovování rodu *Bifidobacterium* ve výkalech živočichů. Tato kombinace se používá též s Wilkins-Chalgren agaram (Rada a Petr, 2000). Tato média ve svých pracích použili například Rada a Petr (2002), kdy zjistili, že pro identifikaci bifidobakterií z výkalů prasat bylo toto médium (MTPY) spolehlivé jen v 50 %. Proto bylo MTPY médium doplněno o kolistin (25 mg/l). V závěru této studie bylo uvedeno, že vzhledem k výsledkům by selektivní média měla být vybírána dle druhu, původu testovaných vzorků. Dalšími, kdo toto modifikované médium použily, byly Vlková et al. (2004) nebo Bunešová et al. (2012).

V roce 2002 Mikkelsen et al. Provedli studii, která hodnotila populaci rodu *Bifidobacterium* ve výkalech sajících selat. Pro tuto studii byla zvolena tři média za účelem zjištění jejich selektivity. Jako první médium byl zvolen **RB agar** (*Raffinose-Bifidobacterium*) složený 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, dle Hartemink (1996). Jako druhé médium byl použit **MW** agar a posledním médiem byl Beerens agar. Výsledkem této studie je fakt, že tato média nejsou příliš selektivní pro stanovování rodu *Bifidobacterium* ve výkalech sajících selat. Největší výskyt tohoto rodu byl prokázán na modifikovaném **WS** agaru (Mikkelsen et al., 2002). Tato a další selektivní média jsou uvedena v tabulce číslo 3.

**Tabulka 3: Selektivní média (podle Lourens-Hattingh a Viljoen, 2001; Ashraf a Shah, 2011, upraveno)**

<b>Zkratka:</b>	<b>Základ média:</b>	<b>Selektivita činidlo:</b>	<b>Reference:</b>
<b>NPNL</b>	BL (Glukose Blood-Liver)	NPNL směs: Neomycin 100 mg/l, paramomycin 200 mg/l, kys. nalidixová 15 mg/l, LiCl 3 g/l	Teraguchi et al., 1978
<b>MRS-NPNL</b>	MRS (DeMan,Rogosa, Sharpe)	NPNL směs: Neomycin 100 mg/l, paramomycin 200 mg/l, kys. nalidixová 15 mg/l, LiCl 3 g/l	Dave a Shah, 1996
<b>TOS- NPNL</b>	N/A	Neomycin, paramomycin, kys. nalidixová, LiCl	Wijsman et al., 1989
<b>TPY+NPNL</b>	TPY (Tryptone Phytone Yeast)	(NNL) Neomycin, paramomycin, kys. nalidixová, LiCl	Ghoddusi a Robinson, 1996
<b>BL- OG</b>	BL (Glukose Blood-Liver)	Hovězí žluč, gentamicin	Lim et al., 1995
<b>RMS+PPNL</b>	mRogosa	(PPNL) Propionát sodný, neomycin, paramomycin, LiCl	Samona a Robinson, 1991
<b>MRSD</b>	MRS (DeMan,Rogosa, Sharpe)	Dicloxacillin	Sozzi et al., 1990
<b>TPYD</b>	TPY (Tryptone Phytone Yeast)	Dicloxacillin	Sozzi et al., 1990
<b>MCAP</b>	CLB (Columbia agar)	K. propionová 5 ml	Beerens, 1990
<b>CAB-NL</b>	CLB (Columbia agra)	Neomycin, LiCl	Chapon a Kiss, 1991
<b>DP</b>	CLB (Columbia agar)	Dicloxacillin, k. propionová 5 ml	Bonaparte, 1997
<b>LP</b>	LCL (Liver Cystine Lactose)	LP směs: LiCl 2g/l, propionát sodný 3g/l	Lapierre et al., 1992
<b>RAF 5.1</b>	CLB (Columbia agar)	LP směs: LiCl 2g/l, propionát sodný 3g/l	Roy et al., 1997

**Tabulka 3- pokračování**

<b>Zkratka:</b>	<b>Základ média:</b>	<b>Selektivita činidlo:</b>	<b>Reference:</b>
<b>RB</b>	LCL (Liver Cystine Lactose)	LiCl, propionát sodný	Hartemink et al., 1996
<b>BFM</b>	N/A	LiCl, methylenová modř, k. propionová 5 ml	Nebra a Blanch, 1999
<b>GL</b>	N/A	LiCl	Iwane et al., 1993
<b>BIM-25</b>	RCA (Reinf.Clostr.agar)	Kys. nalidixová, polymycin B, k. jodoctová, 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid	Munoa a Pares, 1988
<b>AMC</b>	RCA (Reinf.Clostr.agar)	Kys. nalidixová, polymycin B, k. jodoctová, 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid, LP směs: LiCl 2 g/l, propionát sodný 3 g/l	Arroyo et al., 1994
<b>BSM</b>	MRS (DeMan,Rogosa, Sharpe)	Mupirocin 50 mg, cystein hydrochlorid	Simpson et al., 2004
<b>MW</b>	W-CH (Wilkins Chalgren agar)	Ledová kys. octová (1 ml/ l) mupirocin (100 mg/ l)	Rada a Petr, 2000
<b>MTPY</b>	TPY (Tryptone Phytone Yeast)	mupirocin (100 mg/ l)	Vlková, 2004
<b>TOS</b>	TOS	Galaktooligosacharidy TOS	Wijsman et al., 1989
<b>TOS + M</b>	TOS	Mupirocin 50 mg/l	Kolakowski et al., 2010
<b>WCM</b>	N/A	Mupirocin 50 mg/l	Rada a Koc, 2000
<b>X-a-gal</b>	MRS	5-bromo-4chloro-3-indolyl-a-galactosid	Chevalier et al., 1991

## 2.1.4 Izolace a identifikace bifidobakterií

Identifikace bifidobakterií je velmi důležitou a zároveň velmi komplikovanou operací. Dříve byla identifikace rodu *Bifidobacterium* založena na charakterizaci pomocí morfologických vlastností buněk, fermentaci sacharidů, alkoholů, schopnosti růstu při různém pH, či teplotě. Tímto způsobem, takzvanou fenotypovou identifikací, se ale těžko rozlišují jednotlivé druhy bifidobakterií. Proto je fermentace sacharidů důležitým faktorem pro jejich odlišení, ale zároveň tato jejich schopnost fermentovat specifické sacharidy není 100 %, proto slouží spíše orientačně (Biavati a Mattarelli, 2012).

Další metodou, kterou je možno k identifikaci bifidobakterií využít, je porovnání buněk na základě jejich rozdílné stavby buněčné stěny. Hlavními složkami buněčné stěny gram pozitivních bakterií, tedy i bifidobakterií, je polysacharid, silná vrstva peptidoglykanu, kyselina teichová, která prostupuje buněčnou stěnou a bílkoviny. Na základě specifického složení sacharidů v buněčné stěně můžeme rozlišit druhy, někdy dokonce i kmeny, rodu *Bifidobacterium*. Tuto metodu je možno použít i pro identifikaci bifidobakterií pomocí sledu aminokyselin v bílkovinách peptidoglykanu (Bonaparte, 1997).

Dále v literární rešerši byly popsány už jen ty metody rodové a druhové identifikace, které byly použity v metodické části této diplomové práce nebo se běžně používají na katedře Mikrobiologie, výživy a dietetiky, na fakultě Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů na České zemědělské univerzitě v Praze.

### 2.1.4.1 Rodová

#### 2.1.4.1.1 F6PPK

Rodová identifikace bifidobakterií je důležitá především k odlišení tohoto rodu od jiných, které se také vyskytují v trávicím traktu lidí, zvířat, v mléčných výrobcích nebo třeba v potravních doplňcích (Scardovi, 1986).

Metoda detekce enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy (F6PPK), který je specifický pro rod *Bifidobacterium* (Scardoi, 1986), se využívá jako nástroje pro identifikaci tohoto rodu (Scardovi, 1986). Tento enzym je klíčový při fermentaci hexos, kdy dochází ke štěpení fruktosy fosfátu na erytroso-4-fosfát a acetyl fosfát (Doleyres a Lacroix, 2005).

Při tomto procesu se zapojují i další enzymy, kterými jsou transaldolasa, transketolasa a xyluloso-fosfoketolasa, pomocí kterých na konci tohoto složitého procesu vznikne kyselina octová a kyselina mléčná v poměru 3:2 (Mayo a van Sideren, 2010).



Pro detekci tohoto enzymu, F6PPK, je nezbytné nejdříve bakteriální buňky narušit, a to pomocí sonikace, aby došlo k vylití jejich obsahu do roztoku. Poté se postupně přidávají činidla, která svou přítomností způsobují barevnou reakci. V případě, že reakce na F6PPK je pozitivní, dojde k fialovému zbarvení roztoku, a to díky reakci acetyl-1-fosfatu, který zde vzniká, spolu s přidaným  $\text{FeCl}_3$ , za vzniku komplexní sloučeniny. Za těchto okolností můžeme říci, že se jedná o izolát rodu *Bifidobacterium* sp. Žluté zbarvení indikuje reakci negativní (Scardovi, 1986).

Dřívější postup byl časově velmi náročný, a proto byl v poslední době několikrát upraven, modifikován, přidavkem citridium bromidu (CTAB). Ukázalo se, že testy s přidavkem CTAB je rychlejší a nevyžadují žádné speciální laboratorní vybavení (Vlková et al., 2002).

Tato metoda je v dnešní době hojně využívána, zmiňují se o ní například Tannock (1999); Rada a Petr (2002); Vlková et al. (2002); Killer a Marounek (2011).

#### **2.1.4.2 Druhová**

##### **2.1.4.2.1 PCR**

PCR (polymerase chain reaction) je v současnosti oblíbenou metodou především v oblasti diagnostiky (Čikoš et al., 2001) a to díky své vysoké citlivosti, specifitě, rychlosti a uživatelské jednoduchosti a je tak jednou z nejčastěji používaných technik molekulární biologie (Ward a Roy, 2005). Tyto její výhody jsou dány existencí specifické sekvence v rámci genomu, jejíž vlastností je nepřítomnost bodových mutací vysoká stabilita (Pavlík, 1999).

PCR relativně nová technika molekulární biologie, která nepoužívá k enzymatické replikaci DNA živého organismu (Rahman et al., 2013). Její další výhodou také je, že nevyžaduje anaerobní podmínky, ve srovnání s klasickými kultivačními metodami a DNA mohou být zachovány v mrazáku (Matsuki et al., 2003).

Běžně se tato metoda používá v lékařských a biologických výzkumných laboratořích pro různé úkoly, jako je například detekce dědičných onemocnění, diagnostika infekčních onemocnění, klonování genů nebo testování otcovství. PCR také umožňuje identifikaci a detekci mikroorganismů jako jsou mykobakterie, anaerobní bakterie nebo viry z tkáňových kultivačních testů a živočišných modelů (Rahman et al., 2013).

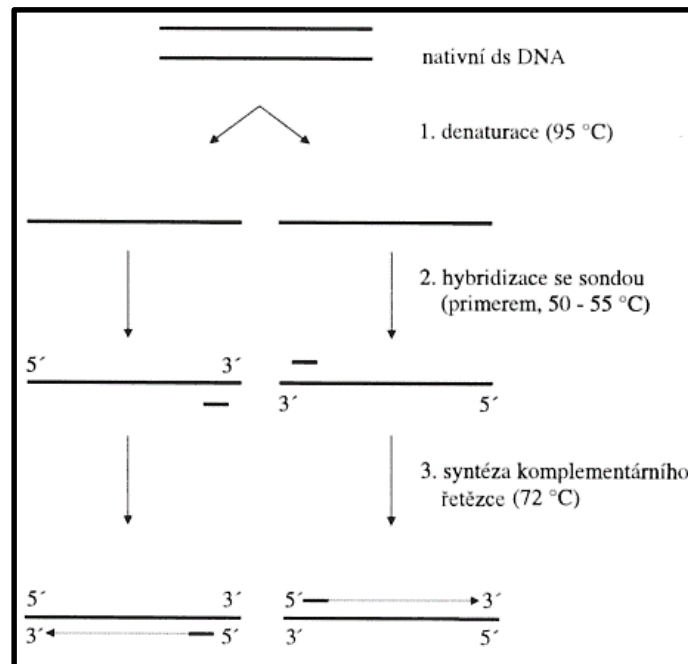
Pro identifikaci izolátů rodu *Bifidobacterium* se používá druhově specifických primerů navržených dle Matsuki et al. (1999). Vysoká specifičnost této metody je pak dána především jejich vhodným výběrem a teplotou (Ward a Roy, 2005).

Samotný proces PCR se skládá ze série od dvaceti do třiceti pěti cyklů, přičemž každý z nich se skládá ze tří kroků a k jejich provedení je zapotřebí následujících komponent:

- Templátu DNA
- Dvou primerů, dlouhých obvykle 20-30 nukleotidů, které označují začátek a konec úseku, který má být amplifikován.
- Taq polymerasy, což je enzym, který kopíruje oblasti, které mají být amplifikovány (namnoženy) a zajišťuje tak syntézu komplementárního vlákna DNA tím, že přidává nukleotidy na nově vznikající 3' konce řetězce.
- Pufry, který poskytuje vhodné prostředí a pH pro DNA-polymerasu. Obsahuje velmi důležitý  $Mg^{2+}$  iont, nejčastěji ve formě  $MgSO_4$ . Stejně tak bývají součástí roztoku KCl a Tris (Matsuki, 1999 Rahman et al., 2013).

Principem této metody je selektivní namnožení (amplifikace) konkrétní oblasti DNA způsobem podobným *in vivo* DNA replikaci, kde velikost amplifikovaného úseku DNA určují dva druhově či rodově specifické oligonukleotidové komplexy, tzv. primery (McPherson a Moller, 2006). Důležité přitom je, aby tento rodově či druhově specifický úsek nepodléhal mutacím (Pavlík, 1999).

Obrázek 3: Průběh reakce PCR (Anonym 7)



Amplifikace DNA probíhá ve třech krocích, které se opakují: denaturaci, hybridizaci a elongaci, viz obrázek číslo 3 (Čikoš et al., 2001).

Při denaturaci, která probíhá jako první, dochází k oddělení vláken DNA templátu a probíhá při teplotě přibližně 95°C, při této reakci dochází k rozrušení vodíkových vazeb, které spojují vlákna DNA. Před prvním cyklem je DNA často denaturována po delší dobu, aby bylo zajištěno, že obě vlákna DNA, a stejně tak i primery jsou zcela odděleny. Produktem jsou dvě vlákna jednořetězcové DNA (ssDNA). Při tomto kroku dochází také k aktivaci Taq polymerasy, která působí v poslední fázi PCR.

Následuje hybridizace (annealing) primerů, která je umožněna díky rozvolněným vláknům DNA templátu a dochází tak k přisedání jednotlivých primerů na komplementární sekvenci matricového řetězce, dle komplementarity bazí, k templátu DNA. Špatně nastavená teplota během této fáze může mít za následek náhodně přisedání primerů k DNA nebo dokonce úplné nepřisednutí k templátu DNA. Tato reakce probíhá nejčastěji v rozmezí teplot 40-72°C.

Posledním krokem při polymerázové řetězové reakci je elongace (extenze) vlákna DNA, kdy dochází k syntéze nového komplementárního vlákna za působení Taq DNA polymerasy, jejíž teplotní optimum se pohybuje okolo teploty 72 °C. Doba této reakce závisí na délce fragmentu DNA, která má být amplifikována. Tato DNA polymeráza umožňuje přikládání k 3'OH konci primeru nukleotidy, dle komplementárních sekvencí templátu, přičemž výsledkem tohoto procesu je nově vytvořený úsek DNA (dsDNA), který se nazývá ampikon (Pavlik, 1999; Ventura et al., 2001; Bauerova et al., 2006; McPherson a Moller, 2006; Rahman et al., 2013).

Typický teplotní a časový průběh reakce PCR je uveden v tabulce číslo 4 a seznam specifických primerů užívaných pro rod *Bifidobacterium* v tabulce číslo 5.

**Tabulka 4: Teplotní a časový průběh reakce PCR (podle Matsuki, 2003, upraveno)**

Počet cyklů:	Teplota:	Čas:
1	95°C	5 min
30	95°C	30 s
	58°C	1 min
	72°C	4 min
1	72°C	7 min

**Tabulka 5: Seznam specifických primerů pro rod *Bifidobacterium* (podle Matsuki et al., 2003; Mayer et al., 2007, upraveno)**

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

Samotný proces PCR probíhá v přístroji zvaném termocykler, ten zajišťuje rychlý přechod mezi teplotami. Jeho součástí bývá i fluorescenční detektor, pomocí něhož je vyhodnocována syntetizovaná DNA (Šilhánková, 2008).

Nejčastějším způsobem, jak detekovat amplifikované úseky, je elektroforéza v agarosovém nebo polyakrylamidovém poli, což je separační metoda, při níž dochází k oddělování látek-produktů PCR ve stejnosměrném elektrickém poli, na základě velikosti náboje a relativních molekulových hmotností molekul produktu. Koncentrace agarosy se pohybuje v rozmezí mezi 0,8 – 3,5 % a je dána velikostí separovaných fragmentů, protože právě koncentrace agarosy určuje propustnost gelu pro jednotlivé fragmenty DNA a zároveň i pórovitost tohoto gelu. Nejčastěji se používá elektroforéza, kdy je gel ponořen v TAE pufru a vzorky jsou nanášeny do jamek vytvořených hřebínkem, který je do gelu umístěn před jeho zatuhnutím (McPherson a Moller, 2006).

Vzorky, respektive fragmenty DNA ze vzorků, se nechávají po určitou dobu pohybovat v gelu spolu se standardem a jsou pak dle svých délek detekovány ve formě bandů. Vzhledem k tomu, že ve stejnosměrném proudu záporný náboj putuje od katody k anodě a kladný od anody ke katodě, dochází k tomu, že náboj nukleových kyselin, který je záporný, putuje směrem k anodě. Je-li velikost fragmentu stejně velká, jako velikost fragmentu, která byla vypočítána, hodnotíme výsledek jako pozitivní a můžeme říci, že došlo k amplifikaci produktu (Čikoš et al., 2001).

K samotné vizualizaci pak dochází na transluminátoru s UV světlem (McPherson a Moller, 2006).

#### **2.1.4.2.2 Biochemické testy**

K druhové identifikaci bifidobakterií se velmi často používají biochemické testy. Jsou to testy, pomocí nichž jsou stanoveny fermentační charakteristiky bifidobakterií, ale i mnoha dalších mikroorganismů, nebo jejich enzymatická aktivita, za použití standardizovaných souprav. Tyto testy jsou soubory miniaturizovaných biochemických testů, které obsahují lyofilizované substráty, ke kterým je následně přidána suspenze s testovanými buňkami. Testy jsou vyhodnocovány na základě barevné změny. Pomocí těchto testů, lze celkem spolehlivě určit, o jaký druh mikroorganismu jde (anonym 1, 2).

##### **2.1.4.2.2.1 ANAEROTest 23**

ANAEROTest 23 je soubor 23 biochemických testů, které jsou určeny k rutinní identifikaci anaerobních sacharolytických bakterií, jejichž výskyt je jak v klinickém materiálu, tak v potravinách. Tyto testy jsou umístěny v mikrotitračních destičkách, vždy po osmi jamkách ve třech řadách. V těchto jamkách jsou umístěny lyofilizované substráty, ke kterým je přidávaná inokulovaná suspenze testovaných buněk. Tyto substráty jsou uvedeny v tabulce číslo 6.

Vyhodnocení probíhá po 48 hodinách, kdy je mikrotitrační destička umístěna v anaerobní atmosféře při 35 - 37°C. Identifikace se provádí pomocí programu TNW nebo kódové knihy (anonym 1).

**Tabulka 6: Substráty a testy na aktivitu enzymů obsažených v ANAEROTestu 23**

<b>IND</b>	indol	<b>NIT</b>	nitráty	<b>ESL</b>	eskulin
<b>GLU</b>	glukosa	<b>SUC</b>	sacharosa	<b>MNS</b>	manosa
<b>MLT</b>	maltosa	<b>SAL</b>	salicin	<b>RAF</b>	rafinosa
<b>FRU</b>	fruktosa	<b>TRE</b>	trehalosa	<b>CEL</b>	celobiosa
<b>GAL</b>	galaktosa	<b>MAN</b>	manitol	<b>XYL</b>	xylosa
<b>LAC</b>	laktosa	<b>RHA</b>	rhamnosa	<b>ARA</b>	arabinosa
<b>MLZ</b>	melecitosa	<b>NAG</b>	N-acetyl- $\beta$ -glukosidasa	<b>SOR</b>	sorbitol
<b>URE</b>	ureasa	<b>bGL</b>	$\beta$ -glukosidasa	<b>NOC</b>	kontrola

**2.1.4.2.2.2 API® 50 CHL**

API® 50 CH je standardizovaný soubor 50 biochemických testů, které slouží ke zjištění fermentačních profilů bifidobakterií a laktobacilů. Obsahuje 50 mikrozkušavek, v nichž jsou uloženy uhlíkaté substráty a to jak dehydratované sacharidy, tak jejich deriváty (heterosidy, polyalkoholy, uronové kyseliny). V tabulce číslo 7 je uveden seznam substrátů obsažených v soupravě API® 50 CHL (anonym 2).

K nim se následně inokuluje suspenze s testovanými buňkami. Dochází-li během inkubace ke zkvašování konkrétního substrátu daným kmenem, dojde v dané jamce ke snížení pH, vzniká kyselina, a tím i k barevné změně. Inkubace probíhá v anaerobní atmosféře, při 37°C po dobu 48 hodin. Následná identifikace se provádí na základě již zmíněné barevné změny. Pozitivní reakce má barvu žlutou, negativní fialovou (anonym 2).

**Tabulka 7: Seznam substrátů obsažených v soupravě API® 50 CH (Anonym 2)**

<b>0</b>	kontrola	<b>17</b>	inositol	<b>34</b>	melecitosa
<b>1</b>	glycerol	<b>18</b>	mannitol	<b>35</b>	rafinosa
<b>2</b>	erytriol	<b>19</b>	sorbitol	<b>36</b>	škrob
<b>3</b>	D-arabinosa	<b>20</b>	$\alpha$ -methyl-D-mannosid	<b>37</b>	glykogen
<b>4</b>	L-arabinosa	<b>21</b>	$\alpha$ -methyl-D-glykosid	<b>38</b>	xylitol
<b>5</b>	ribosa	<b>22</b>	N-acetyl glukosamin	<b>39</b>	gentibiosa
<b>6</b>	D-xylosa	<b>23</b>	amygdalin	<b>40</b>	turanosa
<b>7</b>	L-xylosa	<b>24</b>	arbutin	<b>41</b>	D-xylosa
<b>8</b>	adonitol	<b>25</b>	eskulin	<b>42</b>	D-tagatosa
<b>9</b>	$\beta$ -methyl-xylosa	<b>26</b>	salicin	<b>43</b>	D-fukosa
<b>10</b>	galaktosa	<b>27</b>	cellobiosa	<b>44</b>	L-fukosa
<b>11</b>	D-glukosa	<b>28</b>	maltosa	<b>45</b>	D-arabitol
<b>12</b>	D-fruktosa	<b>29</b>	laktosa	<b>46</b>	L-arabitol
<b>13</b>	D-mannosa	<b>30</b>	melibiosa	<b>47</b>	glukonát
<b>14</b>	L-sorbosa	<b>31</b>	sacharosa	<b>48</b>	2keto-glukonát
<b>15</b>	rhamnosa	<b>32</b>	trehalosa	<b>49</b>	5keto-glukonát
<b>16</b>	dulcitol	<b>33</b>	inulin		

#### 2.1.4.2.2.3 API 20A®

API 20A® je test, který slouží k identifikaci anaerobních bakterií rychle a snadno za pomoci 21 biochemických testů. Aby tato identifikace byla zcela přesná, je vhodné tuto metodu doplnit i o jiné identifikační metody, jako je například mikroskopická morfologie a další. API 20A® sestává z 20 mikrozkomavek, které stejně jako API® 50 CHL obsahují dehydrované substráty, které se inokulují suspenzí s obsahem buněk, které jsou testovány. Během inkubace, která probíhá 24 hodin při 36°C, dochází k barevným změnám, které jsou způsobené probíhajícími metabolismem inokulovaných buněk. Často je barevná změna podpořena přidáním činidla. Výsledky se odečítají z odečítací tabulky na základě barevné změny média. Identifikace pak probíhá pomocí identifikačního softwaru (anonym 2).

#### 2.1.4.2.3 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF je moderní metoda, která se stala v posledních zhruba deseti letech velmi mocným nástrojem při analýze biomolekul (Jurinke et al., 2004). Je to metoda velmi přesná, izolované vzorky vydrží velmi dlouho stabilní, ale její velkou nevýhodou je její finanční náročnost (Štursa et al., 2010).

MALDI-TOF se využívá k analýze biologických polymerů, kvasinek (Cabezón et al., 2009), k identifikaci gram pozitivních (Parisi et al., 2008) i gram negativních bakterií (Lash et al., 2009) nebo při výzkumu nádorových onemocnění (Liu et al., 2010). Její výhodou je, že vzorky mohou být izolovány jak přímo ze životního prostředí, tak ze zvířat, z biologického materiálu nebo z potravin (anonym 3).

Principem metody MALDI-TOF je ozáření směsi vzorku a matrice nanosekundovým pulsem, kdy dochází k tomu, že matrice absorbuje energii pulsu. Její následný rozklad ionizuje molekuly vzorku, a to především ty ribosomální proteiny, které jsou přítomné ve vysokých koncentracích. Ionty, které jsou pozitivně nabitý, jsou pak na krátkou vzdálenost urychleny velmi silným elektrickým polem. Následně vstoupí do vakua, které je v trubici detektoru, a začnou se pohybovat rychlostí, která je úměrná jejich hmotnosti a náboji. Doby letu iontů jsou velmi přesně měřeny a výpočetně konvertovány na poměr  $M_r$  (relativní molekulová hmotnost) a náboje. Hmotnostní spektra, která se tímto způsobem získají, jsou druhově specifická a představují tak jejich fingerprint, molekulární identifikátor (anonym 3).

## 2.2 Probiotika

Vývoj probiotik má dlouhou historii. Jako první tento termín použili v roce 1965 vědci Lilly a Stillwell, když popisovali organismy, které na základě svých metabolismů stimulovali růst jiných. Tento termín byl zároveň poprvé použit v kontrastu se slovem antibiotikum (Lilly a Stillwell, 1965).

V roce 1971 Sperti použil termín „extrakt z tkání, který stimuluje růst mikroorganismů“ (Spert, 1974).

Ovšem prvním, kdo sestavil formální definici probiotik, byl v roce 1974 Parker, který řekl, že probiotika jsou organismy, látky, enzymy, aminokyseliny a další, které přispívají k mikrobiální rovnováze střev. Přičemž tato definice v sobě ještě zahrnovala krmná antibiotika (Parker, 1974).

Tuto Parkerovu definici v roce 1989 upřesnil Fuller, který probiotika definoval jako živý mikrobiální krmný doplněk, který pozitivně ovlivňuje rovnováhu střevní mikrobioty hostitelského zvířete a je tedy opakem antibiotik (Fuller, 1989).

Podle Havenaara (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 mikrobioty.

Oficiální definice probiotik, která je v tomto znění platná dodnes, byla přijata až v roce 2002 a zní takto: Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v přiměřeném množství, přinášejí hostiteli zdravotní přínos (FAO/WHO, 2002). A i přesto, že v této definici bylo řečeno, že mikroorganismy musí být živé, podle Ouwehanda et al. (2011), bylo prokázáno, že pozitivní účinky prokazují i neživé složky probiotických bakterií. A to jak na člověka, tak na zvíře (Heinrichs et al., 2009).

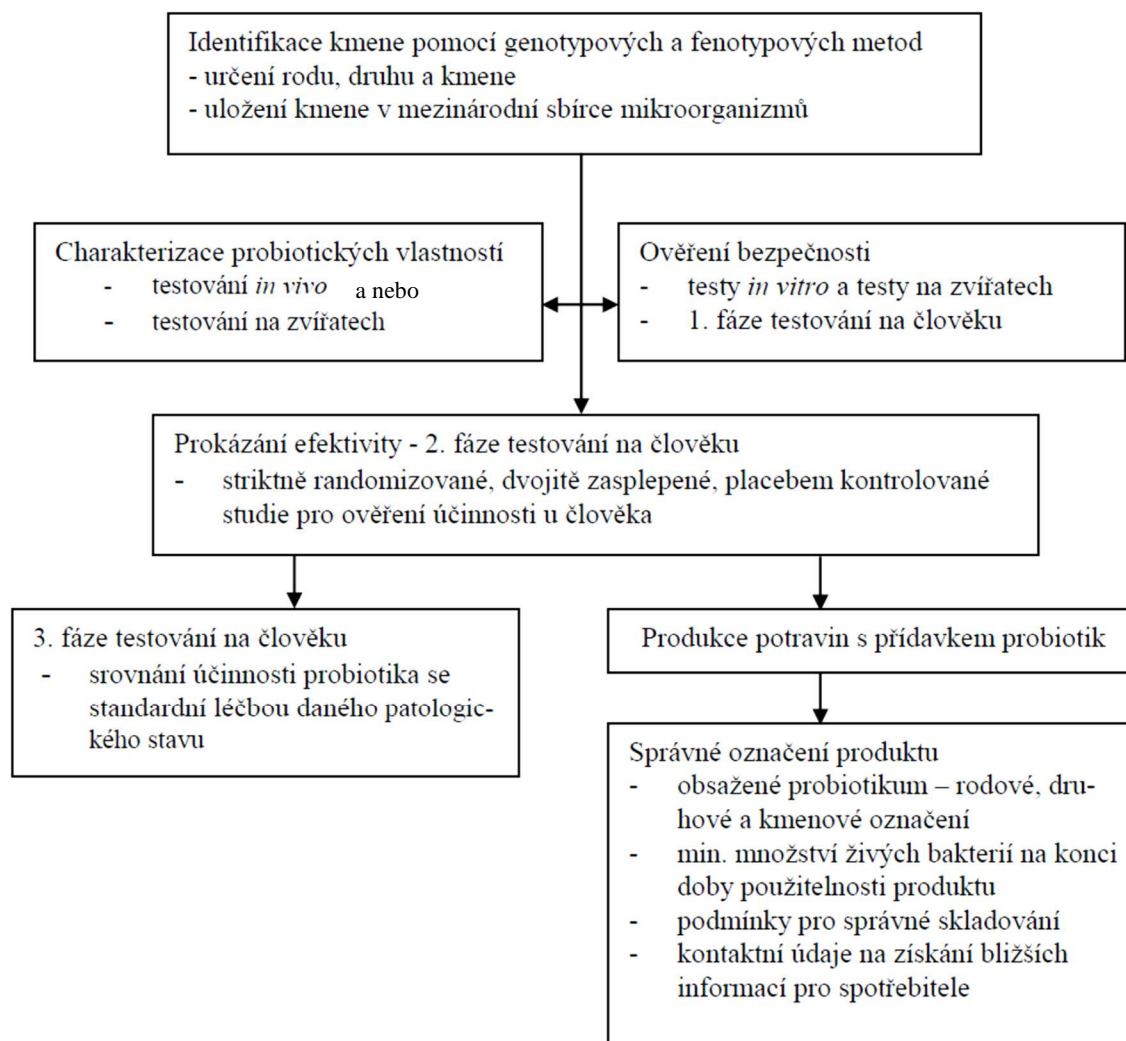
Pozitivních účinků probiotik je udáváno hned několik, avšak EFSA dosud žádnému probiotiku zdravotní tvrzení neschválila, vyjma živých jogurtových kultur (*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*), kde říká, že živé kultury v jogurtu nebo kysaném mléčném výrobku zlepšují trávení laktosy u jedinců, kteří mají s trávením laktosy problémy (anonym 4). Výroba probiotik se proto řídí předpisy pro potraviny (Rada, 2010) a používání probiotik je v České republice vymezenou vyhláškou č. 225/2008 Sb.

Fuller (1989) uvádí pět vlastností, které by měly být při výběru probiotických organismů sledovány. V první řadě by se mělo jednat o mikroorganismus, který má na hostitele pozitivní vliv a zároveň musí být nepatogenní. Měl by být živý a vyskytovat se v těle hostitele v hojném počtu. Další důležitou vlastností tohoto organismu by měla být schopnost přežívat a zároveň



vytvářet metabolickou aktivitu v těle hostitele, to znamená, být odolný vůči organickým kyselinám a nízkému pH. A poslední, pátou sledovanou vlastností, je schopnost přežívat dlouhou dobu za standardních skladovacích podmínek. Gilliland (2001) uvádí, že by tento mikroorganismus měl antagonisticky působit na patogenní bakterie.

**Obrázek 4: Pokyny pro hodnocení probiotik pro užití v potravinách (podle FAO/WHO, 2002, upraveno)**



Než jsou ale probiotické bakterie zařazeny do potravin, musí proběhnout jejich prověření. Stručný postup tohoto procesu je popsán v následujícím odstavci a v tabulce 8 a 9.

Nejdříve je nutno testovaný kmen identifikovat a charakterizovat, a to jak pomocí fenotypových, tak ale i pomocí molekulárně genetických metod. Takto zidentifikovaný mikroorganismus, až na úroveň kmene, je uložen v mezinárodní sbírce mikroorganismů. Dalším krokem je testování takzvaných funkčních charakteristik, což jsou testy probíhající *in vitro* i na zvířatech. Testuje se zde adherence na střevní epithel, rezistence na kyseliny, rezistence na žluč nebo produkce specifických metabolitů. Dalším a velmi důležitým krokem

je nutnost prokázat, že se jedná o bezpečné kultury. Toto testování opět probíhá pomocí *in vitro* testů a stejně tak pomocí testů na zvířatech. V konečné fázi jsou kultury testovány na dobrovolnících. Při těchto testech musí být naprosto vyloučeny jakékoli faktory patogenity. Jedná se především o tvorbu enterotoxinů a enteroinvazivitu. Tato testování probíhají pomocí dvojité zaslepených, randomizovaných a placebem kontrolovaných pokusů, které musí být alespoň dvakrát zopakovány. V poslední fázi probíhá výroba probiotického preparátu v souladu s technologickými vlastnostmi (FAO/WHO, 2002). Schéma tohoto postupu je zobrazeno na obrázku číslo 4.

**Tabulka 8: požadavky na probiotika (podle Kaur et al., 2002, upraveno)**

<b>Mikrobiologické bezpečnostní požadavky:</b>
Možnost přesného taxonomického zařazení
Humánní původ (pokud jsou určeny pro lidskou konzumaci)
Netoxické a nepatogenní
Geneticky stabilní
Schopnost přežívat, růst a být metabolicky aktivní v trávicím ústrojí příjemce
Potenciálně rezistentní proti antimikrobiálním substancím původní mikrobioty příjemce
Rezistentní proti žaludeční kyselině a žlučovým kyselinám
Průmyslové parametry
Stabilita žádaných vlastností během výroby, transportu a skladování
Příznivé organoleptické vlastnosti
odolnosti vůči fágům

**Tabulka 9: požadavky na probiotika (podle Kaur et al., 2002, upraveno)**

<b>Prospěšnost pro zdraví:</b>
Schopnost kolonizace a adherence na střevní epitel
Antagonistický vliv na patogenní mikroorganismy
Schopnost tvorby antimikrobiálních substancí
Schopnost imunomodulace
Měřitelná a klinicky doložitelná užitečnost pro zdraví příjemce

V roce 2006 byla v České republice založena Společnost pro probiotika a prebiotika (SPP), jejíž cílem je posuzování kvality probiotik, ale i prebiotik. Na základě analýz potom SPP uděluje logo výrobkům, které obsahují kvalitní probiotické a probiotické ingredience (anonym 5).

Dříve se jako probiotické mikroorganismy používaly hlavně bakterie mléčného kvašení (BMK), a to díky jejich relativně snadné kultivaci, nepatogenitě a dlouhodobé zkušenosti získané v mlékárenském průmyslu při zpracování mléka (Rada a Marounek, 2005). Dnes se ale

kromě BMK používají i jiné mikroorganismy. V následující tabulce, tabulce číslo 10 jsou některé z nich uvedeny.

**Tabulka 20: Mikroorganismy používané jako probiotika (podle Rada a Marounek, 2005, upraveno)**

BMK:	Bifidobakterie:	Ostatní bakterie:	Mikroskopické houby:
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bacillus toyoi</i>	<i>Candida pontolopesii</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Bacillus natto</i>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		<i>Bacillus mesentericus</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Bacillus licheniformis</i>	
<i>Lactobacillus fermentum</i>		<i>Clostridium butyricum</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>			
<i>Lactobacillus helveticus</i>			
<i>Lactococcus lactis</i>			
<i>Enterococcus faecium</i>			
<i>Enterococcus faecalis</i>			
<i>Pediococcus pentosaceus</i>			

Pozitivní účinky probiotických mikroorganismů jsou především v tom, že upravují střevní mikrobiotu (Douglas a Sanders, 2008). Je ale potřeba, aby byla konzumována pravidelně (Kaur *et al.*, 2002). Nevorál (2005) uvádí, že probiotika mají jak výživovou funkci, tak zdravotní. Mezi výživové funkce probiotik patří jejich produkce vitamínů řady B a K. Stejně tak jako produkce antimikrobiálních látek, mezi které patří organické kyseliny, bakteriociny nebo peroxid vodíku. Pomocí těchto látek probiotické organismy inhibičně působí na bakterie, které jsou pro nás nežádoucí. Ovlivňují produkci toxinů, mají vliv na metabolismus bakterií a usnadňují rozklad některých živin. Mezi zdravotní funkce patří schopnost některých kmenů probiotických bakterií adherovat na střevní epitel a tím blokovat vazebná místa pro patogenní bakterie, a také jejich schopnost stimulace specifické i nespecifické imunity.

**Mezi další často udávané zdravotní účinky probiotik patří například tyto:**

- Lepší stravitelnost laktosy u lidí s laktosovou intolerancí (Shortt a O'Brien, 2004).
- Působí preventivně proti osteoporóze (Lourens-Hattingh *et al.*, 2001).
- Tlumení příznaků alergií (Ouweland, 2007).
- Imunostimulační účinky (Dong *et al.*, 2010).

- Prevence kolorektálního karcinomu (Rafter et al., 2007).
- Zmírnění zácpy (Banaszkiewicz a Szajewska, 2005).
- Podpůrná terapie zánětlivých střevních onemocnění a průjmů (Bleichner et al., 1997).
- Ustavení či obnovení vyvážené mikrobioty tlustého střeva (Rada, 2010).
- Snížení hladiny krevního celkového a LDL cholesterolu (Roberfroid, 2000).
- Snížení výskytu infekcí způsobené bakterií *Helicobacter pylori* (Schrezenmeir a de Vrese, 2001).
- Příznivý efekt na metabolismus minerálů, zejména pak na hustotu a stabilitu kostí (Schrezenmeir a de Vrese, 2001).
- Snížení množství nepříznivých metabolitů (Schrezenmeir a de Vrese, 2001).
- Osvobození od syndromu dráždivého tračníku (Schrezenmeir a de Vrese, 2001).

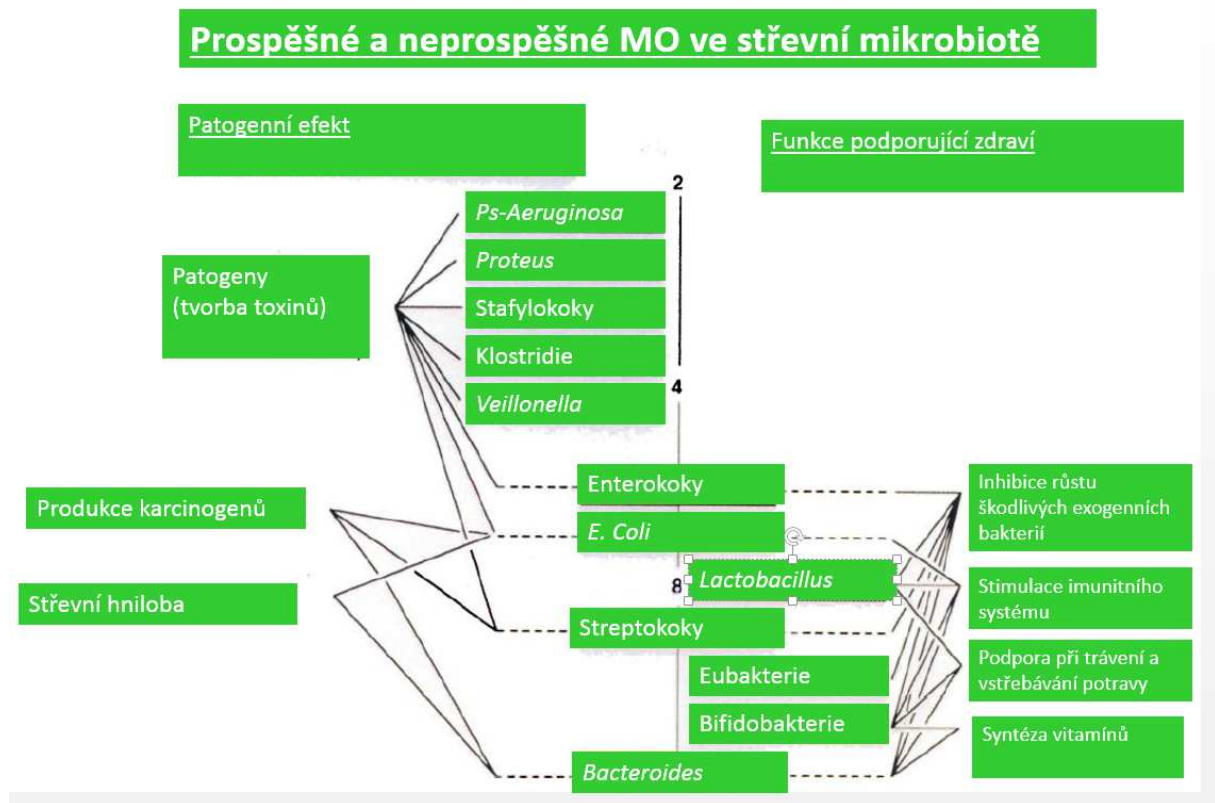
## 2.3 Prebiotika

Stejně jako probiotika, tak i prebiotika prošla dlouhým vývojem, co se jejich definice týče. Jedna z prvních definic předpokládá, že probiotika pro své přežití potřebují zdroj sacharidů, které by mohla fermentovat, ale zároveň tento zdroj nesmí podléhat lidskému metabolismu před dosažením tlustého střeva (Bouhnik et al., 1996). Další definice říká, že prebiotika jsou nestravitelné sacharidy, které podporují proliferaci bifidobakterií a laktobacilů (Reyed et al., 2004).

Avšak nejpoužívanější definice je ta, která říká, že prebiotika jsou nestravitelná složka 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).

Aby byly sacharidy zařazeny mezi prebiotika, musí splňovat kritéria, která byla pro jejich klasifikaci stanovena. Prvním z těchto kritérií je, že daná složka potravy musí být rezistentní vůči kyselině chlorovodíkové v žaludku, musí být rezistentní vůči hydrolyzaci pomocí savčích enzymů a musí být rezistentní vůči gastrointestinální absorpci. Dále musí být fermentovatelná pomocí střevní mikrobioty (Roberfroid, 2007) a musí splňovat definici dle Gibson a Roberfroid (1995), viz výše.

Obrázek 5: Prospěšné a neprospěšné MO ve střevní mikrobiotě (podle Gibson a Roberfroid, 1995, upraveno)



Hojné využívání prebiotik začalo především kvůli problémům s používáním probiotik. Často se stává, že některé probiotické mikroorganismy mají problémy přežít průchod gastrointestinálním traktem, především tedy žaludkem, či tenkým střevem a nemohou tedy dostatečně osídlit střevo tlusté. To se děje především kvůli velké konkurenci přirozené střevní mikrobioty (Roberfroid, 2002). Prebiotický účinek tedy znamená, že zavedením specifické potravy pro probiotické mikroorganismy dojde ke zvýšení počtu a aktivity těchto zdravých prospěšných bakterií v gastrointestinálním traktu (Hrubý, 2007). Prospěšné a neprospěšné MO ve střevní mikrobiotě jsou uvedeny na obrázku číslo 5.

Jakákoli potravinová složka, která se dostane do tlustého střeva, se automaticky stává potenciálním prebiotikem. Substrátem, který jako hlavní umožňuje v tlustém střevě růst probiotických mikroorganismů, především bifidobakterií, jsou oligosacharidy (Gibson a Fuller, 2000). Prebiotikem nemusí ale být jen oligosacharidy. Mohou to být také jednoduché alkoholické cukry, disacharidy a dokonce i polysacharidy (Rotel a Gibson, 2002). Musí to ale být látky, které dodávají probiotickým mikroorganismům zdroj energie (Turroni et al., 2011). Tyto látky, které jsou většinou složeny z několika molekul

sacharidů, jsou odolné vůči trávicím enzymům, ale zároveň mohou být přeměňovány, metabolizovány právě těmito prospěšnými střevními bakteriemi (Gibson a Fuller, 2000).

Mezi oligosacharidy, které jsou využívány jako prebiotikum a byly zveřejněny po *in vitro* a *in vivo* studiích patří rafinosa a stachyosa, což jsou oligosacharidy vyizolované ze sóji (Gibson a Fuller, 2000), dále transgalaktosidy (Tanaka et al., 1983), fruktooligosacharidy (Gibson a Roberfroid, 1995), galaktooligosacharidy (Russell et al., 2011), arabinoxylan, arabinogalaktan (Turrone et al., 2011), inulin (Gibson et al., 1995), laktulosa (Russell et al., 2011) a další. Jejich probiotický účinek je uveden v tabulce 11.

Tabulka 11: Prebiotický efekt různých oligosacharidů (podle Roberfroid, 2007, upraveno; Biliaderis a Izydorczyk, 2007)

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

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

**Fruktooligosacharidy (FOS) a inulin** jsou polymerní látky složené z D-fruktosy, která je mezi sebou spojena vaznou  $\beta$ -2-1 a na konci většinou bývá navázána pomocí vazby  $\alpha$ -1-2 glukosa. Tyto látky jsou přítomny v rostlinném materiálu. Nejčastěji je nalezneme v česneku, cibuli, topinamburech nebo banánech (Rada a Marounek, 2005). A získávají se buď enzymaticky, pomocí hydrolýzy inulinu nebo syntesou ze sacharosy (Tuohy et al., 2005).

Inulin je vhodným zdrojem uhlíku pro *Bifidobacterium bifidum* a některé druhy *Bifidobacterium longum* (Reyed, 2007).

**Galaktooligosacharidy (GOS) a oligosacharidy ze sóji** mají složitou chemickou strukturu, která je naznačena v tabulce číslo 12. Tyto oligosacharidy se vyskytují především v mateřském mléce a v malém množství je můžeme nalézt i v mléce kravském nebo luštěninách (Tuohy et al., 2005).

**Xylooligosacharidy (XOS)** jsou oligosacharidy složené z D-xylosy, která je glykosidicky spojena vazbou  $\beta$ -1-4. Některé zdroje uvádí, že právě XOS jsou dobré bifidogenní stimulanty (Rycroft et al., 2001).

**Laktulosa** je disacharid vznikající izomerací laktosy (Crittenden, 1999). Je to nejčastěji používaný oligosacharid (Crittenden a Playne, 1996) a to především v Evropě a Spojených státech amerických (Russell et al., 2011). Přibližně v 50. letech 20. století byla laktulosa přidávána do kojenecké stravy, jako doplněk, který měl zajistit zvýšení počtu bakterií rodu *Lactobacillus* ve střevech novorozenců. Ale vzhledem k tomu, že specifita tohoto substrátu nebyla potvrzena, tak se postupně od tohoto postupu upustilo (Collins a Gibson, 1999).

Tabulka 13: Prebiotické oligosacharidy (Crittenden a Playne, 1996; Roberfroid a Savin, 2000)

Triviální název:	Chemická struktura:	Získ:
Galaktooligosacharidy	[Gal( $\beta$ 1-),,3/4/6)Gal( $\beta$ 1-4)Glc	enzymatickou syntésou z laktosy
Fruktooligosacharidy/Inulin	[Fru( $\beta$ 2-),,1)Glc	extrakcí z přírodních zdrojů
		enzymatickou hydrolýzou z přírodních polymerů
		enzymatickou syntésou ze sacharosy
Palatinosa	Glc( $\alpha$ 1-6)Fru	enzymatickou syntésou ze sacharosy
Izomaltulosooligosacharid	[Glc( $\alpha$ 1-]6)Glc $\alpha$ 1-6)Fru	
Oligosacharidy sójových bobů	[Glc( $\alpha$ 1-),,6)Glc $\alpha$ 1-2)Fru	extrakcí z přírodních zdrojů
Laktosacharosa	Gal( $\beta$ 1-4)Glc( $\alpha$ 1-2)Fru	enzymatickou syntésou z laktosy
Xylooligosacharidy	[Xyl( $\beta$ 1-),,4)Xyl	enzymatickou hydrolýzou z kukuřičného xylanu

## 2.4 Synbiotika

Synbiotika jsou kombinací prebiotik a probiotik (Heinrichs et al., 2009). Jsou to tedy produkty, které obsahují, jak prebiotika, která selektivně podporují růst probiotik, tak probiotika. Od obou těchto složek se očekává takzvaný synergický účinek, proto název synbiotikum (Schrezenmeir a de Vrese, 2001; Rada, 2010). Obě výše zmíněné složky by měla být v produktu v účinném poměru (Schrezenmeir a de Vrese, 2001).

Synbiotika slouží jako podpora pro přežívání a usídlování dodávaných bakterií v trávicím traktu tím, že aktivují metabolismus nebo stimulují růst konkrétních druhů bakterií v gastrointestinálním traktu, které následně podporují zdraví hostitele (Meile, 1998).

Synbiotikum musí mít vhodně zvolenou kombinaci probiotik a prebiotik, aby mohlo správně plnit svou funkci, kterou je posílení střevní mikrobioty. Základem je správně zvolené prebiotikum. Pokud chceme podpořit například růst bifidobakterií v tlustém střevě a použijeme jako prebiotikum fruktooligosacharidy a jako probiotikum právě rod *Bifidobacterium*, mělo by být vše v pořádku. Pokud ale jako probiotikum použijeme například kmen *Lactobacillus casei* a jako prebiotikum ponecháme fruktooligosacharidy, synbiotikum nebude funkční. Je to z toho důvodu, že zvolené prebiotikum není pro tento kmen vhodné (Schrezenmeir a de Vrese, 2001).

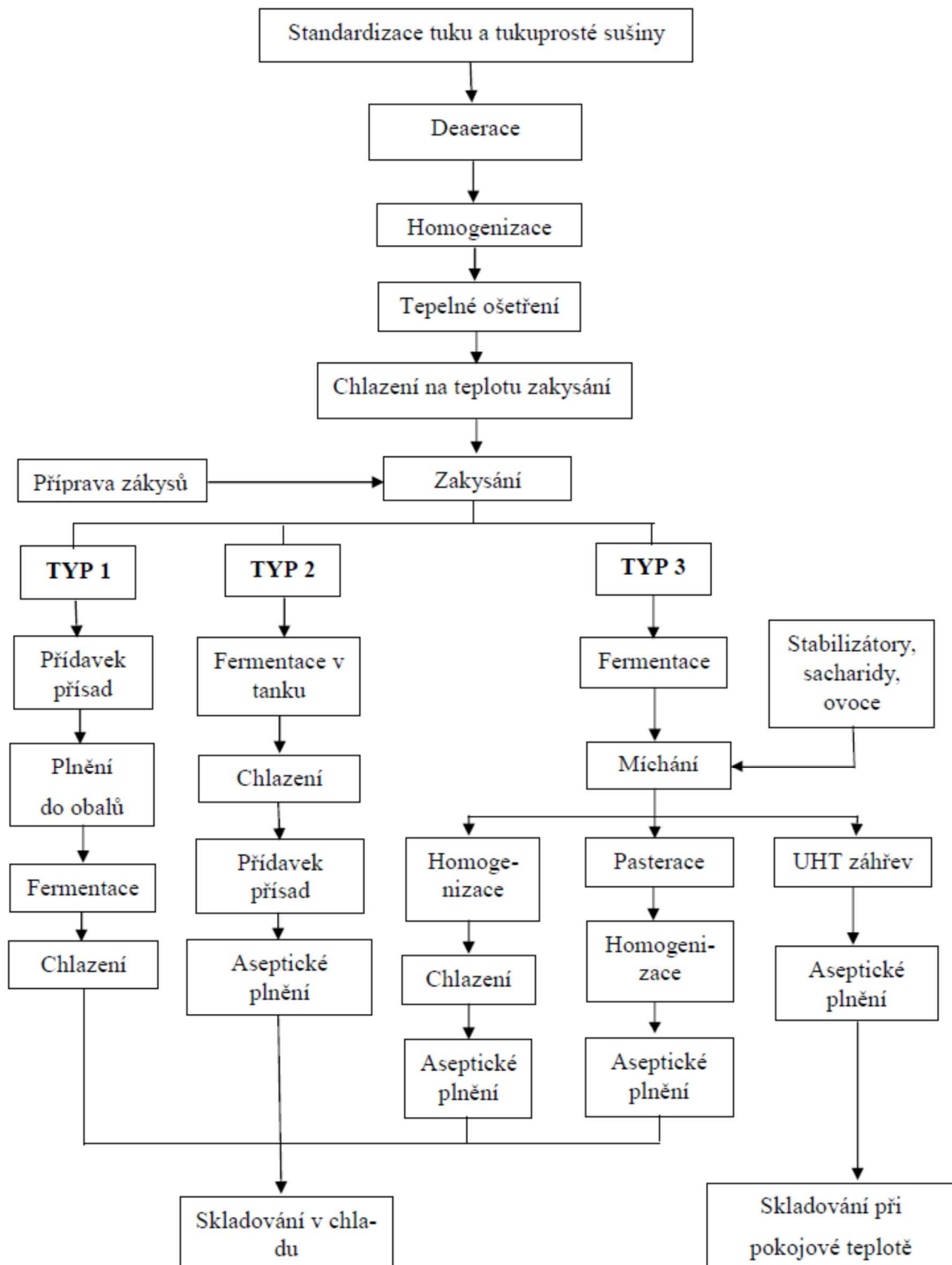
Správnou kombinací probiotik a prebiotik, tedy vhodným synbiotikem, které zajistí snadnější přežití probiotických bakterií, jsou například: bifidobakterie v kombinaci s fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy nebo laktobacili v kombinaci s laktionem (Collins a Gibson, 1999).



## 2.5 Mléčné kysané výrobky a jejich charakteristika

Jako kysané mléčné výrobky jsou dle vyhlášky číslo 77/2003 Sb. definovány ty mléčné výrobky, které vznikly kvašením mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsí za použití mikroorganismů, které jsou uvedeny právě ve výše zmíněné vyhlášce.

Obrázek 6: Schéma výroby fermentovaných mléčných výrobků (Kadlec, 2002)



Zároveň jsou to výrobky, které jsou konzervovány pomocí kyseliny mléčné, která vzniká při fermentaci sacharidů. Na základě přidané mlékařské kultury během procesu výroby, rozdělujeme fermentované mléčné výrobky na jogurty a jogurtové nápoje, acidofilní mléka, kefíry, kysaná mléka a zkysané smetany (Tamine a Robinson, 2001). Obecné schéma výroby fermentovaných mléčných výrobků je znázorněno na obrázku číslo 6.

### **2.5.1 Mléčné kvašení**

Fermentace neboli kvašení je proces, kdy dochází k přeměně látek za účasti mikrobiálních enzymů. Při tomto procesu se v důsledku metabolismu některých mikroorganismů přeměňují složitější organické látky na látky jednodušší (Hansen, 2004). Meziprodukty těchto katabolických reakcí později vstupují do oxidačně-redukčních reakcí, přičemž substrát je aktivován substrátovou fosforylací za pomoci ATP a zodpovědných enzymů. Vodík je při oxidačně-redukčních reakcích přenášen pomocí NAD-dehydrogenasy a konečným akceptorem vodíku a elektronů je pak jednodušší organická látka (Velíšek a Cejpek, 2008). Díky této rozkladné proceduře získávají finální produkty svoji specifickou vůni a chuť (Hansen, 2004).

Pro mléčnou fermentaci je hlavním zdrojem energie laktosa, která je rozkládána několika způsoby na kyselinu mléčnou. Těmi hlavními metabolickými drahami jsou homofermentativní kvašení, kde hlavním produktem je pouze kyselina mléčná a heterofermentativní mléčné kvašení s více hlavními produkty, kterými jsou například kyselina octová, CO<sub>2</sub>, ethanol nebo vodík (Forman, 1996; Vodrážka, 2002; Kostinek et al., 2007).

#### **2.5.1.1 Homofermentativní**

Homofermentativní kvašení je způsob fermentace, kdy BMK přeměňují laktosu na kyselinu mléčnou.

Většina homofermentativních druhů transportuje sacharidy do buněk pomocí systému fosfotransferáz. Během tohoto procesu dochází k tomu, že je laktosa fosforylována na laktoso-6-fosfát a následně pak hydrolyzována na galaktoso-6-fosfát a glukosu. Vzniklý galaktoso-6-fosfát je degradován na glyceraldehyd-3-fosfát. Glukosa, která vznikla ve stejné fázi jako již zmíněná galaktosa-6-fosfát, je fosforylována na glukoso-6-fosfát. Vzniklé fosfátové sacharidy jsou postupně aktivovány na fruktoso-1,6-bisfosfát, který je dále zpracován Embden-Meyerhofovou drahou, glykolýzou, přes glyceraldehyd-3-fosfát až na kyselinu

pyrohroznovou, která je přeměněna na finální produkt homofermentativního kvašení L(+) kyseliny mléčné (Velíšek a Cejpek, 2008).

Při druhém způsobu homofermentativního kvašení je laktosa nejdříve akumulována za pomoci specifické permeasy a následně je hydrolyzována  $\beta$ -galaktosidásou na glukosu a galaktosu. Glukosa je v další fázi metabolizována na kyselinu mléčnou, kdežto galaktosa je postupně uvolňována do růstového média. Přeměna glukosy pobíhá podle schématu Embden- Meyerhofova, to znamená, že je nejdříve fosforylována a izomerována na fruktosa- 1,6-bisfosfát, který je pomocí aldolasy štěpen na dvě molekuly triosafsfátu. Na glyceralddehyd-3-fosfát, který oxiduje za působení specifické dehydrogenasy na 1,3- bisfosfoglycerát, a dihydroxyacetonfosfát. Následkem enolizace a defosorylace vzniká kyselina pyrohroznová. Galaktosa, která je postupně uvolňována do média, podléhá také několika katabolickým reakcím. První z nich je fosforylace, při které dochází k přeměně galaktosy na galaktosa-1-fosfát. Ten se dále mění na glukosa-1-fosfát, který za pomoci enzymu fosfoglukomutasy dá za vznik glukosa-6-fosfát, který už je standardním meziproduktem glykolýzy (Hickey et al., 1986; Boháčenko et al., 2007).

Mezi bakterie mléčného kvašení, které zpracovávají laktosu tímto způsobem, tedy homofermentativně se řadí *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus* (Robinson, 1995; Gajdůšek, 2002), *Enterococcus faecalis* (Subramanian et al., 2014).

### 2.5.1.2 Heterofermentativní

Heterofermentativí kvašení je proces, kdy BMK přeměňují laktosu na kyselinu mléčnou, ethanol, CO<sub>2</sub> a kyselinu octovou.

Sacharidy uvnitř buněk jsou kinázami fosforylovány za vzniku glukosy-6-fosfátu a fruktosy- 6- fosfátu. Isomerasa přemění fruktosu-6-fosfát na glukosu-6-fosfát, který je dál metabolizován. Z glukosy-6-fosfátu vznikne glyceralddehyd-3-fosfát a acetylfosfát za současného uvolnění CO<sub>2</sub>. Vzniklý acetylfosfát je postupně přeměňován přes acetyl-CoA na acetaldehyd a dále až na ethanol. Naopak glyceralddehyd-3-fosfát je pomocí glykolytických enzymů zpracován přes kyselinu pyrohroznovou až na kyselinu L(+) mléčnou (Lee a Salminen, 2009).

Mezi bakterie mléčného kvašení, které jsou heterofermentativní Robinson (1995) řadí tyto: *Lactobacillus breve*, *Lactobacillus buchneri* a *Lactobacillus fermentum*.

### 2.5.1.3 Fakultativně heterofermentativní

Fakultativně heterofermentativní kvašení je proces, kdy BMK kromě kyseliny mléčné produkují ještě ethanol, formiát a acetát. Zároveň je to proces, který může probíhat za nestandardních podmínek, jako je zvýšené pH nebo snížená teplota. Při tomto kvašení vzniká pomocí enzymu pyruvátformiátlyasy (PFL) z pyruvátu acetyl-CoA, který je za pomoci  $O_2$  inaktivován. Tímto krokem se naopak aktivuje jiná metabolická dráha, která využívá k přeměně pyruvátu enzym pyruvátdehydrogenasy (PHD) za vzniku  $CO_2$ , acetyl-CoA a NADH. Acetyl-CoA je následně metabolizován na acetát a ethanol. Mezi fakultativně heterofermentativní rody se řadí například *Lactobacillus casei* (Hofvendahl a Hahn-Hagerdal, 2000; Kostinek et al., 2007).

### 2.5.1.4 Fermentace bifidobakterií

Rod *Bifidobacterium* využívá při fermentaci svoji specifickou metabolickou dráhu. Ta se liší od homofermentativního, heterofermentativního i fakultativně heterofermentativního způsobu kvašení. Důvodem proč fermentace probíhá pomocí jiné metabolické dráhy je především nepřítomnost enzymů glukoso-6-fosfátdehydrogenasy a aldolasy. Pomocí enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketoasy, který je specifický právě pro bifidobakterie, dochází ke štěpení hexos, fruktoso-6-fosfátu, na acetylfosfát a erytroso-4-fosfát (Biavati et al., 2000). Dále pak štěpení probíhá dle schématu, které je uvedeno na obrázku číslo 7.

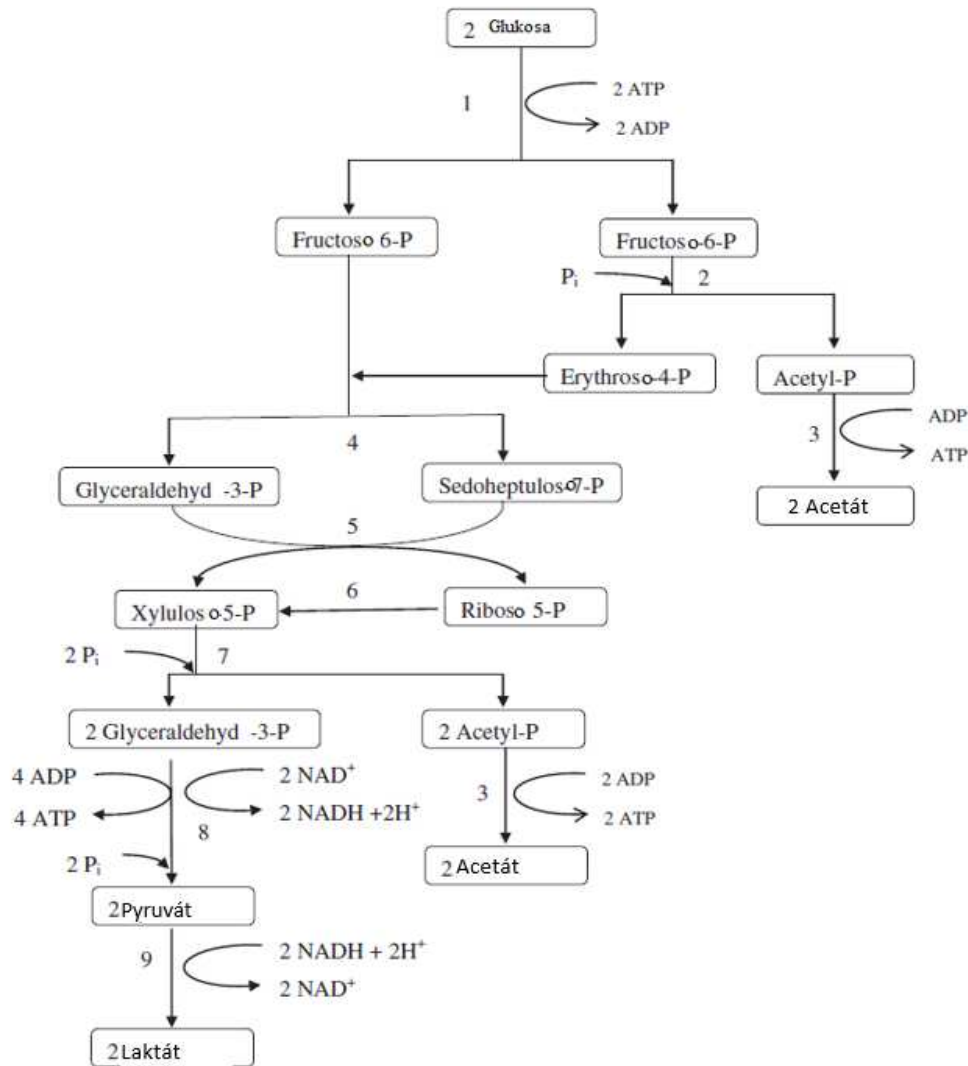
Fosfolytickým štěpením vzniká z pyruvátu kyselina mravenčí a acetylfosfát, který je redukován na ethanol. Tato redukční reakce často vyvolá změnu fermentační rovnováhy (Biavati a Mattrelli, 2012). Jako finální produkt vzniká kyselina octová a kyselina mléčná v poměru 3:2. Kyselina mléčná se nejčastěji vyskytuje v L formě, a proto je jednoduše metabolizovatelná dětským organismem (Maxa a Rada, 1996).

Bifidobakterie dokáží fermentovat velké množství sachardů, nejčastěji laktosu, rafinosu, galaktosu, glukosu nebo třeba sacharosu (Mayo a van Sinderen, 2010), ale manitol a sorbitol dokaže zkvašovat jen velmi malé množství kmenů, viz příloha číslo 6 (Ventura et al., 2004). Naopak vůbec využít nedokáží bifidobakterie rhamnosu, sorbosu a dulcitol (Rasic a Kurmann, 1983).

Bifidobakterie také produkují velmi malé množství kyseliny jantarové a mravenčí (Rasic a Kurman, 1983), zatímco neprodukuje oxid uhličitý, kyselinu propionovou ani máselnou (Sedláček, 2007). Za aerobních podmínek vzniká peroxid vodíku, který inaktivuje

F6PPK, tedy enzym který je zodpovědný za fermentaci sacharidů u bifidobakterií (Rasic a Kurmann, 1983).

Obrázek 7: Metabolismus bifidobakterií (podle Prasanna et al., 2014, upraveno)



## 2.5.2 Druhy mléčných kysaných výrobků

Podle zvolené mlékařské kultury, technologického postupu a podle vyhlášky 77/2003 Sb. rozdělujeme fermentované mléčné výrobky do několika skupin, které jsou uvedeny v tabulce 13.

Startérové kultury jsou čisté kultury nebo směsi vybraných definovaných a živých mikroorganismů, které se používají jako inokulum v množství nejméně 10<sup>6</sup> buněk g<sup>-1</sup> potraviny s cílem zahájení procesu fermentace, která má zlepšit vzhled, chuť, vůni a trvanlivost produktu.

Od těchto startérových kultur se očekává, že zajistí správný průběh při výrobě, zvláště pak při procesu fermentace a zrání finálního produktu.

Podle mikroorganismů, které čisté startérové kultury obsahují, je **dělíme na:**

- bakteriální
- kvasinkové
- plísňové
- smíšené

Směsné kultury se dělí na mesofilní a termofilní.

Mezi mesofilní kultury patří základní **smetanová kultura**, která obsahuje bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. **Acidofilní kultura** obsahuje bakterie *Lactobacillus acidophilus*. **Kefírová kultura** s obsahem kvasinek a laktobacilů, *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* a *Candida kefyr*. A na pomezí stojí **ABT** kultura *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* a *Streptococcus thermophilus*.

Mezi termofilní kultury se řadí **jogurtová**, která obsahuje bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* (Ludwig et al., 2012).

Tabulka 13: Kysané mléčné výrobky dle vyhlášky 77/2003 Sb.

Druh výrobku	obsah tuku v % m/m	obsah sušiny tukuprosté v % m/m nejméně
kysaná smetana	více než 10 včetně	
kysané mléko včetně jogurtového	více než 0,5 včetně	
kysané mléko odtučněné	méně než 0,5 včetně	8,0
podmáslí	méně než 1,5 včetně	7,0
jogurt bílý smetanový	více než 10 včetně	
jogurt bílý	více než 3 včetně	
jogurt bílý se sníženým obsahem tuku	méně než 3	
jogurt bílý nízkotučný nebo odtučněný	méně než 0,5 včetně	8,2

### 2.5.3 Stanovení, izolace a identifikace bifidobakterií z mléčných kysaných výrobků

Rod *Bifidobacterium* je v dnešní době hojně využívaným rodem. Ačkoli je jejich přirozeným teritoriem především intestinální trakt živočichů, jejich pozitivní vliv na zdraví hostitele vedl k tomu, že začaly být bifidobakterie začleňovány i do mlékařského průmyslu.

Bifidobakterie se v dnešní době běžně používají při výrobě fermentovaných mlék a to jak samostatně, tak i v kombinaci s jinými BMK, což to je jeden z hlavních důvodů, proč stoupl zájem o stanovování bifidobakterií právě v těchto výrobcích (Rada a Koc, 2000). Dalším důvodem je fakt, že počet bifidobakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích by měl být před koncem expirační doby  $10^6/g$ , a proto je potřeba, aby používaná metoda byla rychlá a zároveň spolehlivá pro určení životaschopnosti těchto mikroorganismů. (Roy, 2001).

Aby bylo docíleno co největší selektivity, začaly se do médií přidávat různé selektivní faktory. Nejčastěji se jednalo o antibiotika (neomycin, paromomycin, gentamicin, atd.), ale byla přidávána například i žluč nebo kyselina nalixidová. Ukázalo se ale, že žádný z těchto selektivních faktorů nevykazuje dostatečnou selektivitu a navíc se zjistilo, že některé složky dokonce působí jako inhibitory růstu bifidobakterií (Rada a Koc, 2000).

Payne et al. (1998) provedli v roce 1998 studii, při které zjistili, že je velmi obtížné oddělit jednotlivé druhy bifidobakterií od sebe, vyskytují-li se ve smíšené kultuře. Jako nejoptimálnější pro rutinní stanovování rodu *Bifidobacterium* ve smíšených mléčných kulturách, se jim jevil AMC agar.

Rada a Koc (2000) testovali citlivost bifidobakterií na mupirocin. Při této studii byly vystaveny rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus* koncentraci mupirocinu, která se pohybovala v rozmezí 0,625 - 40 mg/l a zjistili, že toto množství, které je obsaženo v bujónu Wilkins-Chalgren jejich růst inhibuje. Naopak i množství mupirocinu 300 mg/l růst bifidobakterií neovlivňuje. Z výsledků, které při této studii získali, bylo vyvinuto selektivní médium pro izolaci rodu *Bifidobacterium* z fermentovaných mléčných výrobků a z probiotik, Wilkins-Chalgren agar s obsahem mupirocinu 100 mg/l. Toto médium absolutně inhibuje růst výše zmíněných rodů, vyjma rodu *Bifidobacterium*.

Roy (2001) doporučuje pro selektivní stanovení rodu *Bifidobacterium* ve fermentovaných mléčných výrobcích MRS médium obohacené o neomycin, paramomycin, nalidixovou kyselinu a lithium chlorid. Stejně tak jako Columbia agar obohacené o lithium chlorid a propionát sodný. Zároveň ale uvádí, že i přes vysoký výskyt selektivních médií není žádné zcela vhodné pro detekci rodu *Bifidobacterium*.

Rada a Maxa (2002) uvádí jako funkční médium pro tyto účely TOS agar, ale vzhledem k nedostupnosti a nákladnosti všech jeho složek, je nevhodné.

V roce 2013 se na českém trhu objevila jako novinka BSM médium (Sigma-Aldrich). Je to médium, které v mléčných výrobcích umožňuje selektivní výčet rodu *Bifidobacterium* technikou počítání kolonií za anaerobních podmínek. Toto médium, BSM (Bifidus selective medium), je na trhu ve verzi bujonu i agaru. Jeho výhodou je, že obsahuje látky, které způsobují barevnou reakci v přítomnosti kolonií bifidobakterií. BSM médium se využívá pro jeho rychlost a jednoduchost kontroly mléčných výrobků (anonym 6).

Tabulka 14: Složení TOS média dle ISO 29981/IDF 220:2010 Standard (Merck, Německo)

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
Galaktooligosacharidy TOS	10 g/ l
Pepton z kaseinu	15 g/ l
Voda	950ml
pH.....	6,7

Pro izolaci rodu *Bifidobacterium* z mléčných výrobků se v dnešní době nejčastěji používá v souladu s ISO Standard 29981/ IDF 220:2010 Standard (Merck, Německo), **TOS-MUP** médium. Fungování tohoto média je založeno na přidání několika selektivních faktorů. Jsou to TOS oligosacharidy, mupirocin, LiCl, propionát sodný a další látky uvedené v tabulce číslo 14. Mupirocin je antibiotikum, které inhibuje růst bakterií rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*, zatímco rod *Bifidobacterium* je vůči němu rezistentní. Je to antibiotikum izolované z bakterie *Pseudomonas fluorescens* (Udo et al., 1999) a má nepřímý účinek na syntézu bílkovin tím, že inhibuje syntézu t-RNA inaktivací izoleucyl-t-RNA syntetázy (Bednář et al., 1996). TOS galaktooligosacharidy jsou oligosacharidy, které působí specificky jako růstové faktory pro bifidobakterie. Ostatní BMK tyto látky využít neumí. Dalším selektivním faktorem v tomto médiu je propionát sodný, který působí jako inhibitor doprovodné mikrobioty, zatímco růstu bifidobakterií nikterak neaktivně neovlivňuje. Jako výživa



pro bifidobakterie je v tomto médiu použit kvasničný autolyzát a pepton z kaseinu. Zdrojem dusíku je síran amonný. Dihydrogenfosforečnan draselný a hydrogenfosforečnan didraselný v tomto případě slouží jako pufr při neutrálním pH a jako redukční činidlo, které poskytuje anaerobní podmínky je zde použit L-cystein. Síran hořečnatý je látka, která podporuje růst poškozených bifidobakteri. Tyto informace odpovídají ISO Standardu 29981/IDF 220:2010 (Merck, Německo).

## **3 Vědecká hypotéza a cíle práce**

### **3.1 Hypotéza**

Hypotézou je, že *Bifidobacterium bifidum* bude využívat mucin jako jedinný zdroj uhlíku, čímž se bude odlišovat od ostatních druhů bifidobakterií. Podobně specifické sacharidy umožní selektivní stanovení dalších druhů bifidobakterií v potravinách.

### **3.2 Cíl práce**

Cílem práce je vyvinout selektivní média pro stanovení *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve* v probiotických potravinách. Jako selektivní faktory budou použity různé zdroje uhlíku (monosacharidy, oligosacharidy a mucin).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Testované výrobky

Celkem bylo v této práci otestováno 16 probiotických výrobků českých i zahraničních firem, přičemž se jednalo o 13 výživových doplňků a 3 jogurty. Výrobky byly skladovány v ledničce při teplotě 4 °C. Všechny výrobky byly otestovány před koncem expirační doby. Seznam výrobků spolu s deklarovanými druhy bifidobakterií a výrobci je uveden v tabulce 15 a 16.

Tabulka 45: Seznam výrobců

Název výrobku	Výrobce	Původ
Super Dophilus	Pharma Agency, s.r.o.	Kanada
PROBIO-FIX	S&D Pharma Ltd.	UK
LAKTOACÍLKY baby	Swiss Natural®	Kanada
Biopron JUNIOR	VALOSUN a.s.	ČR
BIFOLAC BALANCE	Bifodan A/S	Dánsko
APO-BABY PROBIO	Cell Biotech International A/S	Dánsko
Lactobene	Montefarmaco Milano for NTC S.r.l.	Itálie
Bifiform	Ferrosan SRL	Rumunsko
APO - Lactobacillus 10+	Profarma - Produkt s.r.o.	ČR
GS Lactobacily FORTE 20	Green-Swan Pharmaceuticals CR, a.s.	ČR
BioLac Baby drobs	Probiotal S.p.A.	Itálie
Bio-Kult	Protexin®	UK
Junior 2+ milk BIFIDUS	Nestlé Česko s.r.o.	ČR
Activia (jogurt)	Danone a.s.	ČR
Hollandia (jogurt)	Hollandia Karlovy Vary a.s.	ČR
Florian Active (jogurt)	Olma, a.s.	ČR

Tabulka 16: Deklarované druhy rodu *Bifidobacterium*

Název výrobku:	Deklarované druhy bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> :
Super Dophilus	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
PROBIO-FIX	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
Laktobacílky baby	<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Biopron JUNIOR	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>
BIFOLAC BALANCE	<i>Bifidobacterium longum</i>
APO-BABY PROBIO	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Lactobene	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Biform (drops)	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
APO - Lactobacillus 10+	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
GS Lactobacily FORTE 20	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
BioLac Baby	<i>Bifidobacterium breve</i>
Bio-Kult	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Junior 2+ milk BIFIDUS	<i>Bifidobacterium</i> sp. <i>Bifidus</i> B <sub>L</sub>
Activia (jogurt)	<i>Bifidus</i> ActiRegularis® DN-173 010
Hollandia (jogurt)	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
Florian Active (jogurt)	<i>Bifidobacterium</i> ssp.

## 4.2 Kultivační média

Stanovení počtu životaschopných anaerobních bakterií, v tomto případě bifidobakterií, bylo prováděno metodou *in vitro* za použití 5 agarových médií. Jedná se o BSM médium, BSM médium doplněné o mupirocin (100 mg/l, Oxoid), TOS médium, TOS médium doplněné o mupirocin (100 mg/l, Oxoid) a WSP médium doplněné o mupirocin (100 mg/l, Oxoid). Tato média byla použita ke stanovení celkového počtu *Bifidobacterium* sp., tedy pro detekci všech druhů tohoto rodu.

Probiotické výrobky byly nejdříve spolu s čistými kulturami, uvedenými v tabulce číslo 17 ze sbírky KMVD, otestovány na doporučených médiích, určených ke stanovení celkového počtu rodu *Bifidobacterium*, tedy pro detekci všech druhů tohoto rodu, za účelem zjištění, zda jsou mezi médii statisticky významné rozdíly.

**Tabulka 17: Seznam čistých kultur rodu *Bifidobacterium***

<b>Čisté kultury</b>
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140
<i>B. bifidum</i> DSM 20456
<i>B. bifidum</i> DSM 20082
<i>B. bifidum</i> DSM 20215
<i>B. bifidum</i> DSM 20239
<i>B. breve</i> DSM 20213
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> DSM 20088
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20219

Na základě substrátových preferencí jednotlivých druhů rodu *Bifidobacterium*, které byly zjištěny pomocí biochemických testů, API 50 CHL (BioMérieux, Francie) a ANAEROtestu 23 (Erba - Lachema, ČR), na sbírkových kmenech a dalších, již identifikovaných, izolátech ze sbírky KMVD, byla později sestavena média pro kvantifikaci konkrétních druhů.

Všechna navržená média vycházela z média základního, kterým byl Wilkins-Chalgren agar doplněný o mupirocin (100 mg/l, Oxoid). Toto nové médium, které neobsahovalo jako základní zdroj energie glukosu, bylo vždy doplněno o zdroj jiný, který byl zároveň selektivním faktorem, zjištěným pomocí výše zmíněných biochemických testů, anebo bylo, jako v případě *B. bifidum*, vycházeno již ze známých faktů.

#### **4.2.1 Základní média pro bifidobakterie**

##### **4.2.1.1 BSM (Bifidus Selective Medium)**

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

BSM médium obsahuje pepton a masový extrakt jako zdroj uhlíku, dusíku, vitamínů a minerálů. Extrakt z kvasnic dodává B-komplex, který stimuluje růst bakterií. Glukosa je zdrojem energie. Chlorid sodný udržuje osmotickou rovnováhu.

V nízké koncentraci je zde obsažena i sloučenina sloužící k detoxikaci vedlejších metabolických produktů. Médium dále obsahuje redukční a pufrovací činidla.

Selektivní soli inhibují růst plísní, enterokoků a dalších gram-negativních bakterií. Další sloučenina inhibuje glykolýzu inaktivací přítomné glyceraldehyd-3-fosfátu.

Tři přítomná antibiotika působí jako selektivní agens a potlačují doprovodnou bakteriální flóru, jako je *Bacillus*, *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas*. Počet bifidobakterií může snížit azosloučenina, která v médiu slouží jako selektivní růžovo-fialové barvivo pro bifidobakteriální kolonie. Přesné složení však firma neuvádí (anonym 6).

### **Příprava BSM média**

55,5g BSM média bylo rozpuštěno v 1000 ml demineralizované vody. Sterilováno pomocí autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a následně zchlazeno pomocí vytemperované vodní lázně na 55 °C. Po vytemperování bylo přidáno 116 mg doplňku od firmy Fluka (Fluka 83055), rozpuštěného v 5 ml demineralizované vody, a sloužícího k selektivnímu stanovení bifidobakterií. Finální pH média při 25 °C je  $6,8 \pm 0,2$ .

#### **4.2.1.2 TOS**

Toto médium bylo použito pro kultivaci celkového počtu rodu *Bifidobacterium*. TOS galaktooligosacharidy jsou oligosacharidy často používané jako bifidogenní faktor. To proto, že rod *Bifidobacterium* tyto oligosacharidy povětšinou využívá, zatímco BMK nikoli, zvláště pokud jsou v kombinaci s propionátem sodným.

Kombinace kvasničného autolyzátu a kaseinového peptonu, která je v médiu použita, slouží jako bohatý zdroj živin pro růst bifidobakterií. Síran hořečnatý podporuje růst poškozených bifidobakterií, zatímco síran amonný je zdrojem dusíkatých látek.

Jako pufující látky jsou v médiu použity dihydrogenfosforečnan draselný a hydrogenfosforečnan didraselný, které udržují pH v neutrální zóně. Jako redukční činidlo je zde použit L-cystein, který poskytuje anaerobní podmínky.

Složení média a informace použité výše jsou v souladu s ISO Standardem 29981/IDF 220:2010), (Merck, Německo).

### **Příprava TOS agaru**

Bylo smícháno 62,5 g TOS média (jeho složení je uvedeno v tabulce číslo 18) v 950 ml demineralizované vody, zahřáto a rozmícháno ve vodní lázni, než bylo médium zcela rozpuštěno. Následně bylo autoklávováno, při teplotě  $115 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ , po dobu 15 min.

Po sterilaci bylo médium uloženo do vodní lázně o teplotě  $\pm 48$  °C. Médium připravené k mikrobiologickému rozboru má čirou, nažloutlou barvu, a pH při teplotě 25 °C pohybující se okolo  $6,7 \pm 0,2$ .

**Tabulka 18: 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
Agar	15 g/ l
pH.....6,7 $\pm$ 0,2	

## 4.2.2 Selektivní média pro bifidobakterie

### 4.2.2.1 BSM-MUP

BSM médium (viz výše) doplněné o mupirocin (100 mg/l, Oxoid) bylo použito pro kultivaci celkového počtu rodu *Bifidobacterium*. Mupirocin byl extrahován z antibiotických disků (Oxoid, 200 µg). Padesát disků bylo přidáno do 10 ml Wilkins-Chalgren bujónu (oxoid) a 30 min mícháno. Poté byl bujón přidán k 90 ml sterilního agarů (Rada a Petr, 2000).

### 4.2.2.2 TOS-MUP

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

Mupirocin (MUP) je antibiotikum, vůči kterému je rod *Bifidobacterium* rezistentní, zatímco na bakterie rodu *Lactoacillus* (*Lactoacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactoacillus rhamnosus*, *Lactoacillus acidophilus*, *Lactoacillus casei*), *Lactococcus* (*Lactococcus lactis*) a *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*) působí jako inhibitor jejich růstu.

Mupirocin v kombinaci s propionátem sodným a TOS agarem, je velmi selektivní pro rod *Bifidobacterium*. Typické kolonie pro rod *Bifidobacterium* jsou bílé. Morfologie kolonií

může být různorodá, ale průměr kolonie se většinou pohybuje v rozmezí mezi 1-4 mm. MUP je do média dodáván jako lyofilizovaný suplement. Složení média je ve shodě s normou ISO 29981/IDF 220:2010.

### **Příprava TOS-MUP média**

Při přípravě suplementu byl lyofilizát rozpuštěn v originální lavičce s přídavkem 25 ml demineralizované vody a promíchán dokud nebylo dosaženo čirosti roztoku. Následně bylo asepticky přidáno 5 ml mupirocinu k 95 ml kapalného TOS média. Kompletní TOS-Mup médium obsahuje mupirocin (100 mg/l, Oxoid).

### **4.2.2.3 WSP-MUP**

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

Wilkins-Chalgren agar je médium používané pro kultivaci anaerobních mikroorganismů.

Jako zdroj dusíku, aminokyselin a minerálních látek je v médiu želatina a kasein. Za účelem vitamínů a jiných růstových faktorů, včetně purinů a pyrimidinů, je zde použit kvasničný autolyzát. NaCl udržuje osmotickou rovnováhu, zatímco glukosa slouží jako zdroj uhlíku. Pyruvát sodný odbourává peroxid vodíku a sójový pepton získaný hydrolyzou sójových bobů slouží jako zdroj oligosacharidů, které podporují růst bifidobakterií (Wilkins a Chalgren, 1976). MUP působí selektivně pro růst bifidobakterií, zatímco ostatní BMK jsou potlačovány (Rada a Koc, 2000). Celé složení WSP-MUP je uvedeno v tabulce číslo 19.

### **Příprava WSP-MUP agaru**

Doporučené množství agaru (43 g/l), 5 g/l sójového 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 (100 mg/l, Oxoid).



**Tabulka 19: Složení Wilkins-Chalgren agaru**

Kasein	10 g/ l
Želatina	10 g/ l
Kvasničný autolyzát	5,0 g/ l
Chlorid sodný	50 g/ l
Glukosa	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

**Tabulka 20: 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) Mucin	a) 20 g/ l
b) Turanosa/Sorbitol+Manitol	b) 10 g/ l
pH.....7,4	
Bromkresolová červeň (1% roztok v etanolu)	1 ml/ l
Mupirocin	100 mg/ l

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

#### 4.2.3 Navržená druhově specifická média pro bifidobakterie

Jako základní médium pro stanovování konkrétních druhů bifidobakterií bylo použito WSP-MUP médium se složením, které je uvedeno v tabulce číslo 20. Toto médium bylo použito pro kultivaci bakterií *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve*. Pro kultivaci daného druhu byl použit vždy specifický zdroj uhlíku.

Pro kultivaci *Bifidobacterium bifidum* bylo navrženo selektivní médium, **MM médium**, které bylo doplněno o mucin jako jedinný zdroj uhlíku. Podle Crocian et al. (1994) je *Bifidobacterium bifidum* jediným druhem bifidobakterií, který dokáže mucin využít, proto byl mucin vybrán jako selektivní faktor.

Pro kultivaci *Bifidobacterium longum* bylo navrženo **MT médium** se selektivním faktorem turanosou jako jedinným zdrojem uhlíku.

A pro *Bifidobacterium breve* byl jako selektivní faktor zvoleny alkoholické sacharidy sorbitol a manitol jako jedinné zdroje uhlíku. Toto médium bylo pojmenováno **MSM**.

#### 4.2.4 Mikrobiologický rozbor

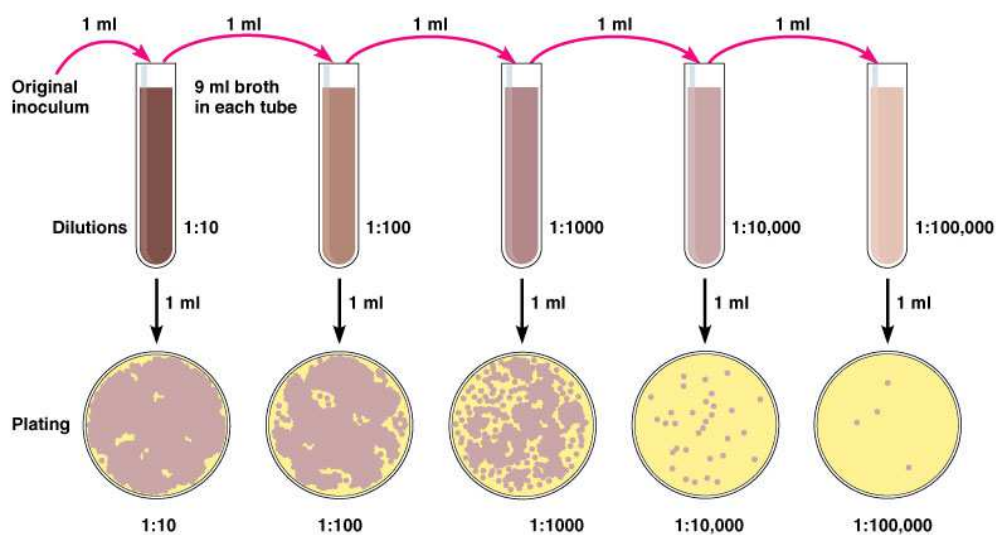
Na začátku mikrobiologického rozboru bylo naváženo 1g výrobku (v případě jogurtu 10 g) a poté rozpuštěno v 9 ml (v případě jogurtu v 90 ml) živného bujónu, jehož složení je uvedeno v tabulce 21, viz níže.

Tabulka 21: Složení živného 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

Následně byla vytvořena ředící řada takzvaným desítkovým způsobem, vždy podle množství bakterií rodu *Bifidobacterium* uvedeného na příbalovém letáku, nebo jsme předpokládali, že obsahují počty podle vyhlášky 77/2003 Sb., podle druhu testovaného výrobku. Standardně ale způsobem uvedeném na obrázku číslo 8, tedy od  $10^{-1}$  do  $10^{-9}$ . Důvodem vytvoření ředící řady je potřeba snížení počtu bakteriálních kolonií.

Obrázek 8: Ředící řada vytvořená desítkovým způsobem (Anonym 8)



Poté bylo 0,5 ml roztoku z příslušného ředění aplikováno na Petriho misky a přelito zvoleným médiem. Po zatuhnutí byly anaerobní bakterie kultivovány v anaerostatu za použití katalyzátoru (Oxoid, HP 11) a v atmosféře složené z  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2$  v poměru 20 %:80 %. Teplota kultivace byla zvolena 37 °C po dobu cca 48 hodin.

Po kultivaci bylo spočítáno množství narostlých kolonií na agaru a podle vzorce číslo 1 bylo dopočítáno množství bifidobakterií na gram vzorku.

### **Vzorec číslo 1:**

$$P = [(P_1 + P_2) / 11] \times F \text{ (KTJ/ g)}$$

$P_1, P_2$  počet kolonií (30 – 300) na dvou po sobě jdoucích počítatelných plochách  
 $F$  převrácená hodnota vyššího ředění

→ Přepočet na  $\log \text{KTJ/ g} = \log P$   
Počet bakterií = počet kolonií \* ředění vzorku

Výsledky byly zaznamenány a analyzovány pomocí modelu ANOVA a rozdílnost mezi průměry byla otestována na hladině významnosti  $P < 0,05$ .

## **4.3 Identifikace**

Po anaerobní kultivaci, která byla popsána výše, bylo z každého média vyizolováno zhruba 6 kolonií, vždy z nejvyšších ředění. Sterilní kličkou byly z agaru asepticky vypíchnuty kolonie a inokulovány do bujónu, složení viz tabulka 22. Vzorky byly znovu kultivovány při teplotě 37 °C ovšem tentokrát pouze po dobu 24 hodin.

**Tabulka 22: Složení bujónu**

Sójový pepton	5 g/l
Cystein	0,5 g/l
Tween 80	1 ml/l

Po 24 hodinové inkubaci byl vzorek zkontrolován pod fázově-kontrastním mikroskopem (Nikon 104 C), aby bylo zjištěno, zda nedošlo při izolaci a následné inokulaci do bujónu ke kontaminaci vzorku. Zároveň byla provedena identifikace bakterií na základě jejich morfologických charakteristik.

### **4.3.1 Rodová**

Kmeny vyizolované ze zvolených kultivačních médií, byly identifikovány na úroveň rodu pomocí testu, který detekuje enzym fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa (F6PPK), což je enzym, podílející se na metabolismu hexos u rodu *Bifidobacterium*, pro který je typický. F6PPK stěpí

fruktoso-6-fosfát na erytroso-4-fosfát a acetyl-fosfát, který je za přítomnosti železitých iontů přeměněn na komplexní sloučeninu růžovofialového zbarvení.

Pro detekci tohoto enzymu je nutné rozbít bakteriální buňky. Obsah buněk je následně vylit do roztoku, ke kterému jsou přidávána různá činidla působící barevnou změnu, na základě které je pak test vyhodnocen.

#### **4.3.1.1 F6PPK**

##### **Činidla:**

**Činidlo 1:** Fosfátový pufr-0,36 g  $K_2HPO_4$ ; 0,10 g  $KH_2PO_4$  ; 0,15 g cysteinu, 300 ml destilované vody; pH 6,5

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

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

**Činidlo 4:** 3 g TCA; 20 ml destilované vody

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

**Činidlo 6:** 1 g  $FeCl_3$ ; 62  $\mu$ l koncentrované (35%) HCl; 20 ml destilované vody

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

##### **Postup:**

Zhruba 10 ml narostlé kultury bylo přelito do zkumavek určených k centrifugaci a doplněno o  $H_2O$ , aby došlo k vyrovnání objemu zkumavek. Poté byly zkumavky stočeny při 20 °C a 9000 g po dobu 8 minut. Následně byl supernatant slit a sediment byl opláchnut a rozmíchán roztokem číslo 1. Poté bylo přidáno množství 0,2 ml CTAB a vzorky se nechaly 5 minut kultivovat při pokojové teplotě (20°C). Dále bylo přidáno množství 0,125 ml činidla číslo 2 a 0,2 ml roztoku F6PPK a vše bylo důkladně promícháno. Zkumavky byly umístěny na 30 min. do vodní lázně, kde byly inkubovány při teplotě 37 °C. V dalším kroku bylo přidáno množství 0,750 ml činidla číslo 3, kterým byla zastavena enzymatická reakce. Poté byly vzorky opět 10 min. inkubovány při pokojové teplotě (20°C). Jako poslední bylo přidáno množství 0,5 ml činidel číslo 4 a 5, pro okyselení, a množství 0,5 ml činidla číslo 6 pro vytvoření barevné reakce.

### **Vyhodnocení:**

Na základě probíhané barevné změny byly vzorky vyhodnoceny. Jako projev pozitivní reakce je bráno fialové zbarvení, které je tvořeno komplexní sloučeninou, která má absorpční maximum při 505 nm (Biavati a Mattarelli, 2012). Projevem negativní reakce je zbarvení žluté.

#### **4.3.2 Druhá**

Kmeny vyizolované a následně identifikované na úroveň rodu, byly dále identifikovány na úroveň druhu pomocí biochemických testů ANAEROTest 23, API 50 CHL a pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

##### **4.3.2.1 ANAEROTest 23**

ANAEROTest 23 od firmy Erba-Lacema, Česká republika, je hojně využívaným testem k identifikaci anaerobních bakterií pomocí 23 biochemických testů jak v klinickém materiálu, tak i v potravinách.

### **Postup:**

2 ml kultury bylo odměřeno do ependorfeček a následně odstředěno po dobu 3 minut při 14500g. Po vyjmutí zkumavky z centrifugy byl obsah slit a propláchnut v množství 0,5 ml fosfátového pufru, který byl po použití opět vylit. Dále bylo přidáno množství 2 ml fosfátového pufru. To bylo pomocí injekční stříkačky promícháno a opět odstředěno. Po odstředění bylo natáhnuo množství 1 ml a vše bylo dobře promícháno. Obsah zkumavky byl natažen opět do injekční stříkačky a poté smíchán se suspenzí pro ANAEROTest 23, než bylo vytvořeno suspenzní médium se zákalem, který odpovídá stupni 3, dle McFarlandovy zákalové stupnice. Tato vytvořená suspenze byla sterilní stříkačkou inokulována po kapkách do všech jamek v mikrotitrační destičce anaerotestu. Nakonec byl přidán do jamky pro indol parafínový olej, který zabraňuje těkání indolu během kultivace, v případě pozitivní reakce.

Anaerostat (HP 11A, Oxoid) byl anaerobně uzavřen a kultivován 48 hodin při teplotě 37°C. Při vyhodnocování byla v první a druhé řadě zakápnuta jamka H, látkami indol a nitráty. Přičemž barevné reakce byly odečítány po 3-5 minutách, dle obrázku interpretací číslo 9.

Obrázek 9: Interpretace reakcí ANAEROTestu 23 (Anonym 1)

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

**Vyhodnocení:**

Vyhodnocení bylo prováděno dvakrát, po 24 hodinách a po 48 hodinách. Barevné reakce byly odečteny a zaznamenány do vyhodnocovacích formulářů (viz obrázek 10) pomocí symbolů + a -, v závislosti na výsledcích. Plus značí pozitivní reakci, mínus negativní. U esculinu se za pozitivní reakci považuje zbavení černé.

Obrázek 10: Vyhodnocovací formulář pro ANAEROTest 23 (Anonym 1)

MIKROTEST®

**ANAEROTest 23**

Datum/Datum/Date/Дата

Zprac./Sprac./Ref./Идент. проевен

Erba Lachema s.r.o.  
Karásek 1d  
621 33 Brno, CZ

Kmen č./Кмең č./Strain No./Но. анализа

Poznámky/Notes/Отметки

	H	G	F	E	D	C	B	A
<b>1</b>	IND 1	GLU 1	MLT 1	FRU 1	GAL 1	LAC 1	MLZ 1	URE 1
<b>2</b>	NIT 2	SUC 2	SAL 2	TRE 2	MAN 2	RHA 2	NAG 2	bGL 2
<b>3</b>	ESL 4	MNS 4	RAF 4	CEL 4	XYL 4	ARA 4	SOR 4	CON 4
								=Profil/Profile/Профиль

Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты

--	--	--	--	--	--	--	--

Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация

10/11

#### 4.3.2.2 API 50 CH

API 50 CHL (BioMérieux, Francie) je systém 50 standardizovaný biochemických testů, které jsou určeny k identifikaci bakterií, pomocí jejich fermentačních profilů.

##### Postup:

Penicilínka s narostlou kulturou byla asepticky slita do zkumavky určené k centrifugaci, která probíhala při 9000 g po dobu 3 minut. Poté co byl vzorek odstředěn, byl slit a zbylý sediment byl opláchnut v množství 0,5 ml fosfátového pufru, který byl následně znovu vylit. Sediment, který zůstal ve zkumavce, byl důkladně promíchán pomocí injekční stříkačky (1 ml) v 0,5ml fosfátového pufru a opět odstředěn při 9000 g po dobu 3 minut. Po odstředění vzorku byl supernatant vylit a poté byl vzorek opět propláchnut v množství 0,5 ml fosfátového pufru, který byl nakonec slit. Následně byl sediment promíchán v množství 1 ml fosfátového pufru a natažen do injekční stříkačky o objemu 1 ml. Vzniklý roztok byl postupně kapán do suspenzního média o objemu 5 ml, za účelem zisku 2. zákalového stupně, podle McFarlandovy zákalové stupnice. Počet kapek, které byly nakapány do výše zmíněného média, byl vynásoben dvěma, a toto množství bylo aplikováno do média, o objemu 10 ml, pro kit API 50 CHL.

Složení média pro API 50CHL je uvedeno v tabulce číslo 23. Nakonec byl test anaerobně uzavřen do anaerostatu a inkubován po dobu 48 hodin při 37 °C.

Tabulka 23: Složení média pro API 50 CHL

Suspenzní médium 2 a 5 ml	demineralizovaná voda
<b>API 50 CHL médium 10 ml</b>	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. Nejdříve po 24 hodinách a potom po 48 hodinách. Do speciálních formulářů (viz obrázek 11) byla zaznamenávána čísla od 0 do 3, dle stupně a barvy zákalu substrátu. Na obrázku číslo 12 je uvedena interpretace reakcí API 50 CHL.

Obrázek 11: Vyhodnocovací formulář pro API 50 CH (Anonym 2)

		REF : _____ / _____ / _____																																	
		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																														BIO MÉRIEUX			
		12138 A																																	
		CE																																	
		api® 50 CH																																	
		0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49																																	
		24h																																	
		48h																																	
		0 GLY ERY DIAPA LARA RIB DXYL LXYL ADO MDX GAL GLU FRU MNE SBE RHA DUL INO MAN SOF MDM MDG MAG AMY ABB ESC SAL CEL MAL LAC MEL SAC TRE INU MLZ RAF AMD GLYG XLT GEN TUR LIX TAG DFUC LFUC DAPL LARL GNT 2KG 5KG																														Imprimé en France / Printed in France			
Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :		Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :																														Ident. / Ταυτοποίηση :			
Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης :																																			

## Vyhodnocení reakcí 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 – při pozitivní reakci je zbarvení černé



Obrázek 12: Interpretace reakcí API 50CHL (Anonym 2)



#### 4.3.2.3 PCR

PCR je metoda, používající se jak pro identifikaci na rodovou, tak na druhovou úroveň, za použití specifických primerů. K provedení této metody je nejdříve za potřebí vyizolovat bakteriální DNA.

#### Izolace DNA:

Do 1,5 ml zkumavky, ependorfky, bylo napipetováno množství 1ml čistých, narostlých kultur bifidobakterií a odstředěno po dobu 3 minut a při 14500 g. Obsah ependorfky byl následně slit a bylo přidáno 100 µl PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystem). Vše bylo důkladně promícháno pipetou. Ependorfka byla posléze umístěna do termobloku (typ Eppendorf, Německo), kde byla zahřívána 10 minut na teplotu 99 °C. Po uplynutí 10 minut byla zchlazena na pokojovou teplotu, cca 22 °C, a opět odstředěna po dobu 3 minut při 14500 g. Nakonec bylo z vrchu odpipetováno množství 50 µl supernatantu do nové ependorfky.

### **Příprava PCR reakce:**

PCR směs (1 vzorek, 25µml):

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

Všechny tyto přísady byly postupně napipetovány v množství 24 µl do ependorfeček. K tomu bylo následně přidáno 1 µl DNA (s rezervou 1,5 µl). Daný vzorek byl promíchán a vložen do termocykléru, který byl nastaven na program, dle daného primeru. Ukázka časového a teplotního profilu PCR reakce je uvedena v tabulce číslo 24, viz níže.

**Tabulka 24: Teplotní a časový profil PCR reakce**

<b>Počet cyklů:</b>	<b>Teplota:</b>	<b>Doba:</b>
1	denaturace, 95 °C	5 minut
35	denaturace, 95°C	1 minuta
	annealing, 66 °C	45 sekund
	elongace, 72 °C	1 minuta
1	elongace, 72 °C	5 minut

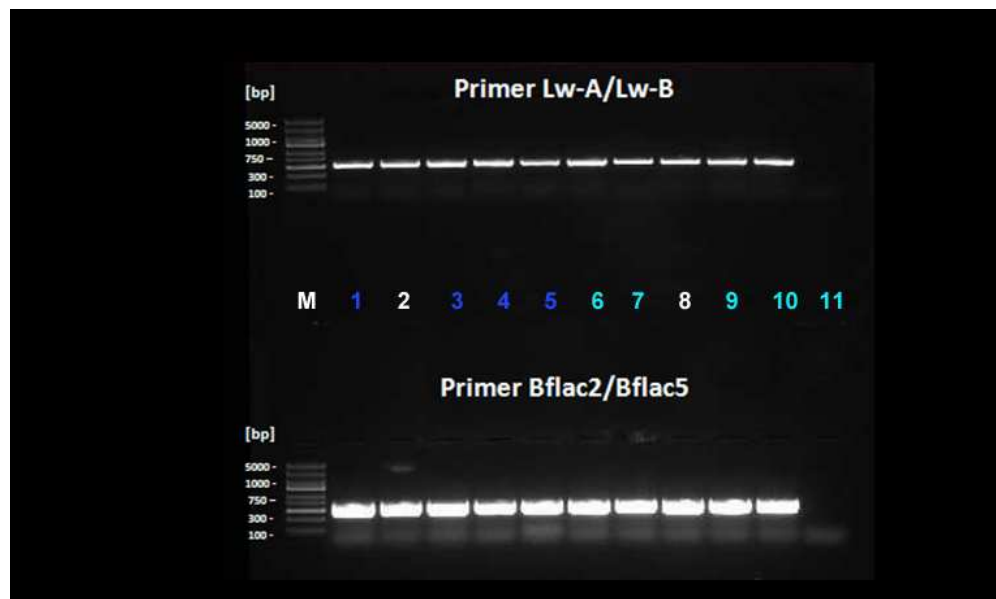
### **Příprava gelu:**

Pro přípravu gelu byl použit 50krát naředěný TAE PUF<sub>R</sub>.

Směs 100 ml TAE PUF<sub>R</sub>U (**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 bylo vše několikrát promícháno. Po vyjmutí bylo přidáno 5 µl Gel<sub>R</sub>Redu (Biotum) a vpraveno do formy pro gel. Po ztuhnutí a vychlazení byl gel vložen do elektroforézy, která byla naplněná 50krát zředěným TAE<sub>pufrem</sub>.

Do jednotlivých jamek v gelu byly nepipetovány vzorky v množství 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. Nakonec byl vzorek vložen do zařízení (Biorad), které vizualizuje DNA fragmenty vzorků pomocí UV záření. Pozitivní vzorky v UV světle zářily, viz obrázek 13.

Obrázek 13: PCR profil pod UV světlem



**M- Velikostní standardy**

**1-Pozitivní kontrola**

**2-10 Neznámé vzorky**

**11- Negativní kontrola**

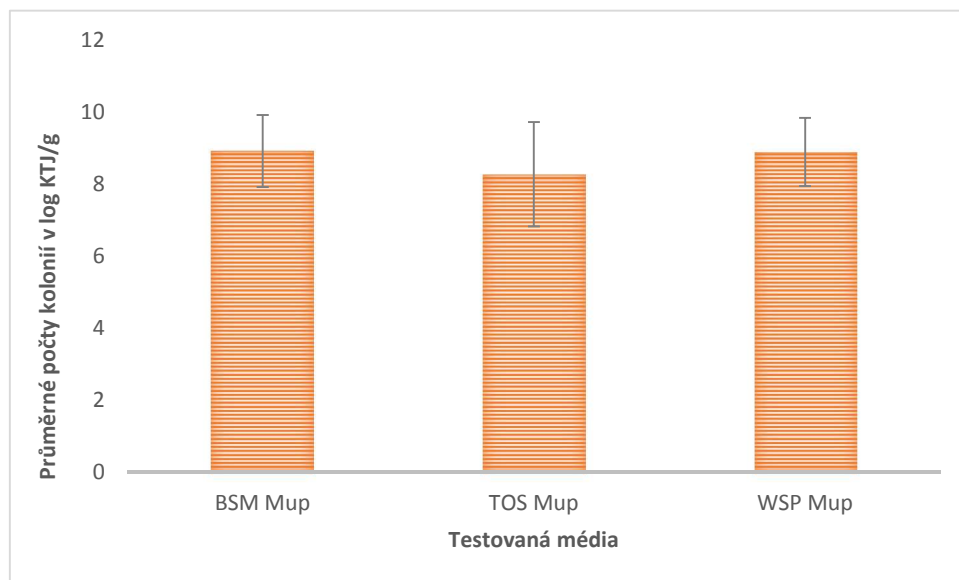
## 5 Výsledky

V této práci byly otestovány jak čisté kultury nejčastěji se vyskytujících druhů rodu *Bifidobacterium* v potravinářských, ale i farmaceutických výrobcích, tak i 16 probiotických výrobků, českých i zahraničních firem. Konkrétně se jednalo o 13 výživových doplňků a 3 jogurty.

Nejdříve byly otestovány čisté kultury na doporučených médiích, určených ke stanovení celkového počtu bifidobakterií, přičemž všechny testované čisté kultury rodu *Bifidobacterium* byly schopny růst na všech testovaných médiích, tedy na BSM, TOS a WSP obohacených o mupirocin (100 mg/l, Oxoid), v počtech od 5,78 do 10,25 log KTJ/g (viz tabulka číslo 25), v závislosti na růstu bakteriální kultury.

Průměrné počty kolonií na BSM-Mup médiu byly rovny **8,92 log KTJ/g**, průměrné počty kolonií na TOS-Mup médiu byly rovny **8,27 log KTJ/g** a průměrné počty kolonií na WSP-Mup médiu byly rovny **8,89 log KTJ/g**. Pro přehlednější znázornění jsou průměrné počty kolonií v log KTJ/g znázorněny v grafu číslo 1.

**Graf 1: Průměrné počty čistých kultur na médiích určených ke kvantifikaci rodu *Bifidobacterium***



Všechny testované typové kmeny bifidobakterií kromě *B. bifidum* DSM 20456 vykazovaly velmi podobné počty na všech třech testovaných médiích. **Mezi testovanými médii nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly** na hladině  $p < 0,005$ .

Typový kmen *B. bifidum* DSM 20456 **vykazoval statisticky významně nižší růst** na TOS-Mup médiu v porovnání s WSP-Mup a BSM-Mup médii. Tento výsledek byl ověřen otestováním dalších reprezentativních sbírkových kmenů *B. bifidum* (DSM 20082, DSM 20215 a DSM 20239). Bylo zjištěno, že dva z těchto sbírkových kmenů (DSM 20082 a DSM 20215) vykazovaly růst na všech testovaných médiích ve stejných počtech, viz tabulka číslo 25. Nicméně kmen *B. bifidum* DSM 20239 opět vykazoval **statisticky významně nižší růst** na TOS-Mup v porovnání s BSM-Mup a WSP-Mup.

**Tabulka 25: Kvantifikace čistých kultur rodu *Bifidobacterium***

Čisté kultury	BSM-Mup	TOS-Mup	WSP-Mup
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083	8,63 ± 0,2	8,71 ± 0,03	8,64 ± 0,02
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140	8,84 ± 0,05	8,88 ± 0,01	8,87 ± 0,01
<i>B. bifidum</i> DSM 20456	<b>9,66 ± 0,05<sup>a</sup></b>	<b>5,78 ± 0,11<sup>b</sup></b>	<b>9,56 ± 0,05<sup>a</sup></b>
<i>B. bifidum</i> DSM 20082	<b>10,25 ± 0,02<sup>a</sup></b>	<b>10,14 ± 0,04<sup>a</sup></b>	<b>10,16 ± 0,06<sup>a</sup></b>
<i>B. bifidum</i> DSM 20215	<b>10,05 ± 0,03<sup>a</sup></b>	<b>9,91 ± 0,05<sup>a</sup></b>	<b>9,96 ± 0,03<sup>a</sup></b>
<i>B. bifidum</i> DSM 20239	<b>8,47 ± 0,03<sup>a</sup></b>	<b>6,76 ± 0,03<sup>b</sup></b>	<b>8,60 ± 0,13<sup>a</sup></b>
<i>B. breve</i> DSM 20213	9,02 ± 0,02	9,03 ± 0,04	9,03 ± 0,02
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> DSM 20088	8,44 ± 0,03	8,38 ± 0,01	8,37 ± 0,04
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20219	6,83 ± 0,02	6,78 ± 0,01	6,85 ± 0,02
<b>Průměr kmenů</b>	<b>8,92 ± 1,00</b>	<b>8,27 ± 1,45</b>	<b>8,89 ± 0,95</b>

\* Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti  $p < 0,005$

Stejně tak jako čisté kultury byly otestovány i výše zmíněné probiotické výrobky. Média obsahující mupirocin byla shledána zcela selektivními a všechny izoláty byly identifikovány jako rod *Bifidobacterium*.

Počty kolonií se na jednotlivých médiích pohybovaly v rozmezí od 5,10 do 10,62 log KTJ/g na médiích neobohacených o mupirocin (100 mg/l), tedy na BSM a TOS agarech.

Na médiích s mupirocinem (100 mg/l), tedy na BSM-Mup, TOS-Mup a WSP-Mup, se pohybovaly v rozmezí 5,03-10,45 log KTJ/g.

Nejvyšší průměrné počty kolonií rostly na TOS médiu a to v počtech **8,79 log KTJ/g**, ale při následné identifikaci bylo zjištěno, že byly přítomny i jiné bakterie, než je rod *Bifidobacterium*. Stejně tak na BSM médiu, kdy se průměrný počet kolonií rovnal **8,60 log KTJ/g**.

Průměrný počet kolonií na BSM médiu obohaceném o mupirocin (100 mg/l) byl roven **8,26 log KTJ/g**, na TOS médiu obohaceném o mupirocin (100 mg/l) byl průměrný počet kolonií roven **8,33 log KTJ/g** a na WSP médiu obohaceném o mupirocin (100 mg/l) byl průměrný počet kolonií roven **8,24 log KTJ/g**.

Pro snazší orientaci jsou průměrné počty kolonií v log KTJ/g uvedeny v tabulce číslo 26 a zároveň znázorněny v grafu číslo 2.

**Tabulka 26: Kvantifikace rodu *Bifidoacterium* v komerčních výrobcích**

Výrobek	BSM	BSM-Mup	TOS	TOS-Mup	WSP-Mup
Super Dophilus	10,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,41 ± 0,01 <sup>d</sup>	10,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	9,52 ± 0,01 <sup>e</sup>	9,37 ± 0,02 <sup>c</sup>
PROBIO-FIX	10,50 ± 0,03 <sup>ab</sup>	10,32 ± 0,04 <sup>c</sup>	10,62 ± 0,02 <sup>a</sup>	10,45 ± 0,02 <sup>d</sup>	10,38 ± 0,03 <sup>bc</sup>
Laktobacilky baby	9,60 ± 0,01 <sup>b</sup>	9,32 ± 0,02 <sup>c</sup>	9,91 ± 0,04 <sup>a</sup>	9,58 ± 0,01 <sup>d</sup>	9,43 ± 0,07 <sup>c</sup>
Biopron JUNIOR	9,14 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	9,61 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,17 ± 0,04 <sup>b</sup>	9,20 ± 0,04 <sup>a</sup>
BIFOLAC BALANCE	8,65 ± 0,03 <sup>a</sup>	8,64 ± 0,05 <sup>b</sup>	8,73 ± 0,04 <sup>b</sup>	8,64 ± 0,04 <sup>c</sup>	8,57 ± 0,05 <sup>ab</sup>
APO-BABY PROBIO	9,00 ± 0,02 <sup>c</sup>	8,42 ± 0,01 <sup>d</sup>	8,73 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,59 ± 0,05 <sup>c</sup>	8,71 ± 0,02 <sup>b</sup>
Lactobene	7,54 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	7,56 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,03 <sup>c</sup>	7,19 ± 0,03 <sup>ab</sup>
Biform	5,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,03 ± 0,02 <sup>d</sup>	5,57 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,23 ± 0,05 <sup>e</sup>	5,04 ± 0,01 <sup>c</sup>
APO - Lactobacillus 10+	9,08 ± 0,03 <sup>a</sup>	8,58 ± 0,00 <sup>d</sup>	9,43 ± 0,01 <sup>c</sup>	8,85 ± 0,01 <sup>e</sup>	8,53 ± 0,02 <sup>b</sup>
GS Lactobacily FORTE 20	8,74 ± 0,03 <sup>a</sup>	8,47 ± 0,01 <sup>b</sup>	9,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,19 ± 0,02 <sup>c</sup>	7,92 ± 0,03 <sup>ab</sup>
BioLac Baby drobs	9,44 ± 0,07 <sup>b</sup>	9,34 ± 0,02 <sup>c</sup>	9,61 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,38 ± 0,01 <sup>d</sup>	9,35 ± 0,01 <sup>a</sup>
Bio-Kult	9,22 ± 0,01 <sup>b</sup>	8,50 ± 0,02 <sup>c</sup>	9,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,48 ± 0,01 <sup>d</sup>	8,53 ± 0,02 <sup>a</sup>
Junior 2+ milk BIFIDUS	7,56 ± 0,03 <sup>b</sup>	7,52 ± 0,01 <sup>c</sup>	7,59 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,54 ± 0,00 <sup>d</sup>	7,55 ± 0,00 <sup>a</sup>
Activia (jogurt)	8,45 ± 0,11	8,43 ± 0,03	8,49 ± 0,01	8,44 ± 0,01	8,41 ± 0,01
Hollandia (jogurt)	7,45 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,42 ± 0,05 <sup>c</sup>	7,61 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,32 ± 0,02 <sup>d</sup>	6,27 ± 0,01 <sup>a</sup>
Florian Active (jogurt)	8,14 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,42 ± 0,02 <sup>c</sup>	8,45 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,62 ± 0,02 <sup>d</sup>	7,39 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>Průměr kmenů</b>	<b>8,60 ± 1,27</b>	<b>8,26 ± 1,30</b>	<b>8,79 ± 1,25</b>	<b>8,33 ± 1,30</b>	<b>8,24 ± 1,32</b>

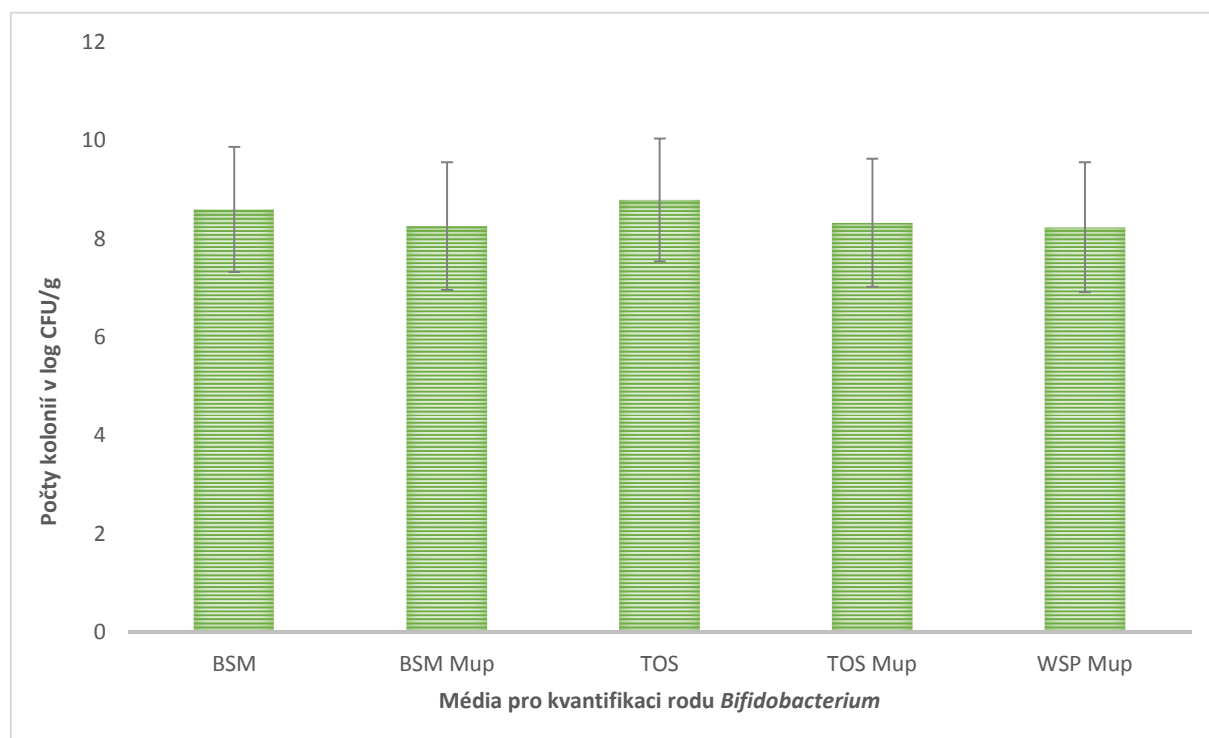
\* Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti  $p < 0,005$

Žádné jiné bakterie kromě rodu *Bifidobacterium* nebyly nalezeny na agarech obohacených mupirocinem (100 mg/l), ISO Standard 29981 /IDF (International Dairy Federation) 220:2010 říká, že antibiotikum mupirocin (50 mg/l) inhibuje růst bakterií mléčného kvašení běžně se vyskytujících ve fermentovaných i nefermentovaných mléčných výrobcích. Nicméně dávkování 50 mg/l se ukázalo jako ne zcela selektivní v předběžných testech.

Všechny testované agary obohacené mupirocinem (100 mg/l) se ukázaly jako vhodné pro selektivní stanovení bifidobakterií ve všech druzích probiotických výrobků (kapsle, kapky, sáčky).

Hodnoty v řádcích, u jednotlivých testovaných výrobků s různými indexy (tabulka číslo 26), se **statisticky významně liší** na hladině významnosti  $p < 0,005$ .

**Graf 2: Průměrné počty kolonií na médiích určených ke kvantifikaci rodu *Bifidobacterium***



Následně byla na základě substrátových preferencí jednotlivých druhů rodu *Bifidobacterium*, které byly zjištěny pomocí biochemických testů, API 50 CHL (BioMérieux, Francie) a ANAEROTestu 23 (Erba - Lachema, ČR), na sbírkových kmenech a dalších, již identifikovaných, izolátech ze sbírky KMVD, sestavena média pro kvantifikaci konkrétních druhů. Přičemž při sestavování média pro *Bifidobacterium bifidum* bylo vycházeno již ze známých informací, že mucin je zdrojem uhlíku, který *Bifidobacterium bifidum* jako jedinný druh využívá (Crocian et al., 1994).

Pomocí ANAEROTestu 23 bylo zjištěno, že všechny sbírkové kmeny otestované pomocí výše zmíněného biochemického testu pozitivně fermentují sacharidy glukosu, maltosu, fruktosu a galaktosu, naopak neutilizují indol, ureasu, nitráty, trehalosu, rhamnosu, celobiosu a xylosu.

Rozdílná utilizace látek mezi sbírkovými kmeny byla zjištěna například u melecitosu pro *B. longum* nebo sorbitolu, manosu a manitolu pro *B. breve*, viz tabulka 27.

Tabulka 27: Substrátové preference sbírkových kmenů rodu *Bifidobacterium* zjištěné pomocí ANAEROTest 23

	<i>B. breve</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>
	DSM 20213	DSM 20219	DSM 20082
Indol	-	-	-
Glucose	+	+	+
Maltose	+	+	-
Fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Lactose	+	-	+
Melezitose	-	+	-
Urease	-	-	-
Nitrate	-	-	-
Sucrose	+	+	-
Salicin	+	-	-
Trehalose	-	-	-
Mannitol	+	-	-
Rhamnose	-	-	-
N-acetyl-β-D-glucosaminidase	-	-	+
β-glucosidase	+	-	-
Esculin	+	-	-
Mannose	+	-	-
Raffinose	+	+	-
Cellobiose	-	-	-
Xylose	-	-	-
Arabinose	-	+	-
Sorbitol	+	-	-

Dalším z biochemických testů provedených za účelem zjištění substrátových preferencí jednotlivých druhů rodu *Bifidobacterium* byl test API 50 CHL, kterým byly otestovány stejné kmeny, jako pomocí ANAEROTestu 23.

Po odečtení výsledků z tabulky uvedené v příloze číslo 7 bylo zjištěno, že všechny 3 kmeny fermentují, galaktosu, glukosu, fruktosu a laktosu a hydrolyzují eskulin. Naopak jako specifické se jeví pro *B. breve* sorbitol, manitol, škrob, glykogen a L-fukosa. Pro *B. longum* turanosa a *B. bifidum* nepreferuje žádný z testovaných sacharidů, kromě již zmíněných, které byly společné pro všechny 3 druhy.



Po vyhodnocení obou biochemických testů byly zvoleny konkrétní sacharidy, jako selektivní faktory pro druhově specifická média. Všechna navržená média vycházela z média základního, kterým bylo Wilkins-Chalgren médium bez glukosy doplněné o mupirocin (100 mg/l).

V tomto nově navrženém médiu byla vždy glukosa nahrazena selektivním faktorem, zjištěným pomocí výše zmíněných biochemických testů nebo v případě *B. bifidum* bylo vycházeno již ze známých faktů a to, že utilizace mucinu je specifická pro druh *B. bifidum* (Crocian et al., 1994). Médium pro *Bifidobacterium longum* bylo obohaceno o turanosu (10 g/l), médium pro *Bifidobacterium breve* o sorbitol (10 g/l) a manitol (10 g/l) a médium pro *Bifidobacterium bifidum* obsahovalo mucin (20 g/l).

Po provedení mikrobiologického rozboru na druhově specifických médiích za použití sbírkových kmenů, viz tabulka číslo 28, a následné identifikaci, bylo zjištěno, že na MSM médiu, tedy na médiu pro *B. breve*, roste, kromě jeho samotného, ještě *B. animalis* ssp. *lactis*. Stejně tak na MT médiu pro *B. longum*, kde kromě *B. animalis* ssp. *lactis* roste ještě *B. longum* ssp. *infantis*. Na MM médiu, což je druhově specifické médium pro *B. bifidum*, bylo identifikováno *B. bifidum*. Zároveň zde byl zaznamenán nárůst kolonií, jejichž velikost odpovídala velikosti „špendlíkové hlavičky,“ viz obrázek číslo 15.

Obrázek 14: Penicilínky obsahující ŘŘ s mucinem a zaočkovaným *B. animalis* ssp. *lactis*, fialové zbarvení nenaznačuje žádný nárůst



Obrázek 15: Narostlé kolonie na MM médiu se zaočkovanou čistou kulturou *B. animalis* ssp.



Tyto kolonie byly tak malé, že je bylo obtížné spočítat. Po jejich následném zaočkování do ředící řady obohacené o mucin již žádný nárůst nebyl zaznamenán, viz obrázek číslo 14.

*B. adolescentis* neroste na žádném sestaveném druhově specifickém médiu.

Tabulka 28: Test růstu čistých kultur na druhově specifických médiích

Kmen	MM médium ( <i>B. bifidum</i> )	MT médium ( <i>B. longum</i> )	MSM médium ( <i>B. breve</i> )
<i>B. bifidum</i> DSM 20456a	8,87 ± 0,03	0	0
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20219 <sup>a</sup>	0	9,12 ± 0,04	0
<i>B. breve</i> DSM 20213 <sup>a</sup>	0	0	8,96 ± 0,03
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 <sup>a</sup>	0	9,46 ± 0,02	9,47 ± 0,00
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> DSM 20088 <sup>a</sup>	0	8,96 ± 0,05	0
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083 <sup>a</sup>	0	0	0

Na sestavených druhově specifických médiích bylo později otestováno 10 komerčních preparátů, kdy počty vyrostlých kolonií jsou uvedeny v tabulce číslo 29. Tato média doplněná o mupirocin (100 mg/l) byla zcela selektivní pro rod *Bifidobacterium*. Po izolaci kolonií, vždy

6 izolátů z každého média, byl proveden test na detekci enzymu F6PPK, který potvrdil, že všechny kolonie náleží rodu *Bifidobacterium*.

Všechny hodnoty uvedené v tabulce jsou průměry (log KTJ/g) ze tří měření  $\pm$  SD.

Tabulka 29: Test výrobků na druhově specifických médiích

Produkt	MM médium ( <i>B. bifidum</i> )	Selektivita médiá v %	MT médium ( <i>B. longum</i> )	Selektivita médiá v %	MSM médium ( <i>B. breve</i> )	Selektivita médiá v %
Super Dophilus	9,67 $\pm$ 0,00	100 %	9,7 $\pm$ 0,01	66,66 %	9,23 $\pm$ 0,64	100 %
Laktobacilky baby	9,56 $\pm$ 0,01	83,33 %	*	nic	*	nic
Biopron JUNIOR	8,9 $\pm$ 0,33	83,33 %	*	nic	*	nic
BIFOLAC BALANCE	*	nic	9,5 $\pm$ 0,01	83,33 %	*	nic
APO-BABY PROBIO	9,58 $\pm$ 0,00	66,66 %	9,08 $\pm$ 0,05	50 %	8,8 $\pm$ 0,08	50 %
Lactobene	9,62 $\pm$ 0,04	50 %	*	nic	*	nic
APO - Lactobacillus 10+	9,52 $\pm$ 0,12	66,66 %	9,52 $\pm$ 0,46	66,66 %	9,3 $\pm$ 0,21	50 %
GS Lactobacily FORTE 20	9,32 $\pm$ 0,03	83,33 %	*	nic	*	nic
BioLac Baby	*	nic	*	nic	9,09 $\pm$ 0,08	
Bio-Kult	9,54 $\pm$ 0,04	100 %	9,6 $\pm$ 0,06	83,33 %	9,38 $\pm$ 0,17	83,33 %
<b>Průměry kmenů</b>	<b>9,4 <math>\pm</math> 0,25</b>	<b>79 %</b>	<b>9,48 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>67 %</b>	<b>9,16 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>71 %</b>

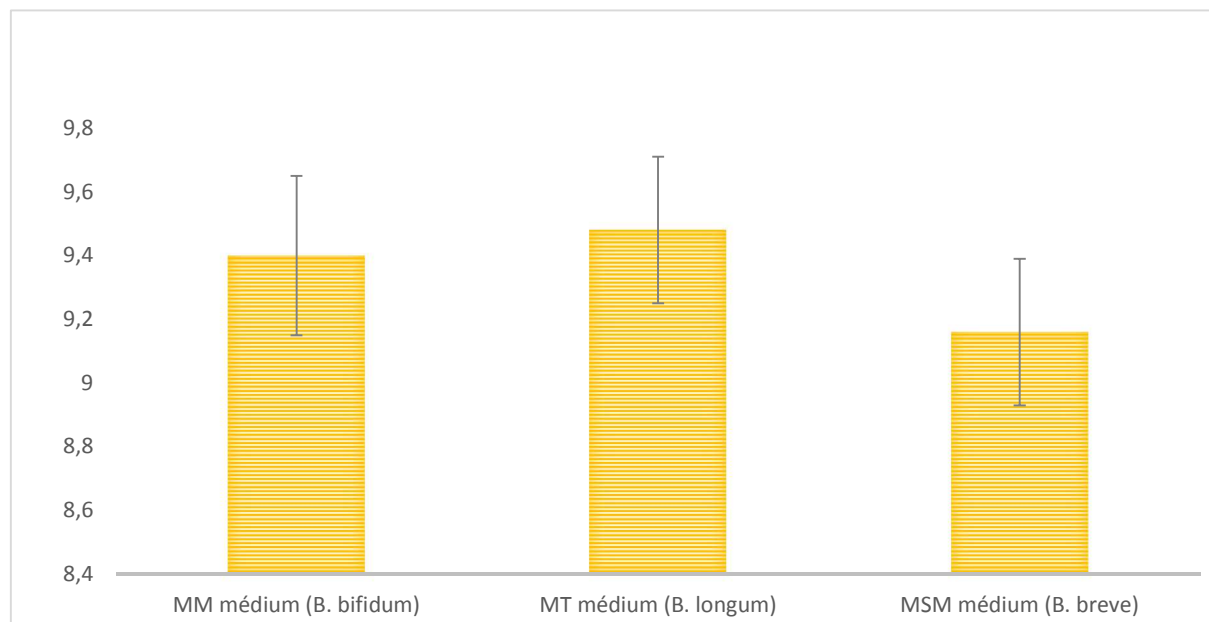
\*Výrobek nedeklaroval daný druh

Ze získaných výsledků uvedených ve výše zmíněné tabulce je vidět v jakých rozmezech se pohybovaly počty kolonií na jednotlivých druhově specifických médiích.

Počty kolonií na MM médiu se pohybovaly v rozmezí mezi 8,9 až 9,67 log KTJ/g. Průměrný počet kolonií na tomto médiu je roven **9,4 log KTJ/g**. Na MT médiu byl růst kolonií v rozmezí 9,08 až 9,7 log KTJ/g a průměrný jejich počet byl roven **9,48 log KTJ/g**. A na posledním navrženém druhově specifickém médiu, kterým bylo MSM médium, se počty pohybovaly od 8,8 do 9,38 log KTJ/g. Průměrný počet kolonií byl roven **9,16 log KTJ/g**.

Grafické znázornění průměrných hodnot kolonií v log KTJ/g na druhově specifických médiích je znázorněné v grafu číslo 3.

**Graf 3: Průměrné počty kolonií na druhově specifických médiích ( log KTJ/g)**



Pro podrobnější identifikaci izolátů byla provedena PCR, kdy pomocí druhově specifických primerů byly izoláty určeny až na úroveň druhu. Pomocí PCR jsme byli schopni spolehlivě říci, jaké druhy se podařilo na konkrétních pěstebních prostředích vykultivovat a určit tak selektivitu konkrétního, námi navrženého, druhově specifického média.

Spolehlivost ani jednoho z navržených druhově specifických médií není 100%. Vlivem širokého fermentačního profilu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* docházelo k poměrně častému růstu i na navržených druhově specifických médiích. Nicméně i přesto se jako nejselektivnější jeví MM médium, na kterém bylo *B. bifidum* stanoveno v **79 %**. Na MT médiu bylo stanoveno *B. longum* v **67 %** a na MSM médiu bylo stanoveno *B. breve* v **71 %**.

Nakonec byly výsledky získané pomocí molekulárně genetických metod srovnány s informacemi deklarovanými na obalech 16 komerčních výrobků, 13 probiotických doplňků a 3 jogurtů, které byly následně vyhodnoceny. Ukázalo se, že ve 2 výrobcích (Biopron Junior a Lactobene) výrobci deklarují výskyt *Bifidobacterium bifidum*, které zde ale izolováno ani identifikováno nebylo a místo toho bylo identifikováno *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, které naopak na obalu uvedeno vůbec nebylo. V dalších 5 výrobcích (Laktobacílky baby, APO- BABY PROBIO, BioLac Baby, APO - Lactobacillus 10+ a Biokult) výrobci nedeklarují *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, které zde detekováno bylo.

U zbylých 9 výrobků (Super Dophilus, PROBIO-FIX, BIFOLAC BALANCE, Biform, GS Lactobacily FORTE 20, Junior 2+ milk BIFIDUS, Activia-jogurt,

Hollandia- jogurt, Florian Active-jogurt) se výsledky identifikace shodují s informacemi uvedenými na jejich obalech.

Z tabulky číslo 30 je tedy vidět, že v komerčních výrobcích se často objevují i jiné druhy rodu *Bifidobacterium*, než které jsou uváděné výrobci na obaly.

Tabulka 30: Seznam výrobků s deklarovanými a identifikovanými bifidobakteriemi

Výrobek	<i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. animalis ssp. lactis</i>
Super Dophilus	Green	Green	Green	Yellow
PROBIO-FIX	Yellow	Yellow	Yellow	Green
Laktobacilky baby	Green	Yellow	Yellow	Blue
Biopron JUNIOR	Red	Yellow	Yellow	Blue
BIFOLAC BALANCE	Yellow	Green	Yellow	Yellow
APO-BABY PROBIO	Green	Green	Green	Blue
Lactobene	Red	Yellow	Yellow	Blue
Biform	Yellow	Yellow	Yellow	Green
APO - Lactobacillus 10+	Green	Green	Green	Blue
GS Lactobacily FORTE 20	Green	Green	Yellow	Yellow
BioLac Baby	Yellow	Yellow	Green	Blue
Bio-Kult	Green	Green	Green	Blue
Junior 2+ milk BIFIDUS	Yellow	Yellow	Yellow	Green
Activia (jogurt)	Yellow	Yellow	Yellow	Green
Hollandia (jogurt)	Yellow	Yellow	Yellow	Green
Florian Active (jogurt)	Yellow	Yellow	Yellow	Green

Green	Deklarováno/Detekováno
Blue	Nedeklarováno/Detekováno
Red	Deklarováno/Nedetekováno
Yellow	Nedeklarováno/Nedetekováno

## 6 Diskuse

Jak již bylo zmíněno, v této práci byly otestovány jak výživové doplňky (13 vzorků), tak jogurty (3 vzorky). Jejich testování bylo provedeno za účelem ověření růstu jednotlivých druhů bifidobakterií na médiích, určených buď ke kvantifikaci tohoto rodu, jako je normou doporučené **TOS** médium (Yakult) doplněné o mupirocin (100 mg/l), které použili ve své práci například Geng et al. (2014), dále pak **Wilkins - Chalgren** agar (Oxoid) s mupirocinem (100 mg/l) doplněným o sójový pepton (5 g/l), L-cystein (0,5 g/l), Tween 80 (1 ml/l) a ledovou kyselinu octovou (1 ml/l), což je komerčně připravený agar, který byl modifikovaný na katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU, a použitý v rámci již publikovaných studií, jako například Bunešová et al. (2014), která ho ve své práci použila pro kultivaci bifidobakterií v ovčím sýru. A dalším médiem použitým v této práci bylo komerčně připravené **BSM** médium (Sigma-Aldrich) doplněné o mupirocin (100 mg/l), které bylo použito v práci Simpson et al. (2004). Anebo na nově navržených, druhově specifických médiích, určených k jejich selektivnímu stanovení.

Zároveň bylo v této práci ověřeno, zda informace na obalech těchto výrobků odpovídají realitě, tedy zda se jednotlivé druhy uvedené na etiketě ve výrobku shodují s tím, co bylo skutečně izolováno a identifikováno. V první části práce se jednalo jak o ověření médií určených ke kvantifikaci rodu *Bifidobacterium*, tak ale i o kvantifikaci tohoto rodu.

Informace uváděné výrobcí jsou často nedostačující a je proto potřeba zaměřit se na kontrolu a regulaci trhu s probiotiky. Předpisy týkající bezpečnosti konkrétních mikroorganismů používaných v komerčních preparátech jsou definitivní. Výrobce by měl ale na etiketě jasně deklarovat rod, druh a kmen mikroorganismu, který je ve výrobku použit (EFSA, 2004; Sanders, 2009).

Mikrobiální analýzy probiotických výrobků určených k lidské spotřebě, bohužel ukázaly, že počet a „identita“ druhů ne vždy odpovídají informacím, které jsou uvedeny na etiketě (Temmerman et al., 2003; Coeuret et al., 2004).

Dávka probiotik, kterou pozřeme je důležitým faktorem, který má vliv na jejich koncentraci v různých částech gastrointestinálního traktu (Savard et al., 2011). Nicméně standard, který by stanovoval přijatelné množství probiotických bakterií, v potravních doplncích zatím nikdy nebyl stanoven a s největší pravděpodobností, podle EFSA (2004), ani nebude. Důvodem je fakt, že je v podstatě nemožné určit adekvátní množství těchto mikroorganismů (Raesi et al., 2013). Stejně tak i dle Verna a Lucak (2010) je optimální množství KTJ/g pro jednotlivé kmeny probiotických bakterií neznámé. Nicméně dávky bakterií

užívaných v humánních studiích jsou založeny na množství užívaných bakterií během testování na zvířatech a to i přes rozdílnost plochy gastrointestinálního traktu živočichů. Přičemž ale pro člověka obecně doporučovaná dávka  $10^9$  probiotických bakterií denně, se jeví jako optimální na základě výskytu probiotických organismů v lidské stolici (Tannock, 2003).

Každý druh bifidobakterií má specifické fyziologické požadavky na zdroj energie, který potřebuje ke svému růstu. Některé druhy bifidobakterií mají poměrně široký fermentační profil, jako například *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* a jiné mají naopak fermentační profil vcelku úzký, jako například *Bifidobacterium bifidum*. Proto je potřeba při sestavování média s těmito fakty počítat. Obecně lze ale říci, že požadavky jednotlivých druhů na živiny jsou velmi široké. Podrobnější informace ohledně fermentačních profilů jednotlivých druhů rodu *Bifidobacterium* jsou uvedeny v příloze číslo 6.

Sbírkových kmeny a probiotické výrobky byly nejdříve anaerobně kultivovány na třech základních agarových médiích určených ke kvantifikaci rodu *Bifidobacterium*: **TOS** (Yakult)/TOS-Mup, **BSM** (Sigma-Aldrich)/BSM-Mup a **Wilkins-Chagren** (Oxoid) s přídavkem mupirocinu (100 mg/l) a sójového peptonu.

**TOS agar**, který obsahuje podle normy ISO Standard 29981:2010/IDF 220:2010 (Merck, Německo) galaktooligosacharidy, které jsou získané z přeměny laktosy pomocí enzymu  $\beta$ -galaktosidasy, dále obsahuje síran hořečnatý, který v médiu působí na zlepšení růstu oslabených bifidobakterií a propionát sodný, který je zde inhibitorem růstu doprovodné mikroflóry, jsou specifickými růstovými faktory pro většinu bifidobakterií, zatímco ostatní bakterie mléčného kvašení tento sacharid zpravidla neutilizují.

Tyto TOS galaktooligosacharidy však nemusí být specifickým substrátem pro všechny kmeny rodu *Bifidobacterium*, protože dle Miranda et al. (2011) kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* (CIRMBIA 1335), nevykazoval žádný růst na tomto médiu i přes obsah TOS galaktooligosacharidů. Stejně tak jako bylo v rámci našeho testování zjištěno, že typový kmen *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 spolu s dalším sbírkovým kmenem *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239 vykazovaly **statisticky významně nižší růst** na tomto médiu obohaceném o mupirocin (100 mg/l, Oxoid) v porovnání s ostatními testovanými médii, což může být způsobeno v důsledku nižší schopnosti utilizace TOS galaktooligosacharidů těmito kmeny. Počty kolonií sbírkových kmenů na testovaných médiích jsou uvedeny ve výsledcích, v tabulce číslo 25. Mimo to je známo mnoho fyziologických specifíků pro konkrétní kmeny rodu *Bifidobacterium*.

Velikost a množství kolonií vyrostlých na TOS médiu, se lišily od kolonií vyrostlých na ostatních médiích, to naznačovalo, že se nejedná pouze o rod *Bifidobacterium*, což

po následné identifikaci bylo potvrzeno. Proto **počty kolonií** vyrostlých na tomto médiu a uvedených v tabulce číslo 26 **jsou vyšší**, než počty kolonií na jiných médiích. To může být způsobeno rozdílným složením médií. Hodnoty v řádcích uvedených ve výše zmíněné tabulce, tabulce číslo 26, **jsou statisticky odlišné** od ostatních testovaných médií.

Komerčně dostupné probiotické výrobky obvykle mívají  $10^6$  až  $10^{10}$  probiotických bakterií na gram výrobku a vzhledem k tomuto poměrně velkému rozmezí je nutné kontrolovat, aby minimální denní dávka činila alespoň  $10^9$  bakterií.

Při testování růstu bifidobakterií na médiích určených ke kvantifikaci rodu *Bifidobacterium*, tedy na **TOS, TOS-Mup, BSM, BSM-Mup a WCh-Mup** médiích se počty kolonií tohoto rodu v testovaných výrobcích pohybovaly v rozmezí mezi  $10^5$  až  $10^{10}$  KTJ/g, viz tabulka číslo 26 uvedená ve výsledcích, kromě výrobku Biform, který obsahoval méně než  $10^6$  KTJ/g bifidobakterií.

Je složité posoudit, zda ten či onen výrobek obsahuje dostatečné množství bifidobakterií, obzvláště v kombinaci s faktem, že více druhové výrobky neuvádí přesné množství jednotlivých bifidobakteriálních druhů. Tento fakt dělá v podstatě nemožné jednotlivé výrobky mezi sebou porovnat na základě celkového počtu bifidobakterií. Pouze tři vícedruhové produkty (Super DOPHILUS, LAKTOBACÍLKY baby a Apo-baby PROBIO) jasně deklarovaly počty jednotlivých druhů bifidobakterií.

Mupirocin je antibiotikum, které bylo prvotně vyzolované z bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Při nízkých koncentracích působí bakteriostaticky a naopak bakteriocidně působí při koncentracích vysokých. Je účinný jak proti G- bakteriím, tak proti G+ bakteriím. Toto antibiotikum inhibuje syntézu bakteriálních proteinů pomocí specifické a reverzibilní vazby na bakteriální enzym izoleucyl-tRNA-syntetasu, který je nezbytný pro proteosyntézu, bez níž bakterie umírají. Což je odlišné od většiny ostatních antibiotik, které působí buď na bakteriální DNA, nebo na stěny bakterií. Některé bakterie se ale vůči mupirocinu staly rezistentní, jako například rod *Staphylococcus*. Jedním z důvodů může být například expozice vůči jiným ATB (Feldman et al., 2005).

Mupirocin jakožto antibiotikum, které působí selektivně na rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconosoc* a *Streptococcus* nemá žádné inhibiční účinky na rod *Bifidobacterium* (Rada a Koc, 2000; Raesi et al., 2013). Toto je v souladu s námi zjištěnými výsledky.

Cílem toho testování bylo také vyvinutí vhodného druhově specifického média, aby byla možná snazší, rychlejší a spolehlivější kontrola komerčních výrobků a zároveň tak zabráněno klamání spotřebitele, tím že informace uváděné na obale se liší od toho, co se ve výrobku opravdu vyskytuje.



Po odečtení výsledků z biochemických testů, které byly provedeny za účelem zjištění substrátových preferencí jednotlivých druhů, byly tyto informace použity pro sestavení druhově specifických médií, která byla vždy doplněna o specifický sacharid, viz tabulka číslo 31 a mupirocin (100 mg/l). Po kultivaci na těchto nově navržených médiích byly vždy vyizolovány a následně identifikovány pouze bakterie rodu *Bifidobacterium*. Sice ISO Standard 29981:2010/IDF (International Dairy Federation) 220:2010 říká, že antibiotikum mupirocin (50 mg/l) inhibuje růst bakterií mléčného kvašení běžně se vyskytujících ve fermentovaných i nefermentovaných mléčných výrobcích. Nicméně dávkování 50 mg/l se ukázalo jako ne zcela selektivní v předběžných testech. Všechny testované agary v této studii obohacené mupirocinem (100 mg/l) se ukázaly jako vhodné pro selektivní stanovení čistých kultur bifidobakterií ve všech druzích probiotických výrobků (kapsle, kapky, sáčky).

Tabulka 35: Selektivní faktory pro jednotlivá druhově specifická média

Zkratka:	Selektivní faktor:	Druh:
MM	Mupirocin, mucin	<i>B. bifidum</i>
MT	Mupirocin, turanosa	<i>B. longum</i>
MSM	Mupirocin, sorbitol, manitol	<i>B. breve</i>

Tato nová druhově specifická média obohacená o mupirocin (100 mg/l) se sice ukázala jako zcela selektivní pro rod *Bifidobacterium*, nicméně jejich selektivita až na úroveň druhu zatím není 100%. Jak je již uvedeno ve výsledcích, selektivita médií se pohybuje **od 67 % do 79 %**. Přičemž jako nejselektivnější se zatím jeví **MM médium**, tedy médium obohacené o mucin (20 g/l).

Mucin, je multifunkční glykoprotein nacházející se jak v epitelových tkáních, tak ve značném množství i ve slinách (Andrianifahanana et al., 2006). Jeho struktura je tvořena peptidovým řetězcem nazývaným apomucin. Na něm jsou navázány až stovky glykoproteinových řetězců (Jonckheere et al., 2010), které jsou z 80 % tvořeny uhlíkatými látkami, jako jsou N- acetylgalaktosamin, N-acetylglukosamin, galaktosa, fruktosa, stopy manosy nebo kyselina sialová (Svensson et al., 2010). Velmi podobné složení jako mucin mají i oligosacharidy mateřského mléka, které obsahují N-acetylglukosamin, sacharidy jako je D- glukosa, D-galaktosa, L-fukosa a stejně jako mucin i kyselinu sialovou (Rockova et al., 2011). Vzhledem k tomu, že *Bifidobacterium bifidum* je s největší pravděpodobností první bakterií, která kolonizuje gastrointestinální trakt člověka (Turroni et al., 2011), dá se předpokládat, že umí pro svůj růst využívat právě tyto oligosacharidy mateřského mléka

a stejně tak i mucin, což potvrdil Crocian et al. (1994), když uvedl, že mucin je zdrojem uhlíku, který využívá pouze *Bifidobacterium bifidum*.

Tento multifunkční glykoprotein v nově navrženém druhově specifickém médiu, MM médiu, slouží jako selektivní faktor a měl by zde vyloučit růst ostatních druhů. Při zaočkování čisté kultury *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 na MM médium, tedy na médium navržené pro *B. bifidum*, byl zaznamenán nárůst kolonií. Jejich velikost však odpovídala velikosti „špendlíkové hlavičky,“ viz obrázek číslo 16.

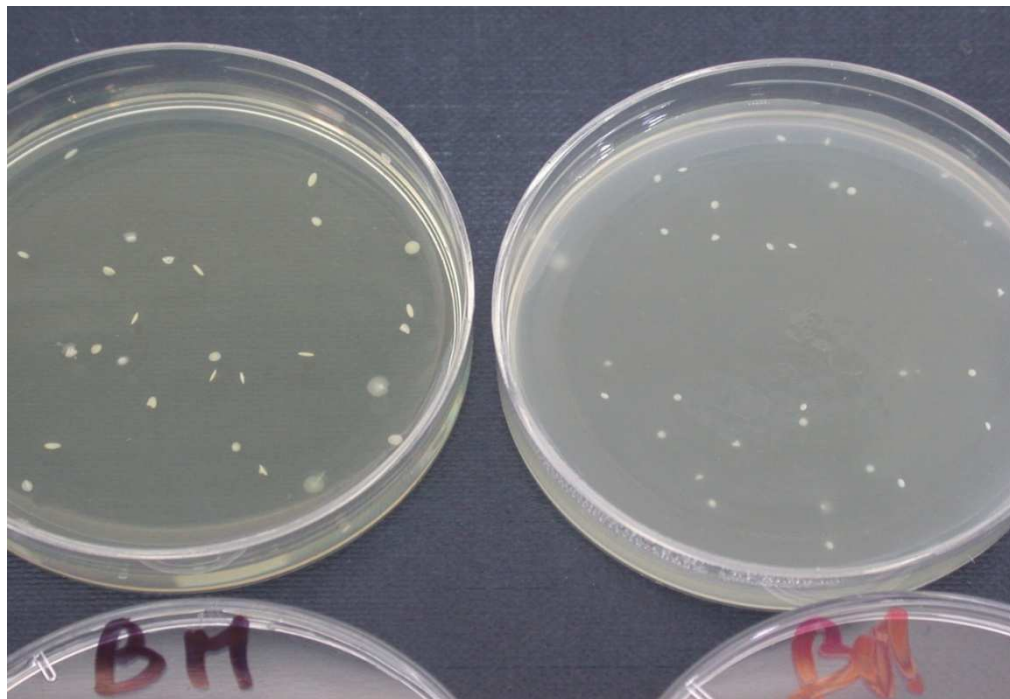
**Obrázek 16:** Narostlé kolonie na MM médiu se zaočkovanou čistou kulturou *B. animalis* ssp.



Tyto kolonie byly tak malé, že je bylo obtížné spočítat. Po jejich následném zaočkování do ředící řady obohacené o mucin již žádný nárůst nebyl zaznamenán, viz obrázek číslo 14 uvedený ve výsledcích. Tyto kolonie by proto neměly být počítány.

Kolonie typické pro *Bifidobacterium bifidum* jsou uvedené na obrázku číslo 17, viz níže.

Obrázek 17: Kolonie typické pro *B. bifidum* na WSCHP a MM agaru



Na ostatních druhově specifických médiích (MT, MSM) se *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* vyskytovalo poměrně v hojném počtu. Tento poddruh, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, s širokým fermentačním profilem, nemá výrazné substrátové preference a je velice dobře kultivovatelný a stabilní. Právě proto je hojně využívaných v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Výhodou *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* je jeho vysoká hodnota redoxpotenciálu, což má za následek zvýšenou odolnost vůči kyslíku v porovnání s jinými druhy rodu *Bifidobacterium* (Biavati a Mattarelli, 2012). U anaerobních bakterií je toto velkou výhodou.

Po identifikaci izolátů z probiotických výrobků, která byla provedena pomocí molekulárně genetických metod, z navržených druhově specifických médií (MM, MT, MSM), bylo zjištěno, že kromě druhů pro které bylo médium navrženo, na nich rostlo už „jen“ výše zmíněné *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*.

## 7 Závěr

Cílem práce bylo vyvinout metody pro selektivní stanovení jednotlivých druhů rodu *Bifidobacterium*, tedy pro *B. bifidum*, *B. longum* a *B. breve*.

V této práci byly otestovány jak čisté kultury rodu *Bifidobacterium*, tak i 16 komerčně dostupných probiotických výrobků, z toho 13 doplňků stravy a 3 jogurty. Testování bylo provedeno na 5 pěstebních prostředích určených ke kvantifikaci rodu *Bifidobacterium*, tedy na normou doporučeném TOS médiu doplněném o antibiotikum mupirocin (100 mg/l), **TOS** médiu (Yakult), komerčně vyráběném **BSM** médiu (Sigma-Aldrich), BSM médiu doplněném o mupirocin (100 mg/l) a na **Wilkins-Chalgren** agaru (Oxoid) s mupirocinem (100 mg/l) doplněném o sójový pepton (5 g/l), L-cystein (0,5 g/l), Tween 80 (1 ml/l) a ledovou kyselinu octovou (1 ml/l), což je komerčně připravený agar, který byl modifikovaný na katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU.

Dále byla navržena druhově specifická média, **MT médium**, navrženém pro *B. longum* doplněné o turanosu a mupirocin (100 mg/l), **MSM médium**, navrženém pro *B. breve* doplněné o manitol, sorbitol a mupirocin (100 mg/l) a **MM médium**, navrženém pro *B. bifidum* doplněné o mucin a mupirocin (100 mg/l). Sacharidy použité v sestavených druhově specifických médiích sloužily jako selektivní faktory pro konkrétní druhy bifidobakterií.

Výsledkem testování na druhově specifických médiích bylo zjištění, že testovaná média nejsou zcela selektivní, nicméně jednotlivé druhy rodu *Bifidobacterium* vykazovaly lepší růst na médiích pro ně navržených. Jednotlivá média je potřeba ještě lépe propracovat a pravděpodobně změnit některé komponenty, aby byla zlepšena jejich selektivita, nedocházelo ke kontaminaci a médium bylo 100% spolehlivé.

## 8 Seznam použité 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: Erba Lachema s.r.o., dostupné z:

<<http://www.erbalachema.com>>

[citováno: 18.3.2015]

Anonym 2: Biomerieux s.r.o., dostupné z:

<<http://www.biomerieux.com>>

[citováno: 18.3.2015]

Anonym 3: Bruker s.r.o., dostupné z:

<<http://www.bruker-sro.cz>>, <<http://www.bruker.com>>

[citováno: 18.3.2015]

Anonym 4: EU Register on nutrition and health claims, dostupné z:

<<http://ec.europa.eu/nuhclaims>>

[citováno: 18.3.2015]

Anonym 5: Společnost pro probiotika a prebiotika, dostupné z:

<[www.probiotika-prebiotika.cz](http://www.probiotika-prebiotika.cz)>

[citováno: 18.3.2015]

Anonym 6: Selective agar for enumeration of Bifidoacteria, dostupné z:

<[Aldrich.com](http://Aldrich.com)>

[citováno: 18.3.2015]

Anonym 7: Obrázek PCR, dostupné z:

<<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/pic/scanu8.gif>>

[citováno: 18.3.2015]

Anonym 8: Obrázek ředící řady, dostupné z:

<[http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap06/06-15\\_PlateCounts\\_1.jpg](http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap06/06-15_PlateCounts_1.jpg)>  
[citováno: 18.3.2015]

Arroyo, L., Cotton, L. N., Martin, J. H. 1994. Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture. *Cultured Dairy Products Journal*. 29. 20–24.

Arroyo, L., Cotton, L. N., Martin, J. H. 1995. AMC agar – a composite medium for selective enumeration of *Bifidobacterium longum*. *Cultured Dairy Products Journal*. 30. 12–15.

Ashraf, R., Shah, N. P. 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 194-208.

Banaszkiwicz, A., Szajewska, H. 2005. Probiotics in the treatment of constipation: a systematic review of randomized controlled trials. *Pediatr Wspolczesna*. 7. 9-14.

Bauerová, M., Turčani, M., Omelka, R. 2004. Polymerázová reťazová reakcia. *FPV UKF v Nitre*. Nitra. 15.  
Dostupne z WWW: <[www.kbg.fpv.ukf.sk/publikacie/PCRmaterial.pdf](http://www.kbg.fpv.ukf.sk/publikacie/PCRmaterial.pdf)>.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J. 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Marvil. Praha. 558.  
ISBN: 80-238-0297-6.

Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Letters in Applied Microbiology*. 11. 155–157.

Biavati, B., Scardovi, V., Moore, W. E. C. 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32. 358–373.

- Biavati, B., Mattarelli, P., Crociani, F. 1991. *Bifidobacterium saeculare* a new species isolated from faeces of rabbit. *Systematic and Applied Microbiology*. 14. 389–392.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torrianani, S., Bottazzi, V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 50. 117–131.
- Biavati, B., Mattarelli, P. 2012. Genus *Bifidobacterium*. 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. ISBN: 978-0-387-95043-3.
- Biliaderis, C. G., Izydorczyk, M. S. 2007. *Functional foods and nutraceuticals series*. CRC Press. 531. ISBN: 0-8493-1822-X.
- Bleichner, G., Bléhaut, H., Mentec, D. 1997. *Sacharomyces boulardii* prevents diarrhoea in critically ill tube fed patients. *Intensive Care Medicine*. 23. 517-523.
- Bohačenko, I., Pinkrová, J., Peroutková, J., Pechačová, M. 2007. Fermentace směsí laktosy a laktulosy kmenem *Lactobacillus acidophilus*. *Chemické listy*. 101. 911-915.
- Bonaparte, Ch. 1997. *Selective Isolation and Taxonomic Position of Bifidobacteria isolated from Commercial Fermented Dairy Products in Central Europe*. Disertační práce. Univerzita Berlín. 8-55.
- Bouhnik, Y., Flourie, B., Andrieux, C., Bisetti, N., Briet, F., Rambaud, J. C. 1996. Effects of *Bifidobacterium* sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *Journal of Clinical Nutrition*. 50. 269-273.
- 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., Killer, J., Vlková, E., Musilová, Š., Tomaska, M., Rada, V., Kmet', V. 2014. Isolation and characterization of bifidobacteria from ovine cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 188. 26-30. ISSN: 0168-1605.
- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., Gil, C. 2009. Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics*. 9. 4770-86.
- Calicchia, M. L., Wang, C. I. E., Nomura, T., Yotsuzuka, F., Osato, D. W., 1993. Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and Streptomycin-Resistant *Lactobacillus acidophilus* from Mixed Probiotic Product. *Journal of Food Protection*. 56. 954- 957.
- Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J. P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*. 97. 147-156.
- Collins, M. D., Gibson, G. R. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69. 1052–1057.
- Crittenden, G. R., Playne, M. J. 1996. Production, properties and applications of foodgrade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*. 7. 353-361.
- Crittenden, R. G. 1999. Prebiotics. In: Tannock, G. W. (ed) *Probiotics – A Critical Review*. Horizon Scientific Press. Norfolk, England. 141-156.
- 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.
- Čikoš, Š., Koppel, J., Kantíková, M. 2001. Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike. *Státní veterinární ústav. Košice*. 203



- Dave, R. I., Shah, N. P. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 79. 1529-1536.
- De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *The Journal of Applied Bacteriology*. 23. 130–135.
- Dellaglio, F., Felis, G. E. 2005. Taxonomy of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. In: Probiotic and Prebiotics Scientific aspekt. Gerald W. Tannock (ed). University of Otago. Dunedin, New Zealand. 25-49. ISBN: 978-1-904455-01-1.
- Doleyres Y., Lecroix C. 2005. Technologies with free and immobilized cells for probiotic bifidobacterium production and protection. *International Dairy Journal*. 15. 973–988.
- Dong, P., Yang, Y., Wang, W., 2010. The role of intestinal bifidobacteria on immune systém development in young rats. *Early Human Development*. 86. 51-58.
- Douglas, L. C., Sanders, M. E. 2008. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. *Journal of the American Dietetic Association*. 108. 510–521.
- EFSA. 2004. European Food Safety Authority (EFSA) Scientific colloquium on microorganisms in food and feed: Qualified presumption of safety. Dostupné z WWW: <<http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/colloquiaqps.pdf>>
- Ellner, P. D., Stoessel, C. J., Drakeford, E., Mack, E. G. 1966. A new culture medium for medical bakteriology. *American Journal of Clinical Pathology*. 45. 502-504.
- 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.
- Feldman, S. R., Phelps, K. C., Verzino, K. C. 2005. Handbook of Dermatologic drug therapy. Taylor a Francis. USA. 320. ISBN: 1-84214-260-7.

- Forman, L. 1996. Mlékárenská technologie II. VŠCHT. Praha. 228. ISBN: 80-7080-250-2.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*. 66. 365– 378.
- Gajdůšek, S. 2002. Mlékařství II. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. 135. ISBN: 8071573426.
- Geng, J., Chiron, C., Combrisson, J. 2014. Rapid and specific enumeration of viable Bifidobacteria in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study. *International Dairy Journal*. 37. 1-4.
- Ghoddussi, H. B., Robinson, R. K. 1996. Enumeration of starter cultures in fermented milks. *Journal of Dairy Research*. 63. 151–158.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., Cummings, J. H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 108. 975–82.
- 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.
- 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.
- Gilliland, S. E. 2001. Probiotics and prebiotics. In: *Applied Dairy Mikrobiology*, Marth, E. H., Steele, J. L. (ed). Marcel-Dekker. New York. 327–343.
- Görner ,F., Valík L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia potravín. Malé Centrum. Bratislava. 528. ISBN: 80-967064-9-7.
- Grajek, W., Olejnik, A., Sip, A. 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functionalfoods. *Acta Biochimica Polonica*. 52. 665–671.

- Grinsted, E., Hirsch, A. 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic sporeformers from cheese, with observations on the effect of nisin. *Journal of Dairy Research*. 21. 101–110.
- Hansen, E. B. 2004. Microorganism. In: *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. First edition (edited by Hui, Y. H., Goddik, M., Hansen, A. S., Josephsen, J., Nip, W. K., Stanfield, P. S., Toldrá, F.). Marcel-Dekker. New York. 9-21. ISBN: 0824747800.
- Hartemink, R., Kok, B. J., Weenk, G. H., Rombouts, F. M. 1996. Raffinose-Bifidobacteriu (RB) agar a new selective medium for bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 27. 33-43.
- Hartemink, R., Rombouts, F. M. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*. 36. 181-192.
- Heinrichs, A. J., Jones, C. M., Elizondo-Salazar, J. A., Terrill, S. J. 2009. Effect of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. *Livestock Science*. 125. 19-154.
- Hickey, M. W., Hillier, A. J., Jago, G. R. 1986. Transport and Metabolism of Lactose, Glucose, and Galactose in Homofermentative Lactobacilli. *Applied and Enviromental Microbiology*. 51. 825–831.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26. 87-107.
- Hoyles, L., Inganas, E., Falsen, E., Drancourt, M., Weiss, N., McCartney, A. L., Collins, M. D. 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52. 995–999.
- Hrubý, S. 2007. Probiotika a prebiotika. *Výživa a potraviny*. 62. 6.

- Chang, J. H., Kwon, I. K., Kim, H. U. 1983. Studies on the bifidobacteria in Brest-fed Korean infant gut. Korean Journal of Dairy Science. 5. 11.
- Chapon, J. L., Kiss, K. 1991. Numération des bifidobactéries dans les fait fermentés. Proposition pour une méthode microbiologique. Trav. Chim. Aliment. Hyg. 82. 264 - 277.
- Iwana, H., Masuda, H., Fujisawa, T., Suzuki, H., Mitsuoka, T. 1993. Isolation and identification of *Bifidobacterium* spp. in commercial yoghurts sold in Europe. Bifidobacteria Microflora. 12. 39-45.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. International Journal of food microbiology. 35. 1-7.
- Chevalier, P., Roy, D., Ward, P. 1990. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. Journal of Applied Bacteriology. 68. 619–624.
- ISO/IDF. 2010. Milk products-enumeration of presumptive bifidobacteria-colony count technique at 37 °C. ISO Standard 29981:2010/IDF 220: 2010.
- Jonckheere, N., Van Seuning, I. 2010. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. Biochimie. 92. 1-11.
- Jurinke, Ch., Oeth, P., van den Boom, D. 2004. MALDI-TOF Mass Spectrometry. Molecular Biotechnology. 26. 147-163.
- Kadlec, P. 2002. Technologie potravin II., 1.vyd. Praha: VŠCHT. 236. ISBN: 80-7080-510-2
- Kaur, I. P., Chopra, K., Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 5. 1–9.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrazek, J., Rada, V., Dubna, S., Marounek, M. 2009. Bifidobacteria in the digestive tract of bumblebees. Anaerobe. 16. 165–170.

- Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, J., Havlík, J., Koppová, I., Benada, O., Rada, V., Kofronová, O. 2010. *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Bifidobacteriaceae isolated from the digestive tract of bumblebees. *Systematic and Applied Microbiology*. 33. 359–366.
- Killer, J., Marounek, M. 2011. Fermentation of mucin by bifidobacteria from rectal samples of human and rectal and intestinal samples of animals. *Folia Microbiologica*. 56. 85-89.
- Kim, M. S., Roh, S. W., Bae, J. W. 2010. *Bifidobacterium stercoris* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60. 2823- 2827.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Food Microbiology*. 41. 103-125.
- Kolakowski, P., Malinowska, M., Gerlich, J. 2010. The use of transoligosaccharides (TOS) propionate agar medium with mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in dairy cultures and in fermented dairy products. *Milchwissenschaft*. 65. 380–384.
- Kostinek, M., Spcht, I., Edward, V. A., Pinto, C., Egounlety, M. Sossa, C., Mbugua, S., Dortu, C., Thonart, P., Taljaard, L., Mengu, M., Franz, C. M. A. P., Holzappel, W. H. 2007. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 114. 342-351.
- Laehy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 98. 1303-1315.
- Lapierre, L., Undeland, P., Cox, L. J. 1992. Lithium Chloride-Sodium Propionate Agar for the Enumeration of Bifidobacteria In Fermented dairy Products. *Journal of Dairy Science*. 75. 1192-1196.

- Lasch, P., Beyer, W., Nattermann, H., Stämmler M., Siegbrecht, E., Grunow, R., Naumann, D. 2009. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Applied Environmental Microbiology*. 75. 7229-42.
- Lauer, E., Kandler, O. 1983. DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of genus *Bifidobacterium*. *Systematic Applied Microbiology*. 4. 42-64.
- Lauer, E., 1990. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov., isolated from human feces. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40. 100–102.
- Lee Y., Salminen, S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons. New Jersey. 585. ISBN: 978-0-470-13544-0.
- Lilly, D. M., Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147. 747–748.
- Lim, K. S., Huh, S., Baek, Y. J., Kim, H. U. 1995. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*. 78. 2108-2212.
- Liu, H., Du, Z., Wang, J., Yang, R. 2007. Universal Sample Preparation Method for Characterization of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied Environmental Microbiology*. 73. 1899–1907.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 11. 1–17.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H.. 2012. Order *Lactobacillales*. In: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Second edition (edited by De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitmann, W. B). Volume 3. Springer. New York. 464 - 510. ISBN: 978-0-387-95043-3.

- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., Oyaizu, H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA- gene- targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 65. 4506–4512.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R. 2003. Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Current Issues of Intestinal Microbiology*. 4. 61- 69.
- Matsumoto, M., Ohishi, H. and Benno, Y. 2004. H<sup>+</sup> -ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Food Microbiology*. 93. 109-113.
- Mättö, J., Malinen, E., Suihko, M. L., Alander, M., Palva, A., Saarela, M. 2004. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 97. 459-470.
- 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., Philipp, E., Steinegger, G., Mayrhofer, S., Kneifel, W. 2007. Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* from reference strains and commercial probiotic strains. *International Dairy Journal*. 17. 565- 573.
- Mayo, B., van Sideren, D. 2010. Bifidobacteria: Genomic and molecular aspects. Caister academic press. Portland. USA. ISBN: 978-1-904455-68-4.
- McPherson, M. J., Moller, S. G. 2006. PCR. Taylor and Francis group. UK. 292. ISBN: 0- 203- 00267- 9.
- 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. 2003. Enumeration of Bifidobacteria in Gastrointestinal Samples from piglets. *Applied and Environmental 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.
- Mitsouka, T., Segal, T., Yamamoto, S. 1965. Eine verbesserte metodik der qualitativen und quantitative Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde , Infektionskrankheiten und Hygiene (1. Abteilung Originale)*. 195. 455-469.
- Mitsuoka, T. 1969. Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals, including descriptions of *Bifidobacterium thermophilum* nov.spec. and *Bifidobacterium pseudolongum* nov. spec. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde. Infektionskrankheiten und Hygiene*. 210. 52–64.
- Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology*. 6. 263-268.
- Mitsuoka, T. 1992. The human gastrointestinal tract. In: B. J. B. Wood (ed): *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Applied Science. London. 69-114.
- Modler, H. W., McKellar, R. C., Yaguchi, M. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute of Food Science*. 23. 29-41.
- Munoz, F. J., Pares, R. 1988. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 54. 1715-1718.
- Nebra, Y., Blanch, A. R. 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 65. 5173-5176.



- Nevoral, J. 2005. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*. 2. 59-65.
- Okamoto, M., Benno, Y., Leung, K. P., Maeda, N. 2008. *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58. 144–148.
- Orla-Jensen, S. 1924. La classification des bacteries lactiwues. *Lait*. 4. 488-474.
- Ouwehand, A. C. 2007. Antiallergic Effects of Probiotics. *The Journal of Nutrition*. 137. 794- 797.
- Ouwehand, A. C., Svendsen, L. S., Leyer, G. 2011. Probiotics: from Strain to Product. In: Kneifel, W., Salminen, S., and Gould, G. *Probiotics and health claims*. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell.
- Pacher, B., Kneifel, W. 1996. Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *International Dairy Journal*. 6. 43–64.
- Parisi, D., Magliulo, M., Nanni, P., Casale, M., Forina, M., Roda, A. 2008. Analysis and classification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and a chemometric approach. *Analytica and Bioanalytical Chemistry*. 391. 2127- 34.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*. 29. 4 – 8.
- Pavlik, E. 1999. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku. *Labor Aktuell*. 99. 22–25.
- 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.

- Prasanna, P. H. P., Grandison, A. S., Charalampopoulos, D. 2014. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International*. 55. 247-262.
- Rada, V., Koc, J. 2000. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft*. 55. 65-67.
- Rada, V., Petr, J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*. 43. 127 – 132.
- Rada V., Petr J, 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Veterinary Medicine–Czech*. 47. 1–4.
- Rada, V., Maxa, V. 2002. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. *ÚZPI. Praha*. 11-14.
- Rada, V., Marounek, M. 2005. Probiotika a prebiotika ve výživě zvířat. *Vědecký výbor výživy zvířat. Praha*. 42.
- Rada, V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi*. 12. 92-97. ISSN: 1212 - 7299.
- Raeisi, S. N., Ouoba, L. I. I., Farahmand, N., Sutherland, J., Ghoddusi, H. B. 2013. Variation, viability and validity of bifidobacteria in fermented milk products. *Food Control*. 34. 691-697.
- Rafter, J., Bennet, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P. C. 2007. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *American Journal of Clinical Nutrition*. 85. 488-496.
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., Setu, M. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *AKMMC*. 4. 1-7.

- Rasic, J. L., Kurmann, J. A. 1983. Bifidobacteria and their role: microbiological, nutritional, physiological., medical and technical aspects and bibliography. *Experientia Supplementum*. Birkhäuser Basel, Switzerland. 295. ISBN: 3764312149.
- Rasic, J., Sad, N. 1990. Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 252. 24-34.
- Resnick, I. G., Levin, M. A. 1981. Quantitative Procedur for Enumeration of Bifidobacteria. *Applied and Enviromental Microbiology*. 427-432.
- Reuter, G. 1963. Comparative studies on the Bifidus-flora in the faeces of infants and adults With a contribution to classification and nomenclature of bifidus strains. *Virusforschung und Parasitologie Originale*. 486–507.
- Reuter, G. 1990. Bifidobacteria cultures as components of yoghurt–like products. *Bifidobacteria and Microflora*. 9. 107–118.
- Reyed, M. Reyed, Zhubanova, A. A., Savitskaya, I. S. 2004. Probiotics: A novel approach in the management and treatment of diarrhea disease. *Vestnik Kazny Eco. Bull.*14. 93-103.
- Reyed, M. 2007. The Role of Bifidobacteria in Health. *Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2. 14–24.
- Roberfroid, M. B. 2000. Prebiotics and probiotics: Are they functional food?. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71. 1682–1687.
- Roberfroid, M., Slavin, J. 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40. 461-480.
- Roberfroid, M. 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and liver disease*. 34. 105-110.
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: The koncept Revisited 1, 2. *The Journal of Nutrition*. 137. 830-837.

- Robinson, R. K. 1995. *A Colour Guide to Cheese and Fermented Milks*. Chapman & Hall. London. 187. ISBN: 0412394200.
- Rockova, S., Nevoral, J., Rada, V., Marsik, P., Sklenar, J., Hinkova, A., Vlkova, E., Marounek, M. 2011. Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. *International Dairy Journal*. 21. 504–508.
- Rotel, R. A., Gibson, G. R.. 2002. Prebiotic oligosaccharides: Evaluation of biological activities and potential future developments. In: Tannock, G. W. (ed) *Probiotics and Prebiotics, Where are we going*. Caister Academic Press. Norfolk, England. 107-148.
- Rowland, I. R., Tanaka, R. 1993. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with human faecal microflora. *Journal of Applied Bacteriology*. 74. 667-674.
- Roy, D., Mainville, I., Mondou, F. 1997. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *International Dairy Journal*. 7. 785-793.
- 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.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., Rastall, R. A. 2001. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 91. 878-887.
- Saito, Y., Tanaka, T., Rowland, I. R. 1992. Effects of soybean oligosaccharides on the human gut microflora in in vitro culture. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 5. 105–10.
- Samona, A., Robinson, R. K. 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*. 44. 64-66.

- Sanders, M. E. 2009. How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic?. A guideline for consumers and health care professionals. *Functional Food Reviews*. 1. 3-12.
- Savard, P., Lamarche, B., Paradis, M. E., Thiboutot, H., Laurin, É., Roy, D. 2011. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA- 5- containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 50-57.
- Scardovi, V., Trovatelli, L. D, 1969. New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg*. 123. 64–88.
- Scardovi, V., Crociani, F. 1974. *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 24. 6–20.
- Scardovi, V., Trovatelli, L. D. 1974. *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov., and the “minimum” and “subtile” groups of new bifidobacteria found in sewage. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 24. 21–28.
- Scardovi, V., Zani, G. 1974. *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large, acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 24. 29–34.
- Scardovi, V., Trovatelli, L. D., Biavati, B., Zani, G. 1979. *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 29. 291–311.
- Scardovi, V. Genus *Bifidobacterium*. 1986. Genus *Bifidobacterium*. In: *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Eds.: Sneath, P.H.A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G.). Williams and Wilkins. Baltimore. 1418–1434.

- Sedláček, I. 2007. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita. Brno. 270.  
ISBN: 80 - 210 4207 - 9.
- Shortt, C., O'Brien, J. 2004. Handbook of functional dairy products. Boca Raton. London. 293.  
ISBN: 1-58716-077-3.
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M., Desiere, F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflect its adaptation on the human gastrointestinal tract. PNAS. 99. 14422-14427.
- Schrezenmeir, J., de Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching and definitiv. American Journal of Clinical Nutrition. 32. 361–364.
- Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54. 401–406.
- Sozzi, T., Brigiti, P., Mignot, O., Matteuzzi, D. 1990. Use of dicloxacillin for the isolation and counting of bifidobacteria from dairy products. Le Lait. 70. 357-361.
- Subramanian, M. R., Talluri, S., Christopher, L. P. 2014. Production of lactic acid using a new homofermentative *Enterococcus faecalis* isolate. Microbial Biotechnology. 12133. 1751- 7915.
- Svensson, O., Arnebrant, T. 2010. Mucin layers and multilayers - physicochemical properties and applications. Cuurrent Opinion in Colloid a Interface Science. 15. 395-405.
- Šilhánková, L. 2008. Mikrobiologie pro potravináře. Academia. Praha. 363.  
ISBN: 976- 80- 200- 1703-1.
- Štursa, P., Junková, P., Strejček, M., Macek, T., Macková, M. 2010. MALDI-TOF MS simple and rapid tool for identification of bacteria isolated from enviroment. Listy cukrovarnické a řepařské. 126. 412-413.

- Tamine, A. Y., Robnson, R. K. 2001. *Yogurt Science and Technology*. Woodhead Publishing. 578. ISBN 978-0-8493-1785-9
- Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M. 1983. Effects of administration of TOS and bifidobacterium breve 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora*. 2. 17- 24.
- Tannock, G. W. 1999. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Molecular Biology*. 1. 53-64.
- Tannock, G. W., 2003. Probiotics: time for a dose of realism. *Current Issues of Intestinal Microbiology*. 4. 33-42.
- Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., Swings, J. 2003. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69. 220–226.
- Teraguchi, S., Uehara, M., Ogasa, K., Mitsuoka, T. 1978. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Japanese Journal of Bacteriology*. 33. 753-761.
- Tissier, H. 1900. *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique)*. Thèse de médecine de l'Université de Paris, France. 253.
- Trovatelli, L. D., Crociani, F., Pedinotti, M., Scardovi, V., 1974. *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: a new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit faeces. *Archives of Microbiology*. 98. 187–198.
- Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Bruck, W. M., Gibson, G. R. 2005. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics – assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design*. 11. 75-90.
- Turroni, F., van Sinderen, D., M., Ventura. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 37–44.

- Udo, E. E., Farook, V. S., Mokades, E. M., Jacob, L. E., Sanyal, S. C. 1999. Molecular Fingerprinting of Mupirocin-Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Burn Unit. *International Journal of Infectious Diseases*. 3. 8-87.
- Velíšek, J., Cejek, K. 2008. *Biosynthesis of Food Components*. OSSIS. Tábor. 512. ISBN: 978- 80-86659-12-1.
- Ventura, M., Reniero, R., Zink, R. 2001. Specific Identification and Targeted Characterization of *Bifidobacterium lactis* from Different Environmental Isolates by a Combined Multiplex-PCR Approach. *Applied and Environmental Microbiology*. 67. 2760–2765.
- 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.
- Ventura, M., van Sinderen, D., Fitzgerald, G., F., Zink, R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86. 205-223.
- Verna, E. C., Lucak, S. 2010. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 3. 307-319.
- Vlková, E., Medková, J., Rada, V. 2002. Comparison of four methods for identification of bifidobacteria to the genus level. *Czech Journal of Food Sciences*. 20. 171-174.
- Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I., 2004. Enumeration, isolation and identification of bifidobacteria from dairy product. *Acta Agriculturae Slovenica* 84. 31-36.
- Vodrážka, Z. *Biochemie*. 2002. Academica. Praha. 191. ISBN 80-200-0600-1.
- Vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin.



Vyhláška č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.

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

Wijsman, R. M., ET AL. 1989. *Veterinary Milk Dairy Journal*. 43. 395-405.

Wilkins, T. D., Chalgren, S. 1976. Medium for use in antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 10. 926-928.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

BMK = bakterie mléčného kysání

CTAB = citridium bromid

F6PPK = fruktoso–6-fosfát fosfoketolasa

GIT = gastrointestinální trakt

MALDI-TOF = Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight

MM = Mucin, mupirocin médium

MRS = De Man, rogosa, sharpe

MT = Mupirocin, turanosa médium

MTPY = Modifikovaný tryptone, phytone, yeast agar

MUP = Mupirocin

MSM = Sorbitol, manitol, mupirocin médium

MW = modifikovaný Wilkins-Chalgren agar

KTJ = kolonie tvořící jednotky

PCR = Polymerázová řetězová reakce

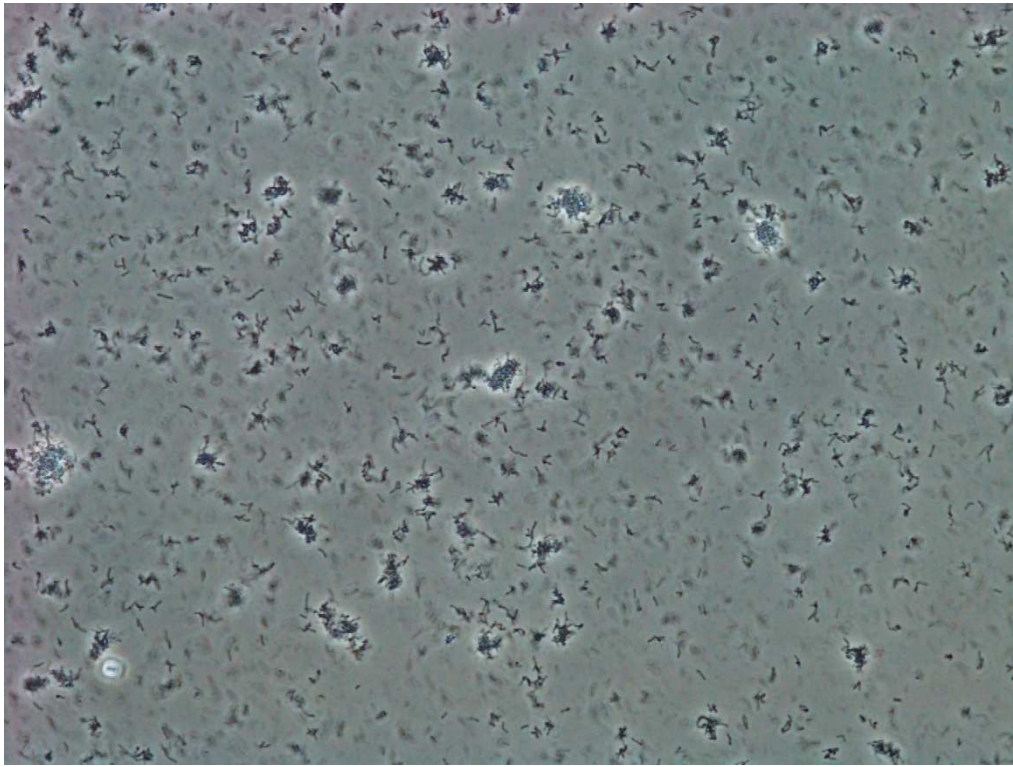
TOS = Transgalaktosylované oligosacharidy

TPY = Tryptone, phytone, yeast agar

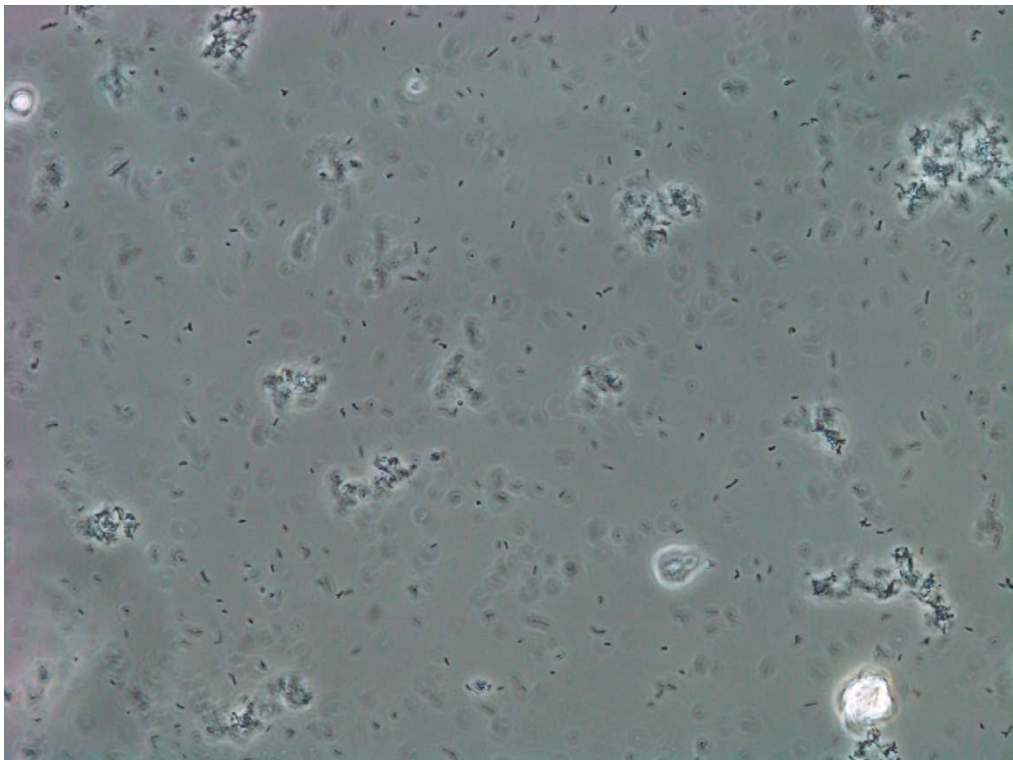
WCh = Wilkins–Chalgren médium

## 10 Samostatné přílohy

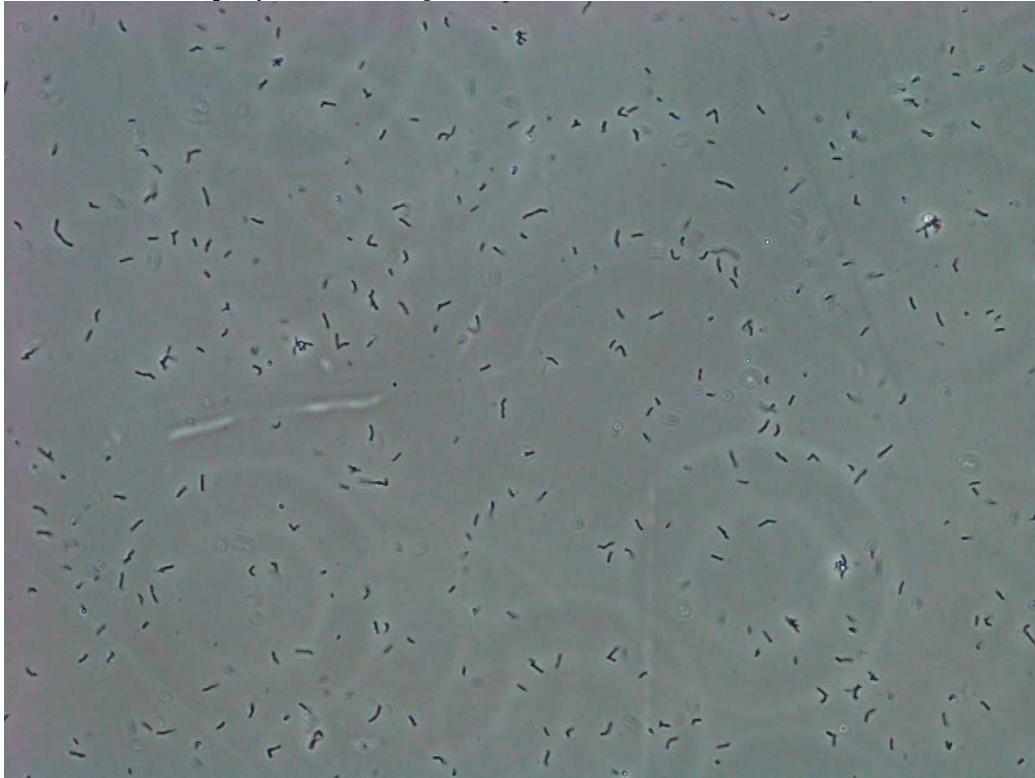
Příloha 1: Mikroskopický obrázek shlukujícího se *B. bifidum*



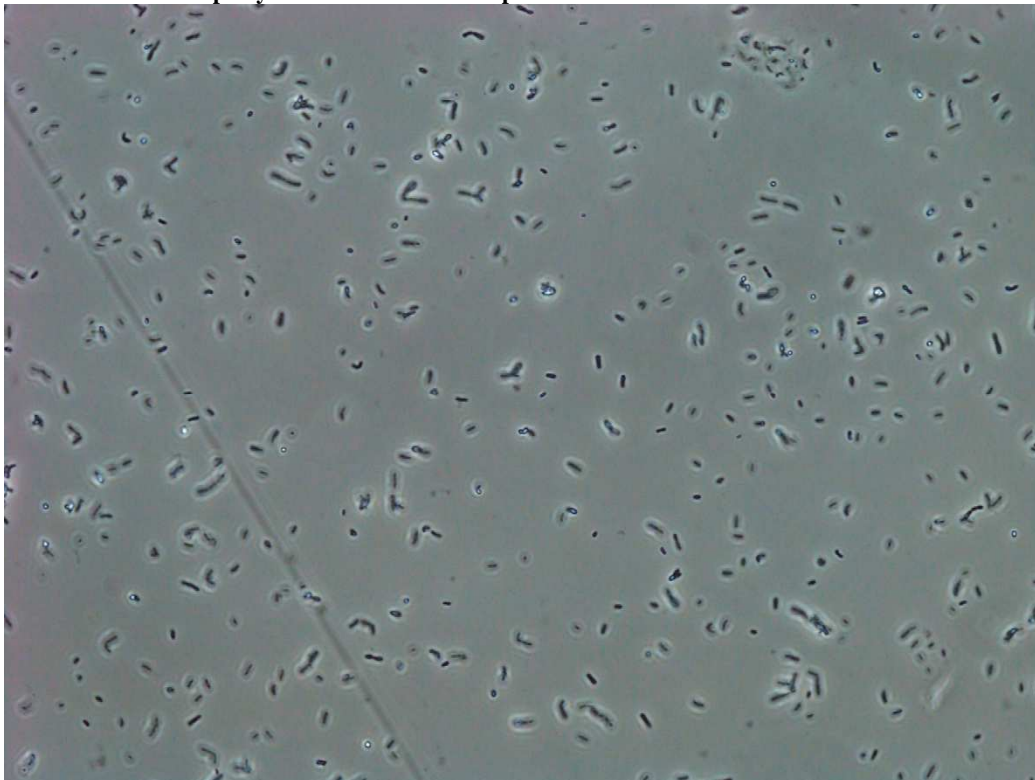
Příloha 2: Mikroskopický obrázek *B. breve*



**Příloha 3: Mikroskopický obrázek *B. longum***



**Příloha 4: Mikroskopický obrázek *B. animalis* ssp. *lactis***



**Příloha 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
Ovčí defibrinovaná krev	50				
Masový extract	2,4			8	
Pepton (Proteose)	10			10	10
Pepton	5		5		
Sójový pepton (Phytone)	3	5	5		
Kvasničný extract (autolyzát)	5				
Játrový extract	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

Příloha 6: 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	Gluconate	Xylose	Mannose	Fructose	Galactose	Sucrose	Maltose	Threulose	Meliose	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. seuculare</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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

Příloha 7: Substrátové preference sbírkových kmenů rodu *Bifidobacterium* zjištěné pomocí API 50 CHL

		<i>B. breve</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>			<i>B. breve</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>
		DSM 20213	DSM 20219	DSM 20082			DSM 20213	DSM 20219	DSM 20082
kontrola	0	0	0	0	esculin	25	3	3	3
glycerol	1	0	0	0	salicin	26	0	0	0
erytrol	2	0	0	0	cellobiosa	27	0	0	0
D-arabinosa	3	0	0	0	maltosa	28	3	3	
L-arabinosa	4	0	3	0	laktosa	29	3	3	3
ribosa	5	2	0	0	mellibiosa	30	3	3	0
D-xylosa	6	3	3	0	sacharosa	31	3	3	0
L-xylosa	7	0	0	0	trehalosa	32	0	0	0
adonitol	8	0	0	0	inulin	33	0	0	0
β-methyl-xylosa	9	0	0	0	mlecitosa	34	3	3	0
galaktosa	10	3	3	3	rafinosa	35	3	3	0
D-glukosa	11	3	3	3	škrob	36	3	0	0
D-fruktosa	12	3	2	3	glykogen	37	3	0	0
D-mannosa	13	2	2	0	xylitol	38	0	0	0
L-sorbosa	14	0	0	0	gentibiosa	39	0	0	1
rhamnosa	15	0	0	0	turanosa	40	1	3	0
dulcitol	16	0	0	0	D-xylosa	41	0	0	0
inositol	17	0	0	0	D-tagalosa	42	0	0	0
mannitol	18	3	0	0	D-fukosa	43	0	0	0
sorbitol	19	3	0	0	L-fukosa	44	1	0	0
α-methyl-D-mannosid	20	0	0	0	D-arabitol	45	0	0	0
α-methyl-D-glykosid	21	1	2	0	l-arabitol	46	0	0	0
N-acetyl glukosamin	22	0	0	1	glukonát	47	0	0	0
amygdalin	23	0	0	0	2-keto-glukonát	48	0	0	0
arbutin	24	0	0	0	5-keto-glukonát	49	0	0	0