

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Optimalizace podmínek kultivace anaerobních
probiotických mikroorganismů**

Diplomová práce

Bc. Tereza Brousilová

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Optimalizace podmínek kultivace anaerobních probiotických mikroorganismů" 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 19. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní prof. Ing. Evě Vlkové PhD za trpělivost, cenné rady a odborné vedení, které mi po celou dobu psaní této diplomové práce věnovala. Také bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším přátelům za jejich nekonečnou podporu a pochopení.

Optimalizace podmínek kultivace anaerobních probiotických mikroorganismů

Souhrn

Probiotika jsou živé nepatogenní mikroorganismy, které se užívají k posílení střevní mikrobiální rovnováhy a jsou dostupná ve formě probiotických doplňků stravy, potravin nebo léčiv. Vzhledem k tomu, že používané kmeny jsou většinou fakultativně anaerobní nebo striktně anaerobní, je nezbytné při jejich kultivačním stanovení, které je používané pro kontrolu mikrobiologické kvality, zachovávat anaerobní podmínky při celém procesu. Stejná zásada platí pro stanovení anaerobních mikroorganismů ve vzorcích z trávicího traktu. Existují různé možnosti přípravy ředících médií, které zajišťují eliminaci kyslíku z prostředí.

Cílem této práce bylo porovnat vliv postupu přípravy ředících médií na stanovené počty anaerobních mikroorganismů ve vzorcích probiotických doplňků stravy a stolice dospělých dobrovolníků. Ve zkumavkách a vialkách s ředícím médiem byly vytvořeny anaerobní podmínky třemi různými způsoby: čistý CO₂, potravinářský CO₂ a vyvaření. Na selektivních polotuhých médiích byly následně stanoveny laktobacily, bifidobakterie a celkové počty anaerobních mikroorganismů. Z výsledků vyplynulo, že všechny použité postupy přípravy ředícího média jsou pro stanovení vhodné a není mezi nimi statisticky významný rozdíl. Dále z výsledků vyplynulo, že 5 vzorků probiotických doplňků stravy, které byly v době stanovení před koncem doby minimální trvanlivosti, nesplnily deklarovaný počet probiotických mikroorganismů. U zcela nově zakoupených vzorků deklarované počty nesplnil pouze jeden vzorek. Na závěr bylo ověřováno, zda výrobce správně deklaruje názvy druhů probiotických mikroorganismů. Správně deklarované všechny názvy mikroorganismů na obalech probiotických doplňků stravy splnil pouze jeden vzorek.

Z výsledků vyplynulo, že všechny použité postupy jsou pro stanovení anaerobních mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy vhodné. Lze tedy doporučit postup, který je časově a technicky nejméně náročný, což je varianta, kdy bylo použito pouze vyvaření média. Dále je nezbytné zajistit přísnější kontroly probiotických doplňků stravy dodávaných na trh, aby nedocházelo ke klamání spotřebitele. A v neposlední řadě je zapotřebí hledat účinné metody umožňující spolehlivou identifikaci a detekci jednotlivých mikroorganismů přítomných v probiotických doplňcích stravy.

Klíčová slova: kultivační stanovení; probiotické doplňky stravy; bifidobakterie; anaerobní atmosféra; bakterie trávicího traktu

Optimization of culture conditions for anaerobic probiotic microorganisms

Summary

Probiotics are live, non-pathogenic microorganisms used to strengthen the intestinal microbial balance and are available in the form of probiotic supplements, foods, or medicines. Since the strains used are mostly facultatively anaerobic or strictly anaerobic, it is essential to maintain anaerobic conditions throughout the process when culturing them. The same principle applies to the determination of anaerobic microorganisms in samples from the digestive tract. There are various options for the preparation of dilution media that ensure the elimination of oxygen from the environment.

The aim of this study was to compare the effect of the dilution media preparation procedure on the determined numbers of anaerobic microorganisms in probiotic dietary supplement and stool samples of adult volunteers. Anaerobic conditions were created in tubes and vials of dilution media by three different methods: pure CO₂, food grade CO₂ and boiling. Lactobacilli, bifidobacteria and total anaerobic counts were then determined on selective semi-solid media. The results showed that all dilution medium preparation procedures used were suitable for the determination and there was no statistically significant difference between them. Furthermore, the results showed that 5 samples of probiotic dietary supplements that were before the end of the minimum shelf-life at the time of determination did not meet the declared number of probiotic microorganisms. For the brand-new samples purchased, only one sample failed to meet the declared counts. Finally, only in one sample were correctly declared all the names of the microorganisms on the packaging of probiotic food supplements.

The results showed that all the procedures used were suitable for the determination of anaerobic microorganisms in probiotic dietary supplements and fecal samples. Thus, the procedure that is the least time-consuming and technically demanding, which is only boiling of the medium, can be recommended. It is also necessary to ensure stricter controls on probiotic food supplements placed on the market to avoid misleading the consumer. Last but not least, there is a need to find effective methods to reliably identify and detect the individual microorganisms present in probiotic food supplements.

Keywords: cultivation; probiotic food supplements; bifidobacteria; anaerobic atmosphere; digestive tract bacteria

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Střevní mikrobiota	11
3.2 Probiotika.....	12
3.2.1 Obecné vlastnosti probiotik	14
3.2.2 Výroba probiotických doplňků stravy	16
3.2.3 Zařazení probiotik do doplňků stravy	18
3.2.4 Legislativní požadavky na probiotické doplňky stravy	18
3.2.5 Možnosti ověřování kvality probiotických doplňků stravy	19
3.3 Probiotika nové generace	21
3.3.1 <i>Bifidobacterium</i> spp.	22
3.3.2 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	24
3.3.3 <i>Roseburia intestinalis</i>	25
3.3.4 <i>Eubacterium hallii</i>	25
3.3.5 <i>Akkermansia muciniphila</i>	26
3.3.6 <i>Clostridium butyricum</i>	26
3.3.7 <i>Bacteroides</i> spp.	27
3.3.8 <i>Parabacteroides goldsteinii</i>	28
3.3.9 <i>Christensenella minuta</i>	28
3.3.10 <i>Streptococcus dentisani</i>	29
3.3.11 <i>Lactobacillus paraplantarum</i>	29
3.3.12 <i>Flavonifractor plautii</i>	30
3.3.13 Probiotika nové generace jako doplňky stravy nebo jako součást potravin	30
3.4 Prebiotika.....	31
3.5 Synbiotika	32
4 Materiál a metody	33

4.1	Testované probiotické preparáty a stolice	33
4.1.1	Probiotické doplňky stravy	33
4.1.2	Vzorky stolice	35
4.2	Kultivační média	35
4.2.1	Odběrové a ředící médium.....	36
4.3	Postup při mikrobiologickém rozboru	37
4.4	Postup při vyhodnocení	39
5	Výsledky	40
5.1	Deklarované počty mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy...	40
5.2	Probiotické doplňky stravy	42
5.3	Vzorky stolice	44
6	Diskuze	49
7	Závěr.....	55
8	Literatura.....	56

1 Úvod

Probiotika jsou živé nepatogenní mikroorganismy, které se konzumují za účelem zlepšení střevní mikrobiální rovnováhy (Hill et al. 2014). Jsou součástí fermentovaných potravin, doplňků stravy anebo jsou to samostatná léčiva (Hoffman et al. 2008). Probiotické výrobky často obsahují kvasinky, bifidobakterie, laktobacily a další bakterie mléčného kvašení (Binda et al. 2020). Probiotické mikroorganismy musí zachovávat svou životaschopnost při výrobě i průchodu trávicím traktem (Hill et al. 2014).

Aby probiotika, která jsou používána v potravinářství nebo při výrobě probiotických doplňků stravy, mohla být podávána živá a v dostatečném množství, musí být odolná proti působení žaludečních šťáv a musí být schopna růst a množit se v anaerobních podmínkách. Všechny tyto podmínky ovlivňuje i složení probiotických potravin nebo probiotických doplňků stravy a v neposlední řadě i jejich samostatná výroba (Fenster et al. 2019). Složení atmosféry a přítomnost kyslíku je jeden z nejdůležitějších technologických faktorů, který ovlivňuje životaschopnost bakterií při výrobě probiotik (Lee & O'Sullivan 2010).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

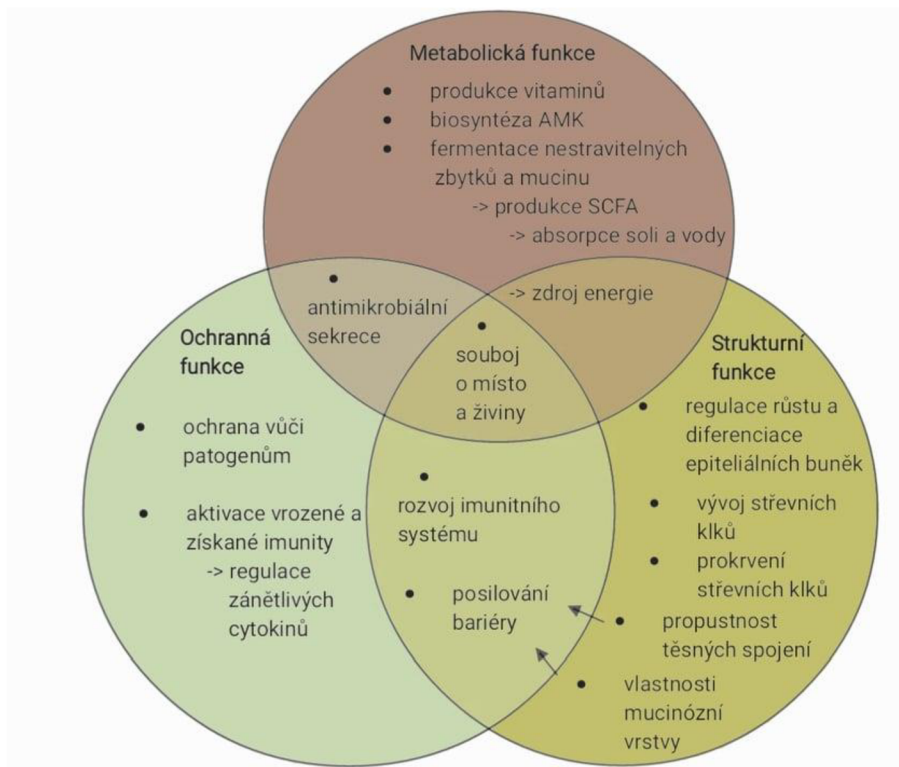
Hypotéza: Metodika přípravy médií ovlivní počty kultivovaných anaerobních probiotických mikroorganismů.

Cílem práce bude porovnat vliv postupu přípravy ředících médií na stanovené počty anaerobních mikroorganismů ve vzorcích probiotických doplňků stravy a stolice dospělých dobrovolníků.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota

V lidském střevě žije přibližně 100 bilionů mikroorganismů. Patří sem bakterie, archea, viry, prvoci a houby, které souhrnně nazýváme střevní mikrobiota. Nejvíce zastoupené jsou bakterie, jejichž celkový počet se odhaduje na 10^{13} - 10^{14} buněk (Sakkas et al. 2020). Mikroorganismy střevní mikrobioty mezi sebou a svým hostitelem interagují, čímž ovlivňují fyziologii a zdraví hostitele (Riaz Rajoka et al. 2017). Na její složení má vliv imunitní systém, genetika, strava, věk, etnicita, kulturní a životní návyky, geografické a enviromentální faktory, stres, obezita, konzumace probiotik a prebiotik, užívání antibiotik a různá metabolická onemocnění (Tuddenham & Sears 2015; Sakkas et al. 2020).



Obrázek 1: Funkce střevní mikrobioty (Prakash et al. 2011)

Střevní mikrobiota vykonává klíčové funkce, které lze kategorizovat do tří oblastí: metabolické, ochranné a strukturální. Tyto oblasti se mohou vzájemně prolínat, což je ilustrováno na Obrázku 1. V rámci metabolické funkce mikrobiota zajišťuje produkci vitaminů, biosyntézu aminokyselin, a fermentaci nestravitelných substrátů a mucinu. Důsledkem těchto procesů je tvorba mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA), které mají antimikrobiální vlastnosti a slouží jako zdroj energie pro hostitelský organismus. O těchto kyselinách je detailněji pojednáno níže. Strukturální funkce mikrobioty zahrnuje regulaci růstu a diferenciacie

epiteliálních buněk, vývoj a prokrvení střevních klků, udržování integrity těsných spojů a charakteristik hlenové vrstvy. Ochranná funkce se projevuje skrze antimikrobiální sekreci, odolnost vůči kolonizaci patogeny a stimulaci vrozené a adaptivní imunity. Tato činnost je spojena s regulací produkce zánětlivých cytokinů, rozvojem imunitního systému a posílením střevní bariéry (Prakash et al. 2011). Další esenciální funkcí střevní mikrobioty je její účast na detoxikačních procesech. Toxické metabolity, které vznikají v játrech, jsou prostřednictvím žluče transportovány do střev, kde jsou střevními bakteriemi neutralizovány. Současné studie dokládají významnou interakci mezi střevní mikrobiotou, trávicím systémem, nervovým systémem a mozkiem, která ovlivňuje několik klíčových funkcí, včetně regulace apetitu, modulace nálad a vznik depresí. Jak bylo dříve zmíněno, střevní mikrobiota hraje rozhodující roli také v biosyntéze několika vitamínů, specificky vitamínu K, B12 (kobalamin), B3 (niacin) a B6 (pyridoxin). Kromě toho se podílí na biosyntéze steroidních hormonů a neurotransmiterů (Lynch & Pedersen 2016).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou primární metabolity produkované střevní mikrobiotou, které slouží jako zdroj energie pro další bakterie a významně ovlivňují svého hostitele. Tyto kyseliny se tvoří při fermentaci nestravitelných sacharidů v tlustém a slepém střevě (Sakkas et al. 2020). Nedávné výzkumy poukázaly na klíčový význam SCFA v prevenci a léčbě metabolických poruch, střevních poruch a některých typů rakoviny. Klinické studie prokázaly, že podávání SCFA může mít pozitivní dopad na léčbu ulcerózní kolitidy, Crohnovy choroby a průjmu spojeného s užíváním antibiotik (Besten et al. 2013).

3.2 Probiotika

Probiotika jsou živé mono či směsné kultury mikroorganismů, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují zdravotní přínos hostiteli tím, že zlepšují rovnováhu složení střevní mikrobioty svými specifickými účinky (Hill et al. 2014). Na důsledky této definice uvedenou Hill a kol. poukazuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Důsledky definice probiotik uvedenou Hillem a kol.

1	jsou mikroorganismy	Ačkoli většina komerčních probiotik jsou laktobacily a bifidobakterie, mohou to být i jiné mikroby a nemusí to být bakterie
2	potřeba být naživu	Při podávání; i když to může být žádoucí, aby byly živé v gastrointestinálním traktu, není to vyžadováno.
3	je třeba podávat	To neznamená, že se musí jíst; jsou možné i jiné způsoby podávání.
4	v dostatečném množství	Na konci doby použitelnosti je v produktu stále alespoň tolik životaschopných mikrobů, kolik bylo použito v klinické studii.
5	musí mít zdravotní přínos	Tento přínos by se měl projevit u cílové hostitelské populace.

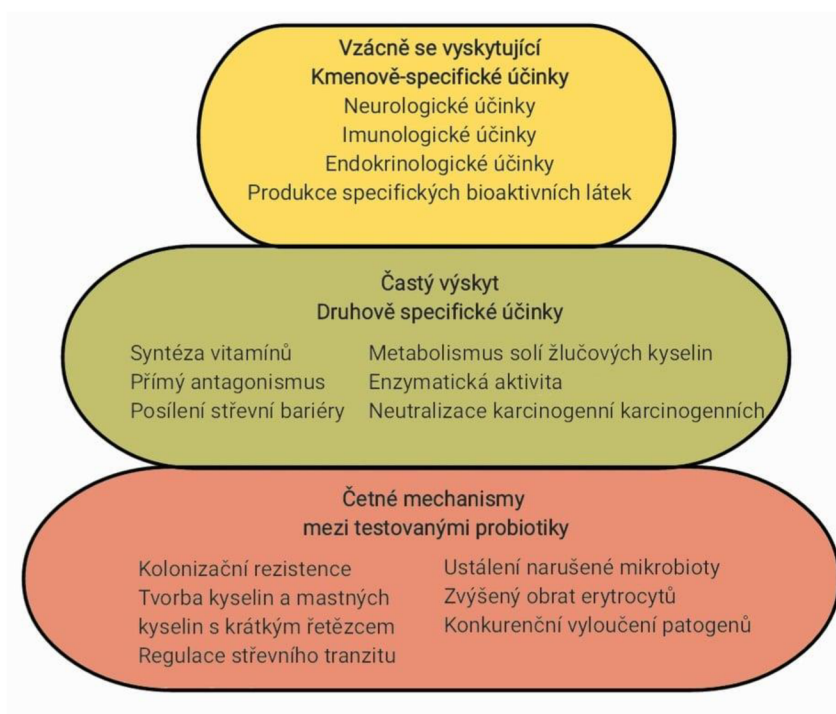
Jedná se tedy o přesně definované mikroorganismy, které jsou přidávány do potravin nebo potravinových doplňků (Binda et al. 2020). Probiotika mohou být také součástí léčiv a mohou tak sloužit k léčbě nebo prevenci chorobných stavů, k udržení zdraví a ke snížení rizika budoucího onemocnění (Hoffman et al. 2008). Jako probiotika se nejčastěji používají kvasinky *Saccharomyces boulardii*, bakterie mléčného kvašení (bakterie čeledi *Lactobacillaceae*, *Streptococcus*, *Lactococcus* aj.) nebo bakterie rodu *Bifidobacterium* (Binda et al. 2020). Do probiotických doplňků stavy se často přidávají kmeny typické pro trávicí trakt, ze kterého jsou také izolovány. Mohou tam být ale obsaženy i kmeny, které se v trávicím traktu běžně nevyskytují. Potraviny s obsahem probiotické složky naopak obsahují většinou kmeny bakterií pro trávicí trakt netypické. To ovšem neznamená, že nemohou mít na trávicí trakt pozitivní efekt, rozhodně však nebudou trávicí trakt trvale kolonizovat. Ten ovšem nekolonizují ani kmeny z probiotických doplňků stravy. Důvodem může být to, že přirozená mikrobiota nedovolí, aby se v trávicím traktu "uchytily" nebo kultivací v laboratoři "zlenivěly" a nejsou schopny trávicí trakt trvale kolonizovat (Schultz et al. 2004).

Aby mohly být mikroorganismy označené za probiotické, musí být splněno hned několik kritérií. Za prvé, je nutné, aby probiotické kmeny byly přesně charakterizovány na kmenovou úroveň. Dále musí být prokázána jejich bezpečnost pro konkrétní užití, pro které jsou určeny. Třetí požadavek zahrnuje ověření bezpečnosti pomocí alespoň jedné klinické studie na lidech, která musí být provedena v souladu s mezinárodně uznávanými vědeckými metodami a standardy. V poslední řadě je nutné, aby tyto kmeny zůstaly životaschopné ve výrobku po celou dobu jeho trvanlivosti (Binda et al. 2020).

Použití probiotik je přirozený způsob, jak obnovit zdravou střevní rovnováhu (Langella et al. 2019). Probiotika užíváme buď preventivně, anebo za účelem zlepšení střevní rovnováhy po jejím narušení. Dysbióza je pozorována nejčastěji po antibiotické léčbě, při průjmu nebo zácpě, v případě výskytu ekzému, v případě oslabeného imunitního systému, při alergiích a intolerancích, při zánětlivých a autoimunitních onemocněních střev, při špatné funkci jater, slinivky a žlučníku nebo také při diabetu. Není však zřejmé, zda dané onemocnění může za změnu střevní mikrobioty, anebo změna střevní mikrobioty může za dané onemocnění (Sanders et al. 2018). Vzhledem k vysokému počtu různých kmenů probiotik je problematické určit, zda by užití konkrétního probiotika bylo pro pacienta přínosné. Je důležité si totiž uvědomit, že probiotické výhody spojené s jedním druhem nebo kmenem nemusí nutně platit i pro ostatní, řada probiotických vlastností je tedy druhově či kmenově specifická (Wieërs et al. 2020). Ačkoli jsou probiotika obecně považována za bezpečná a tělo je dobře toleruje, měla by se jejich aplikace provádět s opatrností, a to především u pacientů s vážnými onemocněními nebo oslabeným imunitním systémem. V takových případech zde existuje riziko vzácných systémových infekcí (Williams 2010).

3.2.1 Obecné vlastnosti probiotik

Probiotické vlastnosti jsou kmenově specifické a lze je rozdělit podle výskytu, viz Obrázek 2.

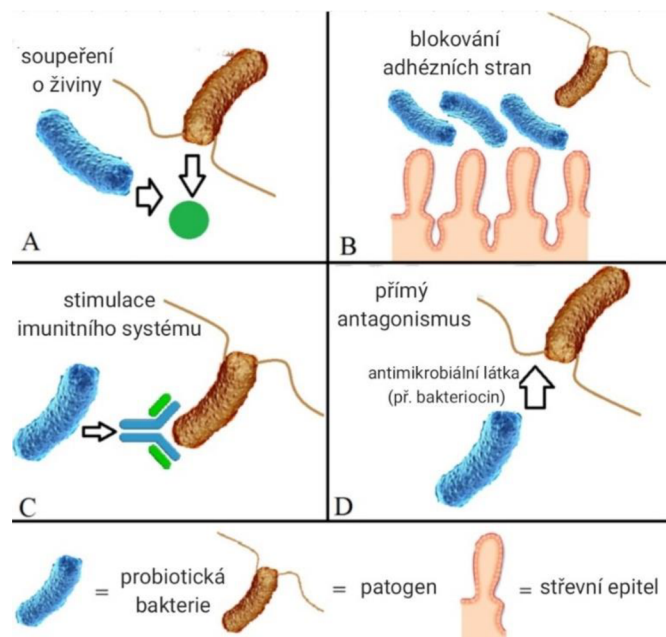


Obrázek 2: Rozdělení probiotických vlastností podle četnosti výskytu (Hill et al. 2014)

Jedním ze základních účinků je produkce kyselin a mastných kyselin s krátkým řetězcem, o jejichž účinku je pojednáno výše. Hlavní vlastností probiotik je jejich schopnost ovlivňovat složení střevní mikrobioty tak, aby bylo dosaženo správné rovnováhy mezi prospěšnými mikroorganismy a potenciálně škodlivými patogeny, které mohou kolonizovat trávicí trakt člověka. Tato rovnováha je klíčová pro zachování zdravých střev. Probiotika mohou hrát také důležitou roli při obnově střevní mikrobioty po narušení, jako je například již zmíněné užívání antibiotik. Další funkcí probiotik je jejich schopnost potlačovat aktivitu střevních patogenů, které mohou vstoupit do trávicího traktu prostřednictvím kontaminovaných potravin nebo z vnějšího prostředí. Tímto způsobem mohou probiotika efektivně bránit rozvoji patogenních bakterií a chránit střeva před infekcemi. Některé probiotické mikroorganismy jsou přirozenými producenty vitamínů skupiny B, patří sem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis* a *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Probiotika zvyšují účinnost imunitního systému, zlepšují vstřebávání vitamínů a některých minerálních látek. Díky své schopnosti vytvářet společné shluky mohou tvořit ochranný epitel, který brání patogenům kolonizovat GIT. Probiotika také mohou zlepšit enzymatickou aktivitu ve střevním traktu tím, že produkují různé enzymy, jako jsou esterázy, lipázy a různé koenzymy A, Q, NAD, NADP. Některé probiotické mikroorganismy, jako jsou laktobacily a bifidobakterie, mohou produkovat dekonjugované žlučové kyseliny, které mají silnější antibakteriální účinek než

žlučové soli hostitele (Markowiak & Ślizewska 2017). Na závěr je třeba zmínit vzácné kmenově-specifické účinky probiotik. Mezi ně patří ta, která mají vliv na neurologické, imunologické a endokrinnologické procesy, stejně jako ta, která produkují specifické bioaktivní látky (Hill et al. 2014). V posledních letech je věnována velká pozornost probiotikům, která mají vliv na neurologická onemocnění. V souvislosti s nimi je popisována tzv. osa mikrobiota-střevo-mozek. Jedná se o obousměrnou komunikaci mezi centrálním nervovým systémem a střevem (Umbrello & Esposito 2016). Imunologické účinky byly objeveny u kmenů *Lactobacillus paraplantarum* 11-1 a *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. Tyto kmeny mají například schopnost aktivovat vrozenou imunitu viz níže. Endokrinnologické účinky pak nalezneme například u *Christensenella minuta* DSM 33407 nebo u *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. Oba tyto kmeny ovlivňují hladinu glukózy v krvi (Farida et al. 2020; Mazier et al. 2021).

Nicméně všechny bakterie, které jsou označeny za probiotika, by měly splňovat několik základních kritérií. Prvním z nich je schopnost těchto bakterií adherovat na střevní epitel hostitele. Dále by měla být probiotika schopna vykazovat antagonistické účinky vůči patogenním mikroorganismům, viz Obrázek 3, a měla by celkově pozitivně ovlivňovat zdraví hostitele (Hill et al. 2014).



Obrázek 3: Mechanismus fungování probiotik

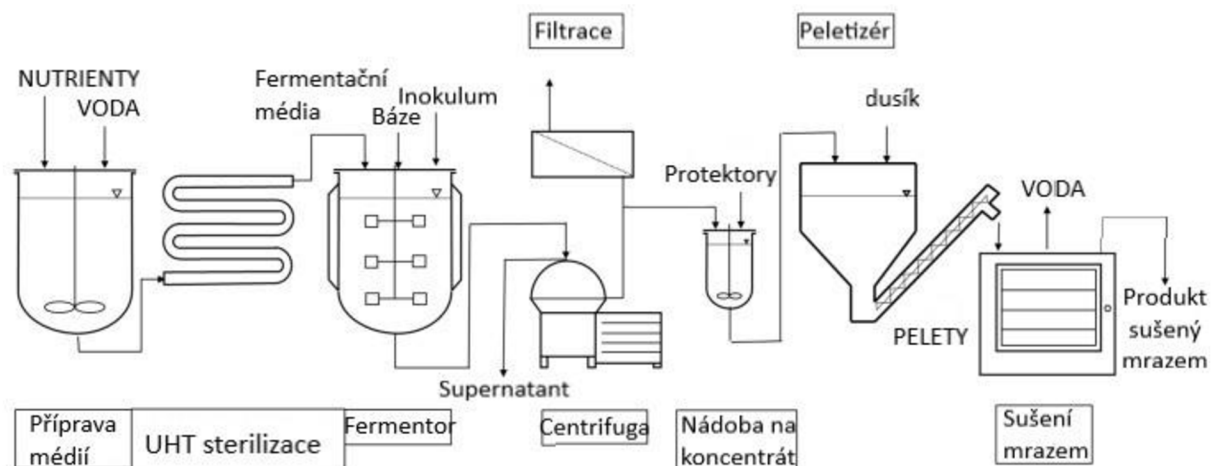
(https://www.wikiskripta.eu/w/Probiotika,_prebiotika,_synbiotika)

3.2.2 Výroba probiotických doplňků stravy

K potravinářským účelům jsou mikroorganismy průmyslově kultivovány nejen za účelem uspokojení poptávky zákazníků po probiotických doplňcích stravy, ale i jako startovací a ochranné kultury. Z perspektivy výrobce je žádoucí, aby komerční výrobek dosahoval co nejvyššího výtěžku a skládal se z životaschopných, koncentrovaných buněk, které jsou stabilní a vykazují konzistentní efekt ve svém zamýšleném použití. Je nutné zajistit vysoký počet buněk a dlouhou trvanlivost za různých teplotních a vlhkostních podmínek (Fenster et al. 2019).

Výrobní proces mikroorganismů pro doplňky stravy zahrnuje následující kroky. Čisté kultury buněk se postupně asepticky pomnoží v příslušném živném médiu k dosažení potřebného objemu inokula. Inokulum je následně převedeno do hlavní fermentační nádoby, ve které pokračuje množení buněk. Alternativně může být použita mražená přímá vakcinace, což je metoda obsahující vyšší koncentraci buněk, které lze přímo použít do hlavní fermentační nádoby bez přípravy inokula. Cílem obou přístupů je minimalizovat počet generací od zásoby buněk po výrobek, a tím snížit riziko možné ztráty některých významných probiotických vlastností a kontaminace. Kultivační médium obsahuje veškeré potřebné živiny, které jsou rozpuštěny ve vodě, jedná se o dusíkaté látky, sacharidy, sole a mikronutrienty, které jsou nezbytné pro růst daných mikroorganismů. Dále musí být přizpůsobeny i ostatní podmínky, jako je teplota a pH. Po ukončení hlavního procesu jsou buňky pečlivě kontrolovány. Pokud je vše v pořádku, buňky jsou koncentrovány pomocí centrifugace nebo jiné vhodné metody, která oddělí buňky od živného média. Nejčastěji používaná konečná úprava probiotického doplňku stravy je lyofilizace. Aby během toho procesu nedošlo k poškození buněk, jsou k hotovému produktu přidávány stabilizační roztoky, kterými jsou kryoprotektanty a/nebo lyoprotektanty. Běžně používané kryoprotektanty a lyoprotektanty jsou složeny ze sacharidů a peptidů (Santivarangkna et al. 2008). Jakmile je probiotický koncentrát smíchán s kryoprotektantním roztokem, lze jej různými procesy zmrazit. Jednoduchá technika mražení spočívá v nalití koncentrátu do plechovek a ponoření uzavřených plechovek do lázně s kapalným dusíkem. Mražené plechovky lze poté doručit společností, které začlení probiotika do potravin nebo nápojů. Alternativně produktivnější technika spočívá v granulaci koncentrátu, kdy je koncentrát kapán skrz kalibrované otvory do lázně kapalného dusíku. Granule, které jsou obvykle koule o průměru 4–5 mm, jsou pak zabaleny do pytlů, které jsou skladovány a přepravovány při teplotě v rozmezí od –45 do –55 °C. Jak již bylo zmíněno, nejčastějším způsobem, jak zmrazit probiotika, je lyofilizace, pro kterou jsou použity zmrazené buněčné pelety. Zmrazené pelety se přenesou na podnosy, které jsou umístěny na policích. Police mají schopnost řídit teplotu a jsou postupně ohřívány, jakmile se v lyofilizační komoře vytvoří vakuum. Délka lyofilizace se může lišit v závislosti na specifickém kmenu, jeho složení a parametrech cyklu lyofilizace, avšak obvykle vyžaduje několik dní. Jedna z hlavních výhod lyofilizace spočívá v tom, že proces udržuje probiotické buňky při nízkých teplotách, což má za následek minimalizaci poškození buněčné struktury a metabolitů. Po odstranění

z lyofilizačního zařízení je lyofilizovaný materiál rozemlet na prášek s přesně definovanou velikostí částic a hustotou. Tento rozemletý materiál je následně použit pro smíchání s objemovými činidly, případně dalšími funkčními složkami a tekutými pomocnými látkami, pokud je to žádoucí v souladu se specifikacemi zákazníka. Tato směs je poté využita při výrobě konečných forem produktu, jako jsou například kapsle, sáčky nebo tablety (Fenster et al. 2019; Fonseca et al. 2015). Výrobní proces je znázorněn na Obrázku 4.



Obrázek 4: Výrobní proces probiotických doplňků stravy (Fenster et al., 2019)

Klíčovým faktorem pro výrobu probiotik je zajištění životaschopnosti v dostatečném množství až do konce doby trvanlivosti. Probiotika musí být vyráběna takovým způsobem, aby byla odolná a stabilní. Musí být také začleněna do spotřebitelských obalů, které umožňují jejich přežití v dostatečném počtu až do konce doby trvanlivosti. Jak říká definice, kterou uvedl Hill a kol., probiotika je potřeba podávat v dostatečném množství. Tato definice už však neurčuje, co to je dostatečné množství (Fenster et al. 2019). Nicméně, regulační orgány v některých státech například vyžadují minimální dávku 10^9 kolonie tvořících jednotek (KTJ) (Net et al. 2014). Dále lze předpokládat, že adekvátní množství probiotik odpovídá minimálně dávce, která byla empiricky ověřena jako poskytující specifický zdravotní prospěch, na který se odkazuje. Nebylo však prokázáno, že vyšší dávky by byly potenciálně škodlivé, v některých situacích mohou být dokonce prospěšné (Ouwehand et al. 2018; Zhou et al. 2000). Probiotika, zejména když jsou začleněna do doplňků stravy, jsou obvykle distribuována a skladována při pokojových teplotách a normální vlhkosti. Toto uskladnění a manipulace může vést ke snížení životaschopnosti probiotických kultur ve srovnání se skladováním při chladu nebo mrazu. Aby bylo zajištěno, že cílová dávka bude k dispozici až do data expirace a aby se kompenzovaly možné ztráty během skladování a manipulace, je do výrobního procesu běžně začleněno přídatné množství probiotik (Sreeja & Prajapati 2013). Jedním z dalších faktorů k získání vysoce kvalitního konečného produktu je zajištění nutričních požadavků jednotlivých mikroorganismů a vývoj kultivačního média na míru, které podporuje růst a zvyšuje schopnost buněk přežít a přizpůsobit se stresu způsobeném výrobním procesem. To vše komplikuje

výrobní proces, protože požadavky mikroorganismů se liší jak v rámci druhů, tak v rámci jednotlivých kmenů daného druhu (Fenster et al. 2019).

3.2.3 Zařazení probiotik do doplňků stravy

Jak již bylo zmíněno, probiotika jsou často začleňována do doplňků stravy převážně ve formě lyofilizovaného prášku. Nejběžnějšími formami, které se vyskytují na trhu, jsou kapsle, tablety a prášek v sáčcích, které jsou obvykle skladovány při běžných pokojových podmínkách. Doplnky stravy by měly obsahovat množství probiotik deklarované na etiketě po celou dobu trvanlivosti, aby spotřebitel obdržel dostatečnou dávku k dosažení zamýšleného zdravotního účinku. Je důležité podrobně charakterizovat složení každého probiotického výrobku. Existují dva hlavní typy těchto výrobků: jednokmenové a vícekmenové. Jednokmenové výrobky uvádějí počet mikroorganismů a identifikují konkrétní kmen, což usnadňuje kontrolu jejich kvality. Naopak, u vícekmenových formulací je kontrola kvality složitější, zejména pokud obsahují více kmenů ze stejného druhu. Zde výrobce může uvádět počet mikroorganismů každého kmene, což ztěžuje kontrolu kvality pomocí tradičních kultivačních metod. Proto se často využívají molekulární metody kvantifikace. Avšak tato metoda může být problematická, protože identifikuje i DNA mrtvých buněk, pokud není degradovaná. Výrobce také může deklarovat pouze celkový počet mikroorganismů, nikoliv počty konkrétních kmenů nebo druhů (C. H. Lai et al. 2017).

Trvanlivost probiotických doplňků stravy je obvykle udávána v rámci měsíců. Protože probiotika, a to i v lyofilizovaném stavu, jsou živé mikroorganismy, je třeba věnovat větší pozornost manipulaci s nimi a jejich skladování než u jiných doplňků stravy a složek potravin (Broeckx et al. 2016; Forssten et al. 2011). Aktivita vody a teplota skladování jsou klíčovými faktory ovlivňujícími stabilitu probiotik. Během skladování probiotických doplňků stravy je tedy nutné udržovat nízkou aktivitu vody, kterou pomohou zajistit správně zvolené obaly, a přesně definované podmínky prostředí (Abe et al. 2009; Fenster et al. 2019). Jednou z takových možností je proces mikroinkapsulace, kdy jsou buňky obalené mikroinkapsulační membránou, složenou z různých polysacharidů, která slouží jako ochrana před nepříznivými vlivy okolního prostředí. Tato membrána zároveň umožňuje průchod metabolitů a živin. Je to velmi efektivní metoda ochrany probiotických bakterií během lyofilizace a při průchodu trávicím traktem (Călinoiu et al. 2016).

3.2.4 Legislativní požadavky na probiotické doplňky stravy

Doplňky stravy představují specifickou kategorii potravin, jež je definována v § 2 písm. g) Zákona o potravinách č. 110/1997 Sb. jako "potravina, která má za cíl doplňovat běžnou stravu a je koncentrovaným zdrojem vitaminů, minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, jež jsou obsaženy v potravine samostatně nebo v kombinaci, a je určena k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích." Problematiku doplňků stravy

upravuje na národní úrovni Vyhláška č. 58/2018 Sb., o doplňcích stravy a složení potravin. Evropským předpisem pro oblast doplňků stravy je Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2002/46/EC ze dne 10. června 2002 o přiblížení legislativy členských států týkající se doplňků stravy. Žádný z těchto předpisů však neupravuje minimální počty probiotických bakterií v potravinových doplňcích ani metodiku pro ověřování kvality a kvantity deklarovaných mikroorganismů. Platí však, že výrobce je povinen dodržet informace uvedené na etiketě výrobku. Tato legislativní mezera tak otevírá prostor pro nejasnosti a poskytuje možnost výrobcům uvádět neúplné nebo nepravdivé údaje. Jak je známo z praxe, deklarované počty a druhy mikroorganismů se často neshodují se skutečným počtem mikroorganismů v přípravcích (Marinova et al. 2019). V České republice podléhají doplňky stravy dozoru Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI). Osoba uvádějící doplněk stravy na trh nese plnou odpovědnost za to, že bude zdravotně nezávadný. Musí vyrábět nebo dovážet výrobek ve stejné kvalitě, ve které byl schválen nebo notifikován. Podle evropské legislativy, konkrétně Nařízení (ES) č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin, nelze v EU prodávat výrobky, které tvrdí, že jsou probiotika, probiotické nebo mají v této souvislosti specifické zdravotní účinky. Používání výrazu "probiotikum" se považuje za neoprávněné zdravotní tvrzení, neboť pro probiotika neexistují žádná schválená zdravotní tvrzení ze strany Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA), a to i navzdory mnoha předloženým žádostem. Výrobky tedy musí být označovány pouze konkrétním kmenem bakterií. Nicméně přístup k tomuto označení může být v různých státech EU odlišný. Příkladem je situace v České republice, kde se označení "obsahuje probiotika/prebiotika" nebo "s bifidokulturou" nepovažuje za zdravotní, ale za výživové tvrzení, které lze používat při označování potravin v režimu kvantifikace přítomných probiotik. Použití označení je možné za splnění podmínek pro užití tvrzení „obsahuje (název živiny nebo jiné látky)“ uvedeného v příloze Nařízení (ES) č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. Tento postup se praktikuje při kontrolních činnostech, které provádí Státní zemědělská a potravinářská inspekce a Státní veterinární správa. Podrobnosti jsou specifikovány v Příručce pro provozovatele potravinářských podniků týkající se označování potravin podle předpisů EU, kterou vydalo Ministerstvo zemědělství v roce 2018 (Suková 2014).

3.2.5 Možnosti ověřování kvality probiotických doplňků stravy

Pro posouzení probiotických mikroorganismů jsou využívány dva základní metodologické postupy: klasická kultivační metoda a molekulárně-genetické metody. Kultivační metody umožňují stanovit životaschopné buňky a zahrnují použití selektivního prostředí, například pomocí antibiotik, úpravou pH nebo podpořením růstu cílených mikroorganismů. Tato metoda však může být omezena nízkou senzitivitou, omezenou schopností identifikace mikroorganismů a časovou náročností. Molekulárně-genetické metody jsou naopak nezávislé na kultivaci, rychlejší, citlivější a specifičtější. Tyto metody detekují specifické části RNA nebo DNA sledovaných mikroorganismů. Nejpoužívanější molekulární

metodou pro identifikaci probiotických bakterií je polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace. Tyto metody jsou charakterizovány vysokou citlivostí a specificitou, rychlostí analýzy, vysokou rozlišovací schopností a možností automatizace (Jackson et al. 2019).

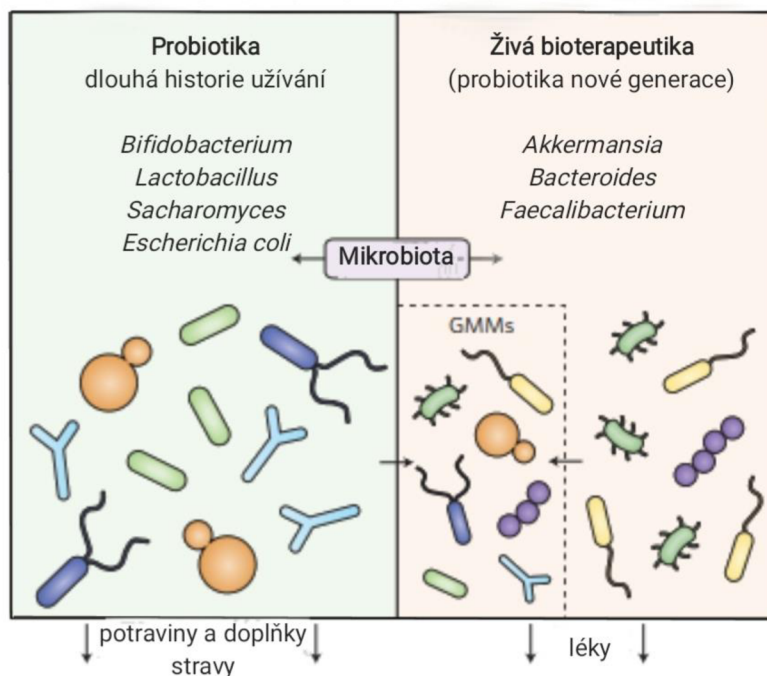
Kultivační metody mohou využívat selektivní média a normy pro stanovení charakteristických mikroorganismů v potravinách. Nicméně tyto normy jsou často vázány na mléčné produkty a omezují se pouze na stanovení počtu charakteristických mikroorganismů v jogurtu (ČSN ISO 7889, ČSN ISO 9232) a stanovení počtu presumptivního *Lactobacillus acidophilus* (ČSN ISO 20128). I přesto, že existuje mnoho studií věnujících se vytváření selektivních médií pro různé druhy laktobacilů, jako jsou *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* a další, dosud neexistují žádné povinné legislativní dokumenty. Tento nedostatek je způsoben často problematickou selektivitou médií. Na rozdíl od toho již existuje mezinárodní norma (ISO 29981:2010), která stanovuje postup pro selektivní stanovení počtu bifidobakterií v mléčných výrobcích. Tato norma využívá transgalaktosylovaný oligosacharid (TOS) propionátový agar s přídavkem antibiotika mupirocinu. Žádná taková standardní metoda však nebyla popsána pro selektivní stanovení počtu bifidobakterií v probiotických doplňcích, kde je přítomnost bifidobakterií mnohem variabilnější než v mléčných výrobcích. Navzdory schopnosti kultivačního stanovení kvantifikovat uváděné počty určitých bakterií chybí normy, které by se zaměřily na ověření přítomnosti specifických druhů nebo kmenů probiotických bakterií v potravinových doplňcích a dalších výrobcích (Bunesova et al. 2015). Čím dál více laboratoří se uchyluje k využívání rychlých a spolehlivých identifikačních metod, jako je hmotnostní spektrofotometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS). Klíčovým předpokladem pro úspěšnou identifikaci na úrovni rodu a druhu je dostupnost čisté bakteriální kultury, která předchází samotné identifikaci. Při multidruhových produktech však vzniká problém získání zástupců všech přítomných druhů ve výrobku (Kolaček et al. 2017).

Další metodou pro ověření identity přítomných druhů v probiotickém doplňku je izolace celkové mikrobiální DNA, která je následně identifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato technika využívá specifických primerů pro jednotlivé rody a druhy, a některé z nich lze dokonce použít v multiplexové PCR, což umožňuje identifikaci více druhů bakterií najednou nebo dokonce jejich kvantifikaci. Další možností je aplikace pokročilých technologií jako MOL-PCR (multiplexní oligonukleotidová ligační PCR) a xMAP (Multi Analyte Profiling), které kombinují PCR s průtokovou cytometrií a ELISA technologií, což umožňuje multiplexní detekci použitých probiotických kmenů a zároveň stanovení mikrobiální kontaminace produktu. Nevýhodou nicméně je, že tyto metody mají vysoké náklady na vybavení a vyžadují vysoce kvalifikovaný personál (Kim et al. 2020).

S ohledem na širokou škálu dostupných metod je nutné prozkoumat a případně upravit možnosti detekce tak, aby bylo možné dosáhnout rychlého a spolehlivého kvantitativního a kvalitativního stanovení deklarovaných druhů v probiotických výrobcích (Kolaček et al. 2017).

3.3 Probiotika nové generace

Probiotika, která jsou běžně dostupná na trhu ve formě doplňků stravy, jsou získávána z poměrně úzkého spektra mikroorganismů. Tato probiotika mají často obecné účinky, nejsou schopna trvale kolonizovat trávicí trakt a nefungují při konkrétních patofyziologických jevech. Jako klasická probiotika se obvykle používají bakterie čeledi *Lactobacillaceae*, další bakterie mléčného kvašení a bakterie rodu *Bifidobacterium*, která jsou na trhu široce dostupná. Tyto mikroorganismy jsou lidmi obvykle dobře přijímány a tolerovány, jak už však bylo zmíněno, tato probiotika vykazují omezené účinky na lidskou střevní mikrobiotu, a proto vyžadují lepší výběr bakteriálních kmenů. Naopak velmi specifické účinky na hostitele byly popsány u tzv. probiotik nové generace. Jsou to mikroorganismy, které byly izolovány z trávicího traktu, a tudíž mají i zvýšenou schopnost trávicí trakt kolonizovat a svým působením specificky ovlivňují konkrétní patologický jev (Plaza-Diaz et al. 2019). Určité kmeny mohou například pozitivně ovlivňovat inzulínovou rezistenci a působit tak proti obezitě. Jiné působí podpůrně při metabolických onemocněních, posilují bariérovou funkci, vykazují protinádorové a protizánětlivé účinky. Jiné pak metabolizují vlákninu a jsou významnými producenty mastných kyselin s krátkým řetězcem. Určitou nevýhodou těchto mikroorganismů je jejich velká citlivost na vnější podmínky panující mimo trávicí trakt. Je to jeden z faktorů, který, snad prozatím, znesnadňuje jejich širokou aplikaci a spíše se předpokládá jejich využití jako léčiva (Hiippala et al. 2018). Základní rozdíly mezi klasickými probiotiky a probiotiky nové generace naznačuje Obrázek 5.



Obrázek 5: Rozdíly mezi probiotiky a probiotiky nové generace (O'Toole et al. 2017)

Mezi novou generaci probiotik patří například různé kmeny bifidobakterií, spolu s *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* a *Eubacterium hallii*. Tyto mikroorganismy vykazují schopnost metabolizovat dietární vlákna a jako primární producenti mastných kyselin s krátkým řetězcem poskytují energetické zdroje pro enterocyty v tlustém střevě. Současně mají významné protizánětlivé účinky ve střevě. Dalším významným zástupcem je bakterie *Akkermansia muciniphila*, jejíž pozitivní účinky jsou spojovány s metabolickými onemocněními a zlepšením bariérové funkce trávicího traktu. Nově byly objeveny i účinky druhů *Bacteroides*, které produkovaly imunomodulační molekuly. Konkrétně *Bacteroides fragilis* vykazuje protinádorové a protizánětlivé vlastnosti. Druhy jako *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella copri*, *Christensenella minuta* a *Parabacteroides goldsteinii* jsou spojovány s ovlivněním inzulinové rezistence a mohou tak působit proti obezitě (Hiippala et al. 2018). Můžeme sem také zařadit například již dlouho známý druh *Lactobacillus paraplantarum*, který je schopen aktivovat vrozenou imunitu a zlepšit uzdravování po infekci patogenem *Pseudomonas aeruginosa* (Nishida et al. 2017). Zhao a kol. (2017) popisují *Clostridium butyricum* jako dalšího potenciálního kandidáta na NGP. Z jejich studie na brojlerech vyplývá, že by druh *Clostridium butyricum* mohl být vhodnou alternativou jako prevence před infekcí *Salmonella enteritidis*. V další studii bylo zjištěno, že druh *Streptococcus dentisani* by mohl sloužit jako perorální probiotikum proti zubnímu kazu (López- López et al. 2017). V jedné z dalších studií, provedené na myším modelu, byla popsána schopnost bakterie *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* zlepšit u myších novorozenců odolnost vůči patogenu *Streptococcus pneumoniae*, který způsobuje pneumokokovou meningitidu (Kanmani et al. 2017).

Uvedené mikroorganismy mohou být zařazeny do skupiny tzv. živých bioterapeutických produktů (LBP z anglického názvu Live Biotherapeutic Products). Definice LBP, kterou vytvořil Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, zní: „LBP jsou definovány jako biologické produkty, které: (1) obsahují živé organismy jako jsou bakterie; (2) jsou použitelné pro prevenci, léčbu nebo vyléčení nemocného člověka; (3) nejsou vakcínou“ (O’Toole et al. 2017). Nejdůležitějším rodům a druhům bakterií, které mají specifické účinky a mohly by být používány jako probiotika nové generace, se věnují následující kapitoly.

3.3.1 *Bifidobacterium* spp.

Bakterie rodu *Bifidobacterium* patří do kmene *Actinobacterie*. Přirozeně se vyskytují v trávicím traktu lidí a zvířat. Výskyt byl zaznamenán v mléce nebo odpadních vodách (Bottacini et al. 2017). Bifidobakterie jsou hlavní bakteriální skupinou ve stolici plně kojených dětí porozených vaginálně (Bunesova et al. 2018). Oligosacharidy představují hlavní zdroj energie a živin pro tyto bakterie, z nichž produkují acetát a laktát. Tyto produkty mohou dále podporovat růst dalších mikroorganismů a tím i produkci jejich metabolitů. Tento synergický proces je znám jako cross-feeding (Seth & Taga 2014). Jde například o podporu produkce

butyrátu u *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerostipes caccae* a *Roseburia intestinalis*. Podrobné znalosti o metabolických schopnostech a cross-feedingu by mohly otevřít možnost pracovat se složením střevní mikrobioty požadovaným směrem, a to pomocí správně nastavené konzumace vlákniny (Hiippala et al. 2018).

Schellekens a kol. (2021) zkoumali na myším modelu schopnost kmene *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* APC1472 zmírnit patologické stavy související s obezitou, kterou vyvolala dieta s vysokým obsahem tuků. Zjistili, že kmen *B. longum* ssp. *longum* APC1472 přispěl ke snížení tělesné hmotnosti, ke snížení tukových zásob a ke zvýšené toleranci myši na glukózu. Po těchto zjištěních se pokusili zjistit účinky kmene *B. longum* ssp. *longum* APC1472 na lidského obézního jedince. Po dobu dvanácti týdnů podávali obézním jedincům kmen *B. longum* ssp. *longum* APC1472 a zaměřili se na změnu jejich tělesné hmotnosti, na změnu obvodu pasu a boků a na biomarkery spojené s obezitou, jako je například hladina glukózy v krvi. Po uplynutí dvanácti týdnů však nedošlo k žádným výrazným změnám. Bonfrate a kol. (2020) ve své studii použili jiný kmen *B. longum* ssp. *longum*, konkrétně BB36, spolu s kmenem *Lactobacillus rhamnosus* HN 001 a vitamínem B6, a analyzovali jejich vliv na jedince se syndromem dráždivého tračníku (IBS), který často doprovází zácpa nebo průjem. Výsledky jejich studie byly jednoznačné. Kmen *B. longum* ssp. *longum* BB36, spolu s kmenem *Lactobacillus rhamnosus* HN 001 a vitamínem B6, zmírnily symptomy a závažnost onemocnění. Dále byly tyto kmeny spolu s vitamínem B6 schopny zlepšit průchod tráveniny střevem v případě pacientů se zácpou. U pacientů s průjmem obnovily propustnost střevní stěny a zlepšily vstřebatelnost látek přes střevní stěnu. Na závěr přispěly k ustálení rovnováhy střevní mikrobioty.

V jiné studii byl do mléka přidán kmen *Bifidobacterium infantis* 35624. Toto mléko, spolu s chemoterapeutickým lékem, bylo podáváno myším s karcinomem mléčné žlázy, a následně byl sledován vliv *B. longum* ssp. *infantis* 35624 v kombinaci s chemoterapeutikem na vývoj nádorů. Bylo zjištěno, že myším nevznikají nové metastázy a již vzniklé nádory se nezvětšují. Výsledky ukazují na zvýšené protinádorové účinky chemoterapie, když je kombinována s *B. longum* ssp. *infantis* 35624, oproti podání chemoterapeutika samotného (Akbaba et al. 2022).

Tian a kol. (2020) použili na myším modelu kmen *Bifidobacterium breve* CCFM1025, aby zjistili jeho vliv na chronické depresivní symptomy, které byly vyvolány stresem. Chronicky stresovaným samcům podávali *B. breve* CCFM1025 po dobu pěti týdnů. Po uplynutí této doby zjistili, že léčba pomocí *B. breve* CCFM1025 výrazně zmírnila symptomy deprese. Dále zjistili, že kmen *B. breve* CCFM1025 pomohl přeměnit pozměněnou střevní mikrobiotu zpět na původní „zdravou“ střevní mikrobiotu. Data z jejich studie jasně ukazují na antidepresivní účinky *B. breve* CCFM1025. V další studii byl podáván pacientům se schizofrenií kmen *Bifidobacterium breve* A-1 po dobu čtyř týdnů a byl zkoumán jeho vliv na úzkostné a depresivní symptomy, které se u tohoto onemocnění vyskytují. Výsledky po čtyřech týdnech ukázaly jasné zlepšení zdravotního stavu pacientů. U pacientů po léčbě *B. breve* A-1

došlo k méně častému výskytu a také ke zmírnění úzkostných a depresivních stavů souvisejících se schizofrenií (Okubo et al. 2019). Kmen *B. breve* A-1 zkoumali ve své studii také Kobayashi a kol. (2017), ale na rozdíl od předchozí studie zkoumali jeho účinky na myších trpících Alzheimerovou chorobou. Po určité době zjistili, že kmen *B. breve* A-1 zmírňuje časté změny nálad, které jsou pro toto onemocnění typické, a zároveň se u nemocných myší zlepšila i paměť. Ve druhé fázi studie podávali nemocným myším usmrčené kmeny *B. breve* A-1 spolu acetátem. Ty měly ve výsledku velmi podobný účinek jako živé *B. breve* A-1. Po několika měsících provedli novou studii, tentokrát na starších lidech, ve které navázali na svoji výše zmíněnou studii. Účastníci studie trpěli poruchou paměti. Po dobu dvanácti týdnů jim podávali *B. breve* A-1. Po uplynutí této doby bylo zjištěno, že kmen *B. breve* A-1 sice nemá přímý vliv na dané onemocnění, ale dokáže zlepšit tzv. „okamžitou paměť“ (Kobayashi et al. 2019).

V jiné studii byl na myším modelu zkoumán probiotický kmen *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 a mechanismy jeho působení u ulcerózní kolitidy. Kmen *B. bifidum* ATCC byl podáván myším s ulcerózní kolitidou po dobu dvaceti sedmi dnů. Na konci tohoto období bylo zjištěno, že kmen *B. bifidum* ATCC zmenšuje rozsah zánětu, obnovuje vrstvu hlenu v tlustém střevě, částečně pomáhá k obnově střevní diverzity a zároveň funguje jako antioxidant (Din et al. 2020). Yang a kol. (2021) ve své studii hodnotili na myším modelu účinky *Bifidobacterium bifidum* FSDJN705 spolu s *Bifidobacterium breve* FHNFQ23M3 na infekci způsobenou enterotoxigenní *Escherichia coli*. Výsledky jejich studie ukázaly, že *B. bifidum* FSDJN705 spolu s *B. breve* FHNFQ23M3 dokážou zmírnit příznaky průjmu, který způsobila *E. coli*. Oba kmeny snížily množství vody ve stolici, obnovily strukturu klků ve střevě a snížily množství fekálních SCFA. Oba kmeny také významně napomohly k obnovení střevní mikrobioty.

3.3.2 *Faecalibacterium prausnitzii*

Faecalibacterium prausnitzii je anaerobní bakterie, která je jednou z nejhojnějších bakterií ve zdravé lidské mikrobiotě (Martín et al. 2017) a zároveň je nejdůležitější bakterií produkující butyrát v tlustém střevě lidí. *F. prausnitzii* je považována za biologický indikátor lidského zdraví. Její pokles v lidském střevě často souvisí s větším výskytem zánětlivých onemocnění. V několika studiích bylo zjištěno, že u jedinců trpících zánětlivými onemocněními střev nebo kolorektálním karcinomem dochází k úbytku *F. prausnitzii* ve střevě (Ferreira-Halder et al. 2017). Sledování množství *F. prausnitzii* by mohlo posloužit jako pomocný biologický ukazatel při diagnostice střevních onemocnění, zejména při rozlišování syndromu dráždivého tračníku (IBS) od chronických střevních zánětů (IBD), jako jsou ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD). Tento druh by také mohl být užitečným potenciálním biologickým markerem při rozlišování mezi ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou (Lopez-Siles et al. 2017). Další studie ukázala, že při rozeznávání IBD od IBS by se mohlo využít metody, která zjistí množství *F. prausnitzii* ve střevě. Přesný postup zatím není

známý a je stále v procesu zkoumání. Podle studie je při IBD množství *F. prausnitzii* nižší než u IBS. Když byla pozornost zaměřena na rozeznávání CD od UC, bylo zjištěno, že množství *F. prausnitzii* ve střevech je u CD nižší než u UC (Lopez- Siles et al. 2014).

3.3.3 *Roseburia intestinalis*

Roseburia intestinalis je grampozitivní anaerobní bakterie, která produkuje butyrát a byla poprvé izolována z lidských výkalů (Duncan et al. 2002). Druhy rodu *Roseburia* patří mezi nejhojnější bakterie v lidském střevě produkující butyrát a mohou tvořit až 5,0 % celkové mikrobiální populace střeva.

V jedné studii byla zkoumána stolice neléčených pacientů s CD. Ve stolici byl odhalen pokles v množství a rozmanitosti střevní mikrobioty včetně *R. intestinalis*. Kvůli tomuto zjištění, byl poté zkoumán vliv *R. intestinalis* na modelu myši kolitidy. Bylo zjištěno, že navýšení *R. intestinalis* sníží množství výskytu hned několika projevů zánětlivých střevních onemocnění: (i) syndrom krátkého střeva, (ii) poškození epitelu střevní sliznice, (iii) prostoupení slizničních lymfocytů. Studie došla k závěru, že bakterie *R. intestinalis* potlačuje patogenezí CD tím, že vylučuje protein flagelin, který vyvolá protizánětlivé reakce (Shen et al. 2018). O pár měsíců později tyto výsledky potvrdil i Luo a kol. (2019) ve své studii na myším modelu kolitidy.

3.3.4 *Eubacterium hallii*

Eubacterium hallii je grampozitivní anaerobní bakterie (Wade 2015), která má schopnost využívat glukózu a fermentační meziproducty, jako je laktát a acetát, které pak využije k tvorbě butyrátu a vodíku (Engels et al. 2016).

Udayappan a kol. (2016) zkoumali na myším modelu vliv *E. hallii* na inzulínovou rezistenci. Bakterie *E. hallii* byla podávána obézním a diabetickým myším. Navýšení *E. hallii* způsobilo zlepšení jejich citlivosti na inzulín a vedlo i ke zlepšení celkového stavu myši. Bunesova a kol. (2018) ve své studii prokázali, že když bifidobakteriím vybraných druhů poskytnou mucin, tak ty díky svým metabolitům způsobí zvýšenou tvorbu *E. hallii*. Výsledné metabolity *E. hallii* (acetát, butyrát, propionát a formiát) mají pozitivní vliv na hostitele a ostatní mikroby v lidském střevě. V jiné studii byl zkoumán vliv *E. hallii* na 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo(4,5-b) pyridin (PhIP). PhIP je nejhojněji se vyskytující aromatický amin, který se vyskytuje v grilovaném mase, a který může přispívat k jeho karcinogenitě. Bylo zjištěno, že bakterie *E. hallii* je schopna přeměnit tento potenciálně karcinogenní amin na jeho nezávadnou formu a přispět tak k jeho detoxikaci v lidském tlustém střevě. *E. hallii* může také produkovat pseudovitamin B₁₂, který pak využijí jiné bakterie, například *Akkermansia muciniphila* (Fekry et al. 2016).

3.3.5 *Akkermansia muciniphila*

Akkermansia muciniphila je gramnegativní, anaerobní, mucin degradující bakterie (Ottman et al. 2017). Ačkoliv byla popisována jako přísně anaerobní bakterie, bylo zjištěno, že je schopna tolerovat množství kyslíku v prostředí, anebo nízké hladiny kyslíku mohou stimulovat její růst. Typový kmen *A. muciniphila* MucT byl původně izolován ze zdravého dospělého člověka pomocí média s obsahem žaludečního mucinu (Ouwerkerk et al. 2016). Bakterie *A. muciniphila* je schopna odbourávat mucin, což z ní u zdravého člověka dělá velmi užitečnou bakterii, díky které se neustále obnovuje mucinózní vrstva ve střevech. Problémem by tato bakterie mohla být u nemocného člověka, který trpí na nějaké onemocnění gastrointestinálního traktu. V tento moment pro něj nebude odbourávání mucinu prospěšné, protože obnovu mucinózní vrstvy má zpomalenou a střevní epitel by mohly snadněji narušit patogenní mikroorganismy. Mucin *A. muciniphila* štěpí a využívá ho jako zdroj energie a živin. Metabolity, jako je acetát, propionát a 1,2-propandiol, které *A. muciniphila* produkuje, přispívají k podpoře růstu jiných mikroorganismů v trávicím traktu (Belzer et al. 2017). Dále bakterie *A. muciniphila* může využít pseudovitamin B₁₂, který je produkován jinými bakteriemi, například bakterií *E. halii*, aby mohla produkovat propionát. Jinak řečeno mezi bakteriemi probíhá již zmiňovaný cross-feeding. Bakterie *A. muciniphila* také produkuje sulfatázy, díky nimž může být schopna využít síru ze sirovodíku k syntéze sírných aminokyselin a díky tomu omezit možnou toxicitu bakterií, které redukuje sulfáty (Ottman et al. 2017).

U lidí trpících různými nemocemi bylo pozorováno nižší množství *A. muciniphila* (X. Zhang et al. 2013). Několik studií poskytlo slibné důkazy o příznivém účinku *A. muciniphila* na metabolické poruchy, jako je obezita a diabetes (Ottman et al. 2017). V jedné studii byla izolována *A. muciniphila*. Prokázalo se, že její přítomnost je nepřímo spojena s tělesnou hmotností u hlodavců i lidí. Tato studie dále ukázala, že u myši trpících obezitou a diabetem 2. typu se množství *A. muciniphila* snížilo, ale vhodná prebiotická výživa obnovila její hladiny na normální úroveň, což vedlo ke zlepšení metabolických procesů. Kromě toho léčba pomocí *A. muciniphila* korigovala metabolické poruchy způsobené dietou s vysokým obsahem tuků (Everard et al. 2013). Nedávno bylo také prokázáno, že bakterie chrání před aterosklerózou tím, že zmírňuje zánět vyvolaný metabolickou endotoxémií (přítomností toxinů v krvi) a přispívá k obnovení střevní bariéry (Li et al. 2016). První klinická studie naznačuje, že živá nebo pasterizovaná *A. muciniphila* je bezpečná bakterie pro použití u obézních lidí a je perspektivním kandidátem na probiotika nové generace (Plovier et al. 2016).

3.3.6 *Clostridium butyricum*

Clostridium butyricum je přísně anaerobní, grampozitivní sporetvorná bakterie produkující butyrát. *C. butyricum* je součástí komenzální střevní mikrobioty lidí i zvířat. Rod *Clostridium* má probiotické vlastnosti, avšak některé kmeny mohou být patogenní a mohou

způsobovat například nekrotizující kolitidu u předčasně narozených dětí (Cassir et al. 2016; Saarela 2019).

Kmen *C. butyricum* MIYAIRI 588 se používá jako probiotikum při průjmech po antibiotické léčbě. Ve studii na potkanech bylo zjištěno, že tento kmen *C. butyricum* MIYAIRI 588 dokáže opravit narušené metabolické pochody, které jsou jednou z příčin vzniku nealkoholového ztučnění jater (Seo et al. 2013). V jiné studii zase Miyaoka a kol. (2018) zjistili, že kmen *C. butyricum* MIYAIRI 588 v kombinaci s antidepresivou dokáže významně zlepšit úzkostné stavy u pacientů trpících velkou depresivní poruchou, kteří nereagují na standardní léčbu. V dřívější studii bylo objeveno, že kmen *C. butyricum* MIYAIRI 588 dokáže inhibovat toxin, který vytváří patogenní bakterie *Clostridium difficile*. Ta je zodpovědná za velkou část průjmu a kolitidy spojenou s antibiotickou léčbou (Woo et al. 2011).

U kmene *C. butyricum* AQQF01000149 byl zkoumán jeho ochranný mechanismus proti *Salmonella enteritidis* u skupiny brojlerů. Zjistilo se, že při perorálním podávání *C. butyricum* AQQF01000149 došlo po několika dnech ke zmenšení počtu životaschopných *Salmonella enteritidis*. Ze studie vyplývá, že kmen *C. butyricum* AQQF01000149 by mohl být podáván jako vhodná alternativa pro prevenci před infekcí způsobenou *Salmonella enteritidis* (Zhao et al. 2017).

3.3.7 *Bacteroides* spp.

Bacteroides spp. se ve vysokých počtech vyskytuje v trávicím traktu dospělých lidí. Jedním z nejhojnějších druhů je *Bacteroides fragilis* (Hiippala et al. 2018). *Bacteroides fragilis* je obligátní anaerobní gramnegativní tyčinka. Na svého hostitele může mít jak pozitivní, tak negativní účinky (Erturk-Hasdemir & Kasper 2018).

Dalším zástupcem NGP z rodu *Bacteroides* je *Bacteroides vulgatus*. Li a kol. (2021) během své studie na myším modelu kolitidy použili několik kmenů *Bacteroides vulgatus*. Pouze jediný kmen, konkrétně kmen *B. vulgatus* 7K1, byl schopný zmírnit příznaky kolitidy. V další studii byl zkoumán potenciační vliv kmene *B. vulgatus* ATCC 8482 na postmenopauzální osteoporózu. Bylo zjištěno, že kmen *B. vulgatus* ATCC 8482 snížil úbytek kostní hmoty a destrukci mikrostruktury v bederním obratli u myši po odstranění vaječnicků. Toto zjištění naznačuje, že by kmen *B. vulgatus* ATCC 8482 mohl pomoci při léčbě postmenopauzální osteoporózy (Yuan et Shen 2021). Yoshida a kol. (2018) ve své studii zjistili, že u pacientů s onemocněním koronárních tepen se vyskytuje významně nižší množství *Bacteroides vulgatus* a *Bacteroides dorei*. Na myším modelu poté použili žaludeční sondu s živými *B. vulgatus* a *B. dorei*. Druhy *B. vulgatus* a *B. dorei* zeslabily tvorbu aterosklerózy u myši náchylných k této nemoci. Dále tyto kmeny výrazně snížily endotoxémii, což vedlo k účinnému potlačení protizánětlivé imunitní reakce. Jelikož ateroskleróza souvisí i se vznikem ischemické choroby, mohlo by použití druhů *B. vulgatus* a *B. dorei* sloužit jako prevence před vznikem tohoto závažného onemocnění.

3.3.8 *Parabacteroides goldsteinii*

Byl zkoumán vliv polysacharidů obsažených v myceliu *Hirsutella sinensis* na počet *Parabacteroides goldsteinii* ve střevním prostředí. Bylo zjištěno, že polysacharidy mycelia *H. sinensis* podporují růst druhu *P. goldsteinii*, a tím zvyšují i jeho množství ve střevech. V další fázi studie byl zjišťován vliv kmene *P. goldsteinii* ATCC BAA-1180 na myším modelu obezity. Výsledky studie ukázaly, že kmen *P. goldsteinii* ATCC BAA-1180 pomohl ke zlepšení symptomů souvisejících s obezitou. Tento kmen přispěl k redukci zánětu, snížení inzulinové rezistence, zvýšení permeability střevní stěny a stimulaci termogeneze tukové tkáně. V kombinaci s polysacharidy mycelia *H. sinensis* by mohl být kmen *P. goldsteinii* ATCC BAA-1180 slibným synbiotikem k léčbě obezity a diabetu 2. typu (Wu et al. 2019). Lai a kol. (2022) zkoumali další kmen *P. goldsteinii* MTS01, konkrétně jeho účinky na chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN) vyvolanou na myším modelu. CHOPN je globální onemocnění, které je charakterizováno narušením normálního dýchání. To, že mikrobiota dýchacího traktu je spojena s CHOPN, se vědělo již dávno. V této studii bylo zjištěno, že existuje propojení této nemoci takzvaná osa střevní mikrobiota – plíce. Dále bylo prokázáno, že kmen *P. goldsteinii* MTS01 významně zlepšuje symptomy spojené s CHOPN, redukuje střevní zánět, zvyšuje aktivitu buněčných mitochondrií a ribozomů v tlustém střevě a přispívá k inhibici zánětu plic.

3.3.9 *Christensenella minuta*

Christensenella minuta je gramnegativní striktně anaerobní bakterie, která žije v lidském střevě. *C. minuta* byla poprvé objevena skupinou vědců v roce 2011 (Morotomi et al. 2011). Ve studii byl zkoumán nový kmen *Christensella minuta* DSM 22607, který by mohl pomoci s léčbou chronických autoimunitních onemocnění, které postihují trávicí trakt. Zjistilo se, že ačkoliv je kmen *C. minuta* DSM 22607 přísný anaerob, je také schopna tolerovat nízké hladiny kyslíku. Dále bylo objeveno, že kmen *C. minuta* DSM 22607 disponuje silnou protizánětlivou aktivitou a je schopen chránit střevní epitel proti jeho porušení. Na závěr bylo na dvou odlišných zvířecích modelech akutní kolitidy zjištěno, že kmen *C. minuta* DSM 22607 zabránil poškození střev, snížil projevy zánětu tlustého střeva a podpořil hojení střevní sliznice. Díky všem těmto účinkům má *C. minuta* DSM 22607 potenciální využití v bioterapiích (Kropp et al. 2021).

V jiné studii Mazier a kol. (2021) zkoumali další nový kmen *Christensella minuta*, konkrétně DSM 33407. Na modelu obézních myší, jejichž obezita byla vyvolaná dietou, zkoumali potenciál *C. minuta* DSM 33407 působit proti tomuto fyziologickému stavu. Zaměřili se na změny metabolismu lipidů v játrech, které kmen *C. minuta* DSM 33407 způsobil. Data naznačovala, že kmen *C. minuta* DSM 33407 dokázal chránit před obezitou a reguloval další mechanismy, jako je například hladina glykémie. Dále tento kmen reguloval metabolismus jaterních lipidů tím, že silně inhiboval *de novo* lipogenezi. Tento kmen byl dále schopen chránit střevní epitel proti jeho porušení jako *C. minuta* DSM 22607. Výsledky ukazují, že by kmen *C.*

minuta DSM 33407 mohl být v budoucnu využíván pro podporu léčby obezity a metabolických poruch, které s ní souvisí. Ačkoliv má druh *C. minuta* mnoho pozitivních účinků na hostitele, bylo nedávno zjištěno, že by mohl mít i patogenní potenciál (Alonso et al. 2017).

3.3.10 *Streptococcus dentisani*

V roce 2013 byly skupinou vědců popsány dva nové bakteriální kmeny, *Streptococcus dentisani* 7746 a 7747. Jsou to grampozitivní aerobní bakterie, které byly izolovány ze zubního plaku jedinců, kteří neměli žádný zubní kaz (Camelo-Castillo et al. 2014; López-López et al. 2017). López-López a kol. (2017) ve své studii odhalili, že *Streptococcus dentisani* 7746 a 7747 se vyskytují v dutině ústní u 98 % zdravých jedinců bez zubního kazu. Jelikož jsou kmeny *S. dentisani* 7746 a 7747 schopny inhibovat růst hlavních orálních patogenů prostřednictvím produkce bakteriocinů a tlumit kyselé pH, které je hlavní příčinou tvorby zubního kazu, jedná se o bakterie vhodné pro použití v prevenci proti tomuto poškození zubů.

V další studii byl zjištěn podobný pozitivní účinek *S. dentisani* jako ve studii předchozí. Díky těmto zjištěním se došlo k závěru, že kmen *S. dentisani* 7746 je pomocí kompetitivních, adherentních a vytěšňovacích mechanismů schopen inhibovat růst a uchycení parodontálních patogenů, které způsobují parodontální onemocnění. Účinky *S. dentisani* 7746 je však zapotřebí ještě ověřit v klinických studiích (Esteban-Fernández et al. 2019).

3.3.11 *Lactobacillus paraplantarum*

Kmen *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 má protizánětlivé a imunosupresivní účinky (Nikolic et al. 2012). Byl zkoumán jeho potenciál zlepšit hepatální a renální dysfunkce u diabetických potkanů. Studie odhalila, že *L. paraplantarum* BGCG11 má zmírňující hypoglykemický účinek, který napomáhá zlepšit narušenou rovnováhu v poškozených játrech a ledvinách diabetických potkanů. Dále *L. paraplantarum* BGCG11 přispívá ke snížení fibrotických procesů. Tato zjištěná data dělají z *L. paraplantarum* BGCG11 potenciální terapeutické probiotikum, které by mohlo být využíváno při léčbě diabetu a dalších patologických stavů, které jsou spojeny s nerovnováhou metabolismu, zánětem a fibrózou (Mihailović et al. 2017). Nishida a kol. (2017) ve své studii izolovali kmen *Lactobacillus paraplantarum* 11-1 z nálevu rýžových otrub a z kimchi. U *L. paraplantarum* 11-1 objevili nejen jeho schopnost stimulovat vrozenou imunitu, ale i schopnost zabránit infekci patogenem *Pseudomonas aeruginosa*, který napadá pacienty s oslabenou imunitou a způsobuje u nich zápal plic. V další studii byla testována účinnost dvanácti kandidátních probiotických kmenů z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* na chování a neuroendokrinní reakce myši s chronickým stresem. Zjistilo se, že kmeny *Lactobacillus paraplantarum* LP12407, *Lactobacillus paraplantarum* LP12418, *Lactobacillus paraplantarum* LP12151, *L. paracasei* Lpc-37 zabránily rozvoji úzkosti a deprese související se stresem (Stenman et al. 2020). V nedávné studii byla zaměřena pozornost na *Lactobacillus paraplantarum* PS128, byly zkoumány

jeho účinky na depresivní symptomy a kvalitu spánku u osob s nespavostí. Po měsíci bylo zjištěno, že kmen *L. paraplatum* PS128 zmírní symptomy deprese, úroveň únavy a zlepšil kvalitu spánku během fáze hlubokého spánku. Tyto změny souvisely se změnou mozkových vln, což znovu dokazuje propojení střevní mikrobioty a mozku (Ho et al. 2021).

3.3.12 *Flavonifractor plautii*

Flavonifractor plautii je grampozitivní anaerobní bakterie izolovaná z lidských výkalů (Carlier et al. 2010). Bylo prokázáno, že *F. plautii* souvisí s metabolismem katechinů ve střevě. Katechiny se řadí do skupiny antioxidantů, které můžeme najít v zeleném nebo černém čaji (Ozidal et al. 2016). Přesná funkce *F. plautii* však zatím není známá. Byla provedena studie na myším modelu, ve které byl podáván myším zelený čaj. Po osmi dnech došlo ke zvýšení množství *F. plautii*. Dále byl pak myším s akutní kolitidou podáván konkrétní kmen *F. plautii* ATCC 29863, aby byly prozkoumány jeho fyziologické účinky na hostitele. Výsledky ukázaly, že kmen *F. plautii* ATCC 29863 dokázal snížit úroveň zánětu ve střevech (Mikami et al. 2021). Účinky stejného kmene byly sledovány u obézních myší. Bylo zjištěno, že kmen *F. plautii* ATCC 29863 zmírňuje zánětlivé reakce v tukové tkáni, které jsou častými komplikacemi u diabetu a hypertenze (Mikami et al. 2020). Tato zjištění dělají z *F. plautii* ATCC 29863 další potenciální kmen, který by se dal využít jako bioterapeutikum.

3.3.13 Probiotika nové generace jako doplňky stravy nebo jako součást potravin

Vzhledem k výše popsaným účinkům probiotik nové generace roste zájem o jejich uplatnění ve farmaceutickém průmyslu, u potravinářských a nutraceutických společností. Aby probiotika nové generace mohla být uvedena na trh, je potřeba u nich provést povinné posouzení bezpečnostních parametrů. Podle aktualizovaného Nařízení Evropské komise 2015/2283 by komercializovaná probiotika měla disponovat kompletními informacemi týkajícími se identifikace a charakterizace mikroorganismů, zahrnující jakékoliv patogenní a toxikologické vlastnosti, stejně jako jejich potenciální alergenní účinky. Tyto informace by měly obsahovat také detailní popis výrobního procesu, včetně metod kultivace, technických specifikací a, v případě použití genetického inženýrství, relevantních aspektů této manipulace. Kromě toho je nutné poskytnout údaje o nutriční hodnotě a doporučeném dávkování, které jsou zásadní pro konzumaci lidmi. Důraz je kladen na provedení komplexního posouzení rizik před uvedením nových potravin a doplňků na trh, zahrnující jakékoli potenciální nebezpečí pro zdraví konzumentů. Nicméně v současné době zatím existuje málo informací o bezpečnosti a doporučeném dávkování probiotik nové generace, neboť tyto parametry se mění s příslušným probiotickým kmenem (Saarela 2019).

Hlavní překážku při výrobě probiotik nové generace představuje extrémní citlivost ke kyslíku a vnější podmínky obecně. Vzhledem k tomu, že se jedná o striktně anaerobní bakterie, je nutné zajistit nepřítomnost kyslíku během celého procesu zpracování. Tato podmínka se

zajistí například pomocí antioxidantů, které redukuje redoxní potenciál, nebo lze využít tzv. mikroenkapsulaci, o které je již pojednáno výše (Sousa et al. 2012, 2015). Dalším kritickým aspektem je optimalizace růstových médií s absencí složek živočišného původu, což umožňuje bezpečné použití pro lidskou potřebu a současně zajišťuje ekonomicky efektivní produkci biomasy a zachování biologické funkčnosti mikroorganismu (Plovier et al. 2016). Rovněž významným aspektem implementace probiotik do lidského zdraví je volba nosičů a terapeutických způsobů podání. Tento výběr by měl být pečlivě promyšlen s cílem zaručit účinnost v každém individuálním zdravotním stavu. Je také důležité zvážit, zda mohou být probiotika použita při prevenci u jednotlivců s predispozicí k rozvoji konkrétního onemocnění, udržování zdravotního stavu nebo při léčbě probíhající nemoci, s cílem obnovy střevní mikrobioty. Více je o této problematice pojednáno výše. V neposlední řadě je nutné, pokud je o probiotických nové generace smýšleno jako o léčivech, ověřit jejich účinek klinickými studiemi. Ověření účinku klinickými studiemi je vhodné i u tradičních probiotik a probiotik nové generace jako doplňků stravy, neboť testy prováděné v laboratoři na zvířatech nereflktují složité interakce mezi lidským hostitelem a jeho střevní mikrobiotou. Pokud výrobce deklaruje zdravotní přínos, musí být tento přínos jasně doložen klinickými studiemi, jinak dochází ke klamání spotřebitele (Almeida et al. 2020).

3.4 Prebiotika

Pro správnou funkci střevní mikrobioty je důležitá konzumace prebiotik, ať už prostřednictvím pestré stravy anebo formou doplňků stravy. Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které mají příznivý vliv na rozvoj pozitivních mikroorganismů, které kolonizují střevní mikrobiotu člověka a mohou ovlivnit jeho zdraví. Aby nestravitelná složka potravy mohla být definována jako prebiotikum, musí projít v nezměněném stavu horní částí trávicí soustavy až do střev, kde je následně využita mikroorganismy, které mají pozitivní vliv na zdraví jedince. Někdy ovšem nemusí být působení prebiotik zcela selektivní. Prebiotické látky nalezneme hlavně v rostlinné stravě, a to nejčastěji v podobě oligosacharidů (Venema & do Carmo 2015).

Oligosacharidy jsou chemické látky neboli polymery, které se skládají z 2 až 10 cukerných jednotek. Nejznámější a nejpoužívanější jsou fruktooligosacharidy (FOS), které jsou složeny z fruktózy, a galaktooligosacharidy (GOS), které obsahují galaktózové jednotky. FOS se přirozeně nacházejí například v cibuli, česneku, banánech, rajčatech a průmyslově se vyrábějí štěpením inulinu, který se nachází v hlízách čekanky, topinambur a sladkých brambor. Inulin má rovněž prebiotické účinky, ale studie ukazují, že mikroorganismy umí lépe využít FOS než inulin. GOS se přirozeně vyskytují v malém množství v mléce a průmyslově se vyrábí z laktózy. Mezi GOS se mohou zařazovat i oligosacharidy rafinózové řady, jejichž základem je trisacharid rafinóza. Na tyto oligosacharidy jsou bohaté především luštěniny a sója, proto jsou někdy nazývány také jako sójové oligosacharidy. Další oligosacharidy, které jsou považovány

za prebiotika, jsou například rezistentní škrob, xylooligosacharidy, arabinooligosacharidy, ale i synteticky vyráběné laktulóza, polydextróza, izomaltooligosacharidy a další (Pandey et al. 2015).

3.5 Synbiotika

Synbiotika představují kombinaci probiotik a prebiotik. Jde tedy o soubor mikroorganismů a specifických látek, které slouží jako výživa pro mikroorganismy, se kterými jsou kombinovány. Zároveň prebiotická složka ze synbiotik podporuje i mikroorganismy nacházející se v trávicím traktu. Existuje však i jiný typ synbiotik, kdy prebiotická složka nepodporuje probiotickou složku, ale podporuje až mikroorganismy v trávicím traktu. Jsou to tzv. komplementární synbiotika. Synbiotikum může být například jogurt s přídavkem fruktooligosacharidů nebo mléčná kojenecká náhrada, která obsahuje jak prebiotické látky, tak probiotické mikroorganismy (Pandey et al. 2015).

4 Materiál a metody

4.1 Testované probiotické preparáty a stolice

4.1.1 Probiotické doplňky stravy

Bylo testováno celkem 10 vzorků probiotických doplňků stravy, z nichž 5 bylo na začátku expirační doby, 5 naopak před koncem. Charakteristika testovaných doplňků stravy je uvedena v Tabulce 2.

Tabulka 2: Charakteristika testovaných probiotických doplňků stravy

Číslo vzorku	Expirace produktu	Deklarovaný počet MO	Deklarované složení MO
1	06/2023	Laktobacily 2×10^9 Bifidobakterie 5×10^9	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
2	07/2023	Laktobacily 5×10^8 Bifidobakterie 2×10^9	<i>Bifidobacterium animalis lactis</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
3	05/2023	celkem $1,1 \times 10^{10}$	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>
4	08/2023	celkem 1×10^{10}	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbruecki</i> ssp <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> ,

			<i>Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus lactis ssp lactis</i>
5	05/2023	celkem 3×10^{10}	<i>Bifidobacterium animalis, Lactobacillus plantarum, Bacillus subtilis, Bifidobacterium longum, Bacillus coagulans Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, Streptococcus thermophilus, Saccharomyces boulardii</i>
6	10/2024	celkem 4×10^{10}	<i>Pediococcus acidolactici, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus plantarum, Bifidobacterium longum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei ssp paracasei, Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium bifidum</i>
7	01/2025	neuveveno	neuveveno
8	02/2024	celkem 2×10^{10}	<i>Bifidobacterium breve, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus lactis ssp lactis, Sreptococcus thermophilus</i>
9	05/2024	Laktobacily $2,9 \times 10^{10}$ Bifidobakterie $1,2 \times 10^9$	<i>Lactobacillus paracasei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium bifidum</i>
10	10/2023	Laktobacily 1×10^9 Bifidobakterie 1×10^9	<i>Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>

4.1.2 Vzorky stolice

Bylo testováno celkem 10 vzorků stolice od dobrovolných anonymních dospělých dárců. Mezi dárci bylo 6 žen a 4 muži ve věku od 18 do 52 let. Jejich seznam je uveden v Tabulce 3. Dárci byli informováni o nakládání s darovaným materiálem a o tom, že data budou zpracovávána zcela anonymně. Vzorek se odebíral následujícím způsobem. Do zkumavky s bujónem a anaerobní atmosférou byl odebrán cca 1 g čerstvé stolice (velikost lískového oříšku), která nesměla přijít do kontaktu s vodou v záchodové míse. Vzorek byl odebrán přímo od rekta nebo ze záchodové mísy, která byla předtím vyplněna toaletním papírem, aby se vzorek stolice nedostal do styku s vodou z toalety. Zkumavka byla následně řádně uzavřena a vzorek v ní opatrně promíchán, aby byl celý ponořen do tekutiny. Takto připravená zkumavka byla uchovávána v chladu a převezena do laboratoře.

Tabulka 3: Souhrmný přehled použitých vzorků lidské stolice, pohlaví a věk jednotlivých dárců.

Číslo dárce	Pohlaví	Věk
1	Žena	22
2	Muž	22
3	Žena	20
4	Muž	20
5	Muž	24
6	Žena	52
7	Muž	52
8	Žena	24
9	Žena	18
10	Žena	23

4.2 Kultivační média

Pro mikrobiologický rozbor probiotických doplňků stravy a lidské stolice byla použita kultivační desková metoda. Laktobacily, bifidobakterie a celkové počty anaerobních mikroorganismů byly stanovovány na selektivních polotuhých médiích. Tato média obsahují všechny potřebné živiny pro množení daného druhu mikroorganismů a zároveň obsahují látky, které zamezují růstu ostatních nežádoucích mikroorganismů. Jak se bude která skupina mikroorganismů množit, závisí na složení selektivního média a nastavení kultivačních podmínek. Složení kultivačních a ředicích médií je uvedeno v následující kapitole.

4.2.1 Odběrové a ředící médium

Složení: 5 g/l tryptone, 5 g/l nutrient broth No. 2, 2,5 g/l yeast extract (all Oxoid, Basingstoke, UK), 0,5 g/l L-cysteine, 1 ml/l Tween 80

Jednotlivé komponenty byly naváženy do Erlenmayerovy baňky a zality příslušným množstvím destilované vody. Po zahřátí a rozpuštění složek bylo upraveno pH média na 7. Následně bylo pomocí automatické pipety převedeno po 9 ml do zkumavek (odběrové médium) a do vialek (ředící médium). Ve zkumavkách a vialkách vytvořeny anaerobní podmínky třemi různými variantami:

1. Varianta „**čistý CO₂**“: ve vodní lázni byla média provařena, 10 minut při 100 °C, následně bylo médium probubláno čistým CO₂ (plyn v kvalitě pro potravinářské účely procházel přes redukovanou měděnou kolonu, zbytkový kyslík byl zachycen na mědi).
2. Varianta „**potravinářský CO₂**“: média byla vyvařena ve vodní lázni 10 minut při 100 °C a probublána oxidem uhličitým v potravinářské kvalitě.
3. Varianta „**vyvaření**“: zkumavky a vialky byly pouze provařena ve vodní lázni, 10 minut při 100 °C.

Všechny zkumavky byly po naplnění hermeticky uzavřeny, aby došlo k zajištění anaerobních podmínek, a vysterilizovány.

Rogosa agar (Oxoid) pro stanovení laktobacilů

Složení: trypton (10 g/l), kvasničný extrakt (5 g/l), glukóza (20 g/l), Tween 80 (1 ml/l), KH₂PO₄ (6 g/l), citrát amonný (2 g/l), acetát sodný (17 g/l), síran hořečnatý (0,575 g/l), síran manganatý (0,12 g/l), síran železnatý (0,12 g/l), agar (20 g/l)

Pro stanovení laktobacilů byl použit Rogosa agar. Do Erlenmayerovy baňky byl podle pokynů výrobce připraven agar. K připravenému agaru bylo přidáno 100 µl 98% kyseliny octové na 100 ml agaru. Baňka s přidanou kyselinou byla vložena do vodní lázně, aby došlo k prohřátí. Přidáním kyseliny došlo ke snížení pH, které během kultivace podpořilo růst laktobacilů a potlačilo růst bakterií mléčného kvašení. Erlenmayerova baňka byla ochlazena na 50 °C.

Modifikovaný Wilkins Chalgren agar (Oxoid; WSPMup) pro stanovení bifidobakterií

Složení: trypton (10 g/l), pepton želatiny (10 g/l), kvasničný extrakt (5 g/l), glukóza (1 g/l), chlorid sodný (5 g/l), L-Arginin (1 g/l), pyruvát sodný (1 g/l), Menadion (vitamin K)

(0,5 mg/l), hemin (0,5 mg/l), agar (10 g/l), sójový pepton (5 g/l; Oxoid), cystein (0,5 g/l), tween 80 (1 ml/l), mupirocin (50 mg/l)

Bifidobakterie byly stanoveny prostřednictvím Wilkins Chalgren agaru, který byl modifikován přidavkem mupirocinu. Agar byl připraven dle pokynů výrobce do Erlenmayerovy baňky spolu se sójovým peptonem, cysteinem a tweenem. Baňka byla vložena do autoklávu a sterilována 20 minut při 120 °C. Po sterilizaci bylo přidáno 100 µl 98% kyseliny octové na 100 ml agaru a po zchlazení na 50 °C byl přidán mupirocin 100 mg/l, který při kultivaci potlačil růst bakterií mléčného kvašení.

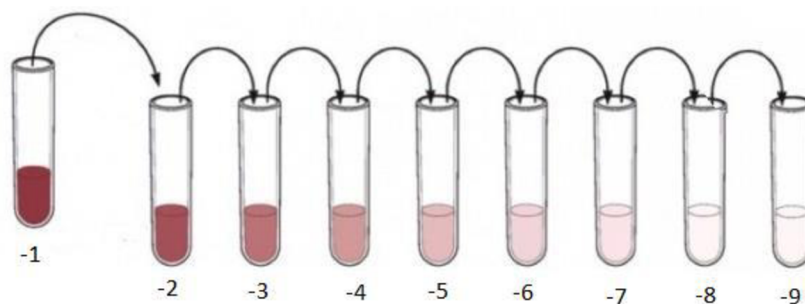
Wilkins Chalgren agar (Oxoid; WSP) pro stanovení celkového počtu mikroorganismů

Složení: trypton (10 g/l), pepton želatiny (10 g/l), kvasničný extrakt (5 g/l), glukóza (1 g/l), chlorid sodný (5 g/l), L-Arginin (1 g/l), pyruvát sodný (1 g/l), Menadion (vitamín K) (0,5 mg/l), hemin (0,5 mg/l), agar (10 g/l), sójový pepton (5 g/l; Oxoid), cystein (0,5 g/l), tween 80 (1 ml/l)

Ke stanovení celkového počtu mikroorganismů byl použit Wilkins Chalgren agar. Do Erlenmayerovy baňky byl připraven agar dle instrukcí výrobce, ke kterému byl přidán sójový pepton, cystein a tween. Baňka byla vložena do autoklávu a sterilována 20 minut při 120 °C. Po sterilizaci byl agar opět zchlazen na teplotu 50 °C.

4.3 Postup při mikrobiologickém rozboru

U vzorků probiotických doplňků stravy byly stanoveny celkové počty laktobacilů a bifidobakterií. Vzorky byly zváženy, homogenizovány a naředěny desítkovým ředěním (viz Obrázek 6) podle deklarovaného počtu probiotických bakterií, tedy do ředění 10^{-9} do každé varianty ředící řady.

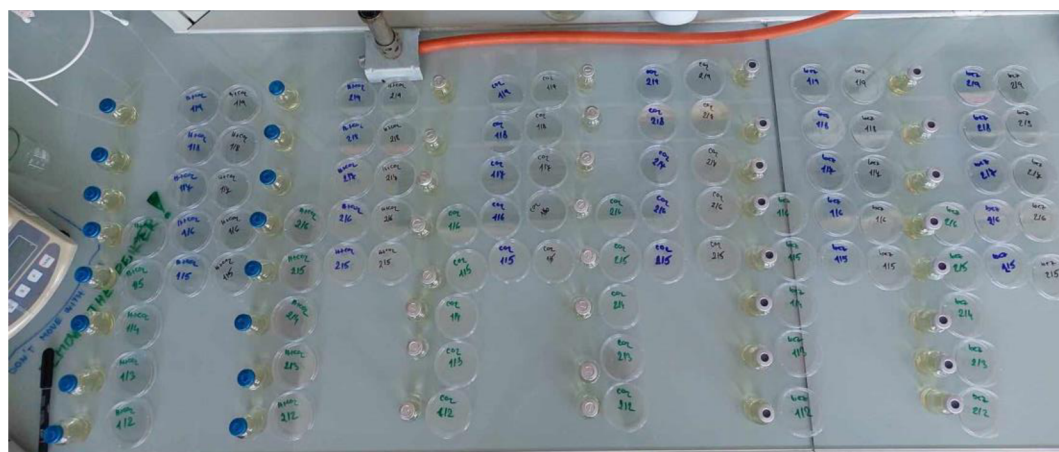


Obrázek 6: Desítkové ředění

Jednalo se o varianty „čistý CO₂“, „potravinářský CO₂“ a „vyvaření“. Od každé varianty ředící řady byla provedena 3 opakování. Ředění probíhalo anaerobně za použití jehel a stříkaček. Na

Petriho misky byla naočkováána příslušná ředění. Naředěný vzorek na Petriho miskách určených pro laktobacily byl nejprve zalit jednou vrstvou ochlazeného agaru a po ztuhnutí dále druhou vrstvou. Dvojitou vrstvou agaru bylo zajištěno mikroaerofilní prostředí. Misky byly po zatuhnutí obou vrstev umístěny dnem vzhůru do termostatu o teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Petriho misky určené pro bifidobakterie byly přelity jednou vrstvou agaru a ihned umístěny do anaerostatu s paladiovým katalyzátorem, ze kterého se odčerpál kyslík pomocí vývěvy a objem nádoby se doplnil směsí vodíku a oxidu uhličitého. Anaerostaty byly umístěny do termostatu o teplotě 37 °C, kultivace probíhala 72 hodin. Petriho misky určené pro kultivaci celkového počtu mikroorganismů byly přelity také jednou vrstvou agaru a po ztuhnutí umístěny do anaerostatu. Kultivace probíhala obdobně jako u laktobacilů a bifidobakterií, tedy při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Po kultivaci byly kolonie spočítány.

Při rozboru stolice byly stanoveny laktobacily, bifidobakterie a celkové počty mikroorganismů. Byl proveden obdobný postup jako u probiotických doplňků stravy, pouze s tím rozdílem, že na Petriho misky určené pro růst laktobacilů bylo očkováno druhé až šesté ředění a na Petriho misky pro růst bifidobakterií a celkového počtu mikroorganismů bylo očkováno páté až deváté ředění viz Obrázek 7. Petriho misky určené pro laktobacily a bifidobakterie byly zality stejným způsobem jako u probiotických doplňků stravy. Petriho misky určené pro kultivaci celkového počtu mikroorganismů byly přelity jednou vrstvou agaru a po ztuhnutí umístěny do anaerostatu. Kultivace probíhala obdobně jako u laktobacilů a bifidobakterií, tedy při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Po kultivaci byly kolonie opět spočítány.



Obrázek 7: Připravené Petriho misky a příslušné varianty ředící řady

4.4 Postup při vyhodnocení

Po kultivaci byly narostlé kolonie spočítány. Každá Petriho miska byla spočítána zvlášť pomocí lihového fixu a počítací komůrky, jak je vidět na Obrázku 8. Spočítané kolonie byly vynásobeny dvakrát, protože na každou Petriho misku bylo dáno pouze 0,5 ml naředěného vzorku. Výsledné množství bakterií bylo vypočítáno podle vzorce:

$$P = [(P1+P2)/11] \times F \text{ (KTJ/ml)}$$

P1, P2: počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počítatelných Petriho miskách

F: převrácená hodnota vyššího ředění.

Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách KTJ/ml (kolonie tvořící jednotku v 1 ml vzorku).



Obrázek 8: Počítací deska

5 Výsledky

5.1 Deklarované počty mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy

Bylo testováno celkem 10 vzorků probiotických doplňků stravy, z nichž 5 bylo v době měření před koncem expirační doby (číslo vzorku 1-5), 5 naopak bylo na začátku expirační doby (číslo vzorku 6-10). Pomocí kultivačních metod byly stanoveny laktobacily a bifidobakterie v probiotických doplňcích stravy. Cílem bylo ověřit, zda tyto přípravky skutečně obsahují množství mikroorganismů uváděné výrobcem. Udávané množství v jedné dávce bylo přepočítáno na 1 gram a získané výsledky byly vyjádřeny v jednotkách log KTJ/g, aby bylo možné provést lepší srovnání. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4. Dále bylo zjišťováno, zda výrobce správně deklaruje názvy druhů probiotických mikroorganismů.

Tabulka 4: Deklarované a zjištěné počty mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy (výrobky zvýrazněné tučně nesplňují deklarované počty mikroorganismů)

Číslo vzorku	Expirace produktu	Deklarovaný počet /dávka	Deklarovaný počet celkem/g	Deklarovaný počet log /g	Zjištěný počet log /g ± SD
1	06/2023	Laktobacily 2x10⁹ Saccharomyces 5x10⁹	2,1x10¹⁰	10,33	9,19 ± 0,05
2	07/2023	Laktobacily 5x10⁹ Bifidobakterie 2x10⁹	2,1x10¹⁰	10,31	7,48 ± 0,06
3	05/2023	celkem 1,1x10¹⁰	2,1x10¹⁰	10,32	8,31 ± 0,02
4	08/2023	celkem 1x10¹⁰	1,8x10¹⁰	10,26	8,97 ± 0,09
5	05/2023	celkem 3x10¹⁰	5,8x10¹⁰	10,76	8,97 ± 0,01
6	10/2024	celkem 2x10 ¹⁰	7,7x10 ¹⁰	10,89	10,77 ± 0,04
7	01/2025	neuvedeno	neuvedeno	neuvedeno	11,04 ± 0,03
8	02/2024	celkem 1x10¹⁰	5,9x10¹⁰	10,77	10,19 ± 0,40
9	05/2024	Laktobacily 2,9x10 ¹⁰ Bifidobakterie 1,2x10 ⁹	1,6x10 ¹⁰	10,2	10,44 ± 0,08
10	10/2023	Laktobacily 1x10 ⁹ Bifidobakterie 1x10 ⁹	8,7x10 ⁹	9,94	10,06 ± 0,06

Bylo zjištěno, že všechny vzorky č. 1-5, které byly v době měření před koncem doby minimální trvanlivosti, nesplnily deklarovaný počet probiotických mikroorganismů. U zcela nově zakoupených vzorků deklarované počty nesplnil pouze vzorek č. 8. Největší pokles v počtech byl zaznamenán u vzorku č. 2. Naopak nejmenší pokles v počtech byl zjištěn u vzorku č. 8. Z celkového hlediska nejčastěji počty klesaly až o 2 řády.

Správnost všech názvů deklarovaných druhů splnil pouze 1 z 10 vzorků. Konkrétně se jedná o vzorek č. 10. U všech ostatních vzorků byl název špatně deklarovaný minimálně u dvou druhů. Špatně deklarované názvy druhů byly následující (v závorce je vždy uveden správný název): *Lactobacillus rhamnosus* (*Lacticaseibacillus rhamnosus*); *Bifidobacterium animalis lactis* (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*); *Lactobacillus paracasei* (*Lacticaseibacillus paracasei*); *Lactobacillus rhamnosus* (*Lacticaseibacillus rhamnosus*); *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*); *Lactobacillus casei* (*Lacticaseibacillus casei*); *Lactobacillus bulgaricus* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*); *Bifidobacterium infantis* (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*); *Lactobacillus salivarius* (*Ligilactobacillus salivarius*); *Lactobacillus lactis* ssp *lactis* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*); *Bacillus coagulans* (*Heyndrickxia coagulans*).

5.2 Probiotické doplňky stravy

Pomocí kultivačních metod byly stanoveny laktobacily a bifidobakterie v probiotických doplňcích stravy. Rozdíl byl v tom, že ředící řady pro ředění vzorku byly připraveny třemi různými způsoby. Jednalo se o varianty vyvaření, probublání CO₂ s potravinářskou kvalitou nebo čistým CO₂. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Počty bakterií (log KTJ/g ± SD) stanovené v probiotických doplňcích stravy

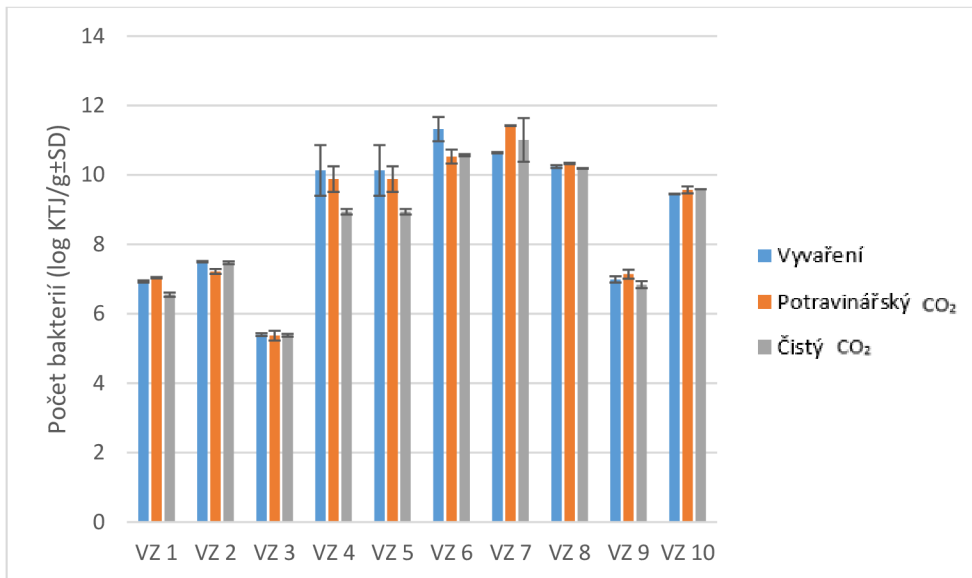
Číslo vzorku	Skupina bakterií	Počet bakterií (log KTJ/g ± SD)		
		Vyvaření	Potravinářský CO ₂	Čistý CO ₂
1	Lbc	6,93 ± 0,03 ^A	7,04 ± 0,02 ^B	6,55 ± 0,06 ^C
	Bif	NT	NT	NT
2	Lbc	7,50 ± 0,02 ^A	7,22 ± 0,07 ^B	7,47 ± 0,04 ^A
	Bif	5,71 ± 0,07 ^A	5,40 ± 0,09 ^B	5,76 ± 0,08 ^A
3	Lbc	5,40 ± 0,04 ^A	5,37 ± 0,14 ^A	5,38 ± 0,04 ^A
	Bif	8,56 ± 0,04 ^A	8,55 ± 0,06 ^A	8,31 ± 0,01 ^B
4	Lbc	10,13 ± 0,73 ^A	9,88 ± 0,37 ^A	8,94 ± 0,08 ^A
	Bif	7,82 ± 0,07 ^A	8,59 ± 0,04 ^B	7,75 ± 0,09 ^A
5	Lbc	10,13 ± 0,73 ^A	9,88 ± 0,37 ^A	8,94 ± 0,08 ^A
	Bif	7,82 ± 0,07 ^A	8,59 ± 0,04 ^A	7,75 ± 0,09 ^A
6	Lbc	11,32 ± 0,35 ^B	10,53 ± 0,20 ^A	10,57 ± 0,03 ^A
	Bif	10,51 ± 0,02 ^A	10,05 ± 0,05 ^B	10,34 ± 0,04 ^C
7	Lbc	10,64 ± 0,02 ^A	11,42 ± 0,01 ^A	11,01 ± 0,63 ^A
	Bif	9,88 ± 0,01 ^A	9,87 ± 0,04 ^A	9,92 ± 0,16 ^A
8	Lbc	10,24 ± 0,04 ^A	10,33 ± 0,02 ^B	10,19 ± 0,01 ^A
	Bif	8,33 ± 0,11 ^A	8,50 ± 0,37 ^A	8,22 ± 0,16 ^A
9	Lbc	6,99 ± 0,09 ^B	7,14 ± 0,13 ^B	6,84 ± 0,10 ^A
	Bif	10,34 ± 0,0 ^B	10,46 ± 0,02 ^A	10,44 ± 0,01 ^A
10	Lbc	9,45 ± 0,01 ^A	9,57 ± 0,10 ^B	9,59 ± 0,00 ^C
	Bif	9,90 ± 0,05 ^A	10,08 ± 0,02 ^B	9,88 ± 0,03 ^A
Průměr	Lbc	8,94 ± 2,05 ^A	8,93 ± 2,05 ^A	8,73 ± 2,02 ^A
	Bif	9,03 ± 1,58 ^A	9,08 ± 1,59 ^A	8,98 ± 1,58 ^A

Lbc – laktobacily; Bif – bifidobakterie; NT – netestováno; ^{ABC} – hodnoty v řádcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

U vzorků probiotických doplňků stravy 3, 4, 5, 7, 10 nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly při stanovení laktobacilů při různých způsobech přípravy ředící řady. U vzorku 2 byly statisticky významně vyšší počty u variant vyvaření a čistý CO₂ oproti variantě potravinářský CO₂. Na druhou stranu tyto dvě varianty u vzorku 2 měly statisticky významně

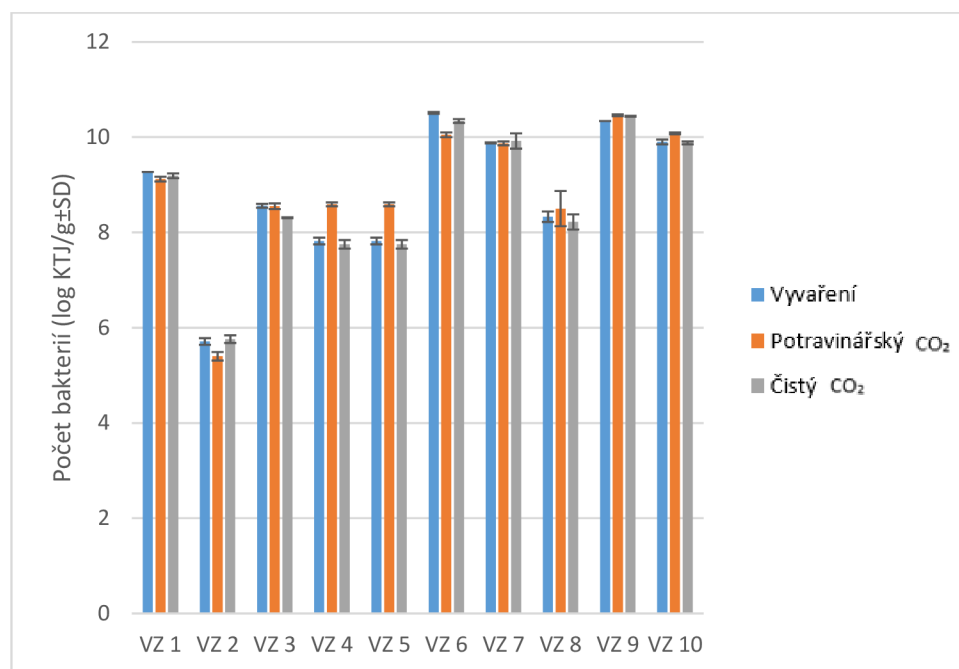
nižší počty oproti variantě potravinářský CO₂. Nejvyšší rozdíly v počtech byly zaznamenány u vzorku 7, kdy byly počty při způsobu přípravy ředícího média formou potravinářský CO₂ téměř až o řád vyšší než u varianty vyvaření. Ze všech vzorků, u kterých byly pozorovány nějaké statisticky významné rozdíly, nejvíce vyčníval vzorek 1, u kterého byly statisticky významné rozdíly mezi všemi třemi způsoby přípravy ředící řady. Pro lepší grafické znázornění jsou výsledky uvedeny v Grafu 1.

Graf 1: Počty laktobacilů v probiotických doplňcích stravy (VZ = vzorek 1-10)



U bifidobakterií nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly při stanovení u vzorků 5, 7 a 8. U vzorku 3 byly statisticky významně vyšší počty u varianty vyvaření oproti variantě s použitím čistého CO₂. U vzorku 9 bylo zjištěno, že statisticky významně nižší počty se nacházely u varianty vyvaření oproti ostatním variantám. Ze všech vzorků, u kterých byly pozorovány nějaké statisticky významné rozdíly, nejvíce vyčníval vzorek 6, u kterého byly statisticky významné rozdíly mezi všemi třemi způsoby přípravy ředící řady. Pro lepší grafické znázornění jsou výsledky uvedeny v Grafu 2.

Graf 2: Počty bifidobakterií v probiotických doplňcích stravy (VZ = vzorek 1-10)



Při porovnání průměrných počtů nebyly jak u laktobacilů, tak u bifidobakterií zaznamenány statisticky významné rozdíly. Nejvyšší průměrné počty laktobacilů byly u varianty vyvaření, a naopak nejnižší průměrné počty byly u varianty čistý CO₂. U bifidobakterií byly zaznamenány nejvyšší průměrné počty u varianty potravinářský CO₂ a nejnižší průměrné počty byly u varianty čistý CO₂ jako tomu bylo u laktobacilů.

5.3 Vzorky stolice

Pomocí kultivačních metod byly stanoveny laktobacily, bifidobakterie a celkové počty anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií (CPM) ve vzorcích stolice dospělých dobrovolníků. Stejně jako v případě stanovení mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy bylo ředící médium připraveno 3 různými způsoby. Jednalo se o varianty vyvaření, probubláný CO₂ s potravinářskou kvalitou a čistý CO₂. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 6.

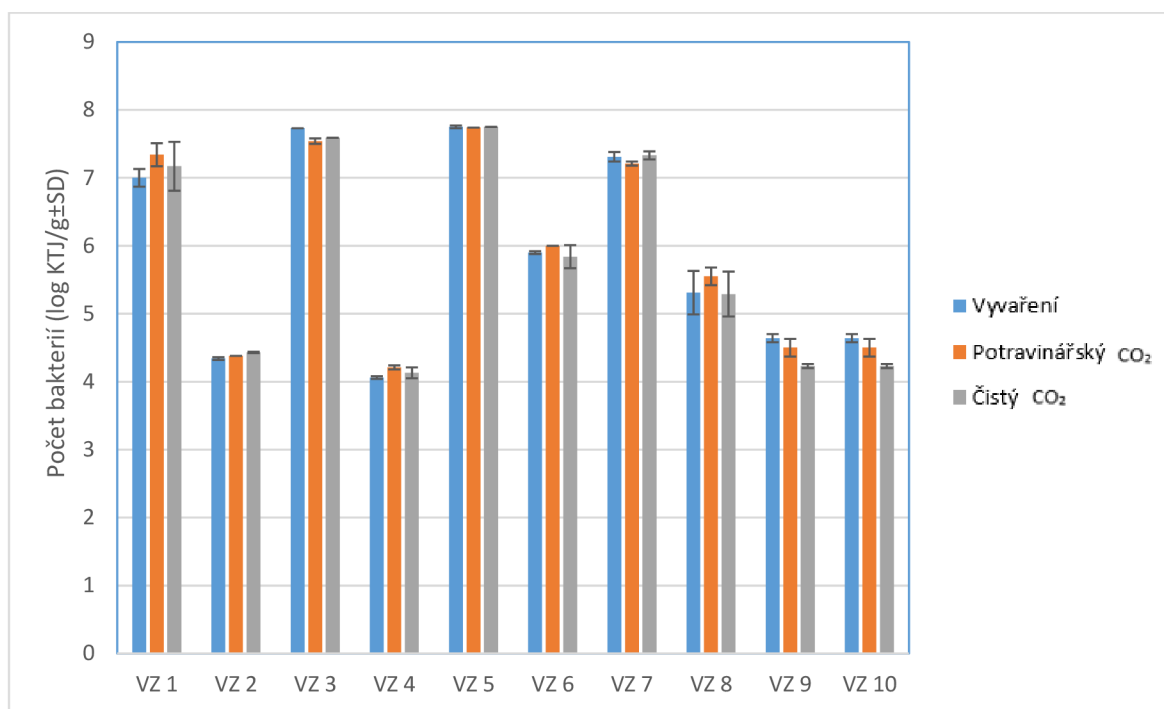
Tabulka 6: Počty bakterií ((log KTJ/g ± SD) stanovené ve vzorcích stolice

Číslo vzorku	Skupina bakterií	Počet bakterií (log KTJ/g ± SD)		
		Vyvaření	Potravinářský CO ₂	Čistý CO ₂
1	Lbc	7,00 ± 0,13 ^A	7,34 ± 0,17 ^A	7,17 ± 0,36 ^A
	Bif	9,37 ± 0,04 ^A	9,41 ± 0,09 ^A	9,57 ± 0,11 ^A
	CPM	10,05 ± 0,07 ^A	10,21 ± 0,19 ^A	9,91 ± 0,19 ^A
2	Lbc	4,34 ± 0,02 ^A	4,38 ± 0,00 ^B	4,43 ± 0,01 ^C
	Bif	9,16 ± 0,07 ^A	9,26 ± 0,04 ^A	9,29 ± 0,03 ^A
	CPM	10,36 ± 0,07 ^{AB}	10,27 ± 0,01 ^B	10,43 ± 0,01 ^A
3	Lbc	7,73 ± 0,00 ^B	7,54 ± 0,04 ^A	7,59 ± 0,00 ^A
	Bif	9,05 ± 0,01 ^A	9,11 ± 0,02 ^A	9,10 ± 0,06 ^A
	CPM	10,48 ± 0,02 ^A	10,55 ± 0,01 ^B	10,52 ± 0,02 ^{AB}
4	Lbc	4,06 ± 0,02 ^A	4,21 ± 0,03 ^B	4,13 ± 0,08 ^{AB}
	Bif	10,11 ± 0,04 ^A	10,08 ± 0,02 ^A	10,09 ± 0,02 ^A
	CPM	10,50 ± 0,06 ^A	10,58 ± 0,01 ^{AB}	10,66 ± 0,05 ^B
5	Lbc	7,75 ± 0,02 ^A	7,74 ± 0,00 ^A	7,75 ± 0,00 ^A
	Bif	9,24 ± 0,01 ^A	9,18 ± 0,03 ^A	9,19 ± 0,05 ^A
	CPM	10,30 ± 0,05 ^A	10,28 ± 0,01 ^A	10,34 ± 0,07 ^A
6	Lbc	5,90 ± 0,02 ^A	6,00 ± 0,00 ^A	5,84 ± 0,17 ^A
	Bif	9,24 ± 0,07 ^A	9,03 ± 0,03 ^B	9,15 ± 0,08 ^{AB}
	CPM	10,14 ± 0,07 ^B	10,29 ± 0,01 ^A	10,28 ± 0,00 ^A
7	Lbc	7,31 ± 0,07 ^A	7,21 ± 0,03 ^A	7,33 ± 0,06 ^A
	Bif	8,81 ± 0,10 ^A	8,90 ± 0,01 ^A	8,86 ± 0,01 ^A
	CPM	10,41 ± 0,12 ^B	9,41 ± 0,13 ^A	9,19 ± 0,00 ^A
8	Lbc	5,31 ± 0,32 ^A	5,55 ± 0,13 ^A	5,29 ± 0,33 ^A
	Bif	8,91 ± 0,02 ^A	8,97 ± 0,08 ^A	9,02 ± 0,01 ^A
	CPM	9,19 ± 0,64 ^A	9,24 ± 0,12 ^A	9,79 ± 0,01 ^A
9	Lbc	4,64 ± 0,06 ^A	4,50 ± 0,13 ^A	4,23 ± 0,03 ^B
	Bif	9,57 ± 0,05 ^A	9,51 ± 0,00 ^A	9,57 ± 0,12 ^A
	CPM	9,94 ± 0,12 ^A	9,82 ± 0,20 ^A	9,70 ± 0,07 ^A
10	Lbc	4,64 ± 0,06 ^A	4,50 ± 0,13 ^A	4,23 ± 0,03 ^B
	Bif	9,95 ± 0,01 ^A	9,76 ± 0,24 ^A	10,10 ± 0,01 ^A
	CPM	10,30 ± 0,03 ^A	10,34 ± 0,03 ^A	10,46 ± 0,03 ^B
Průměr	Lbc	5,87 ± 1,46 ^A	5,90 ± 1,46 ^A	5,80 ± 1,53 ^A
	Bif	8,49 ± 2,85 ^A	8,47 ± 2,83 ^A	8,54 ± 2,86 ^A
	CPM	9,24 ± 3,09 ^A	9,18 ± 3,08 ^A	9,21 ± 3,09 ^A

Lbc – laktobacily; Bif – bifidobakterie; CPM – celkové počty mikroorganismů; ^{ABC} – hodnoty v řádcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$

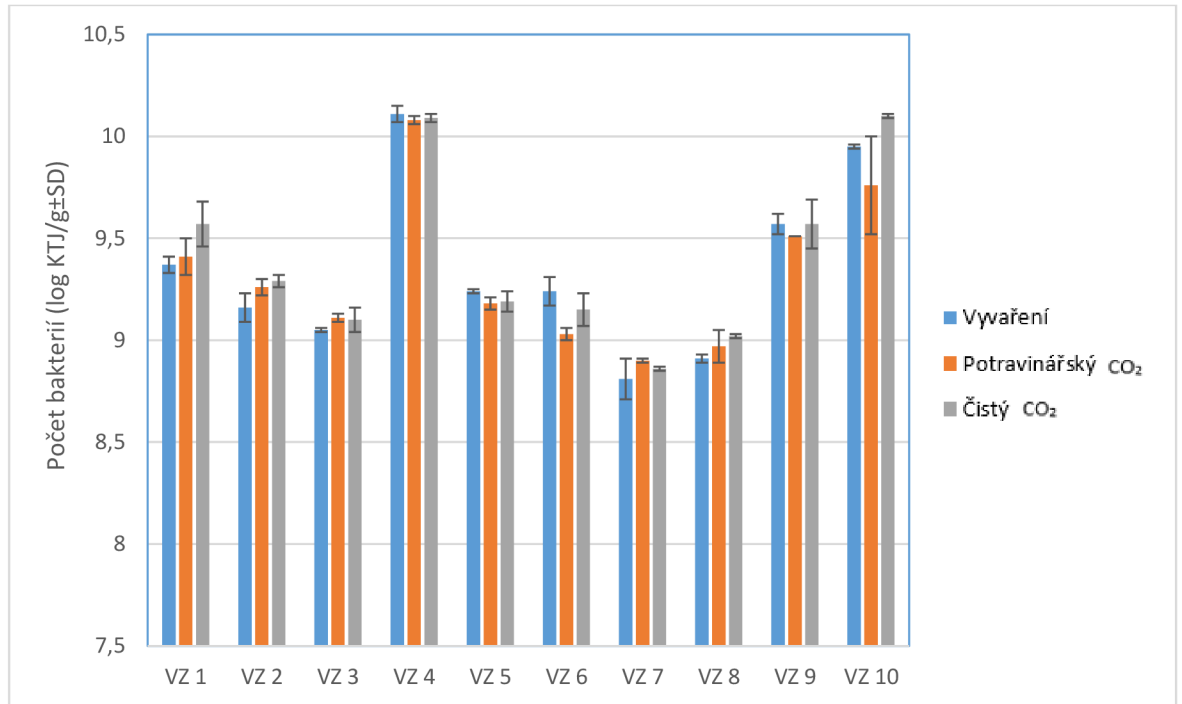
U vzorků stolice 1, 5, 6, 7, 8 nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly při stanovení laktobacilů při různých způsobech přípravy ředící řady. Statisticky významně vyšší počty byly u vzorků 3, 9 a 10 u varianty vyvaření oproti variantě čistý CO₂. Naopak statisticky významně nižší počty byly u vzorku 4 u varianty vyvaření oproti variantě potravinářský CO₂. Stejně jako u laktobacilů stanovených u probiotických doplňků stravy, tak i zde byl nalezen vzorek, u kterého byly statisticky významné rozdíly mezi všemi třemi způsoby přípravy ředící řady. Jednalo se o vzorek 2. Pro lepší grafické znázornění jsou výsledky uvedeny v Grafu 3.

Graf 3: Počty laktobacilů ve vzorcích stolice (VZ = vzorek 1-10)



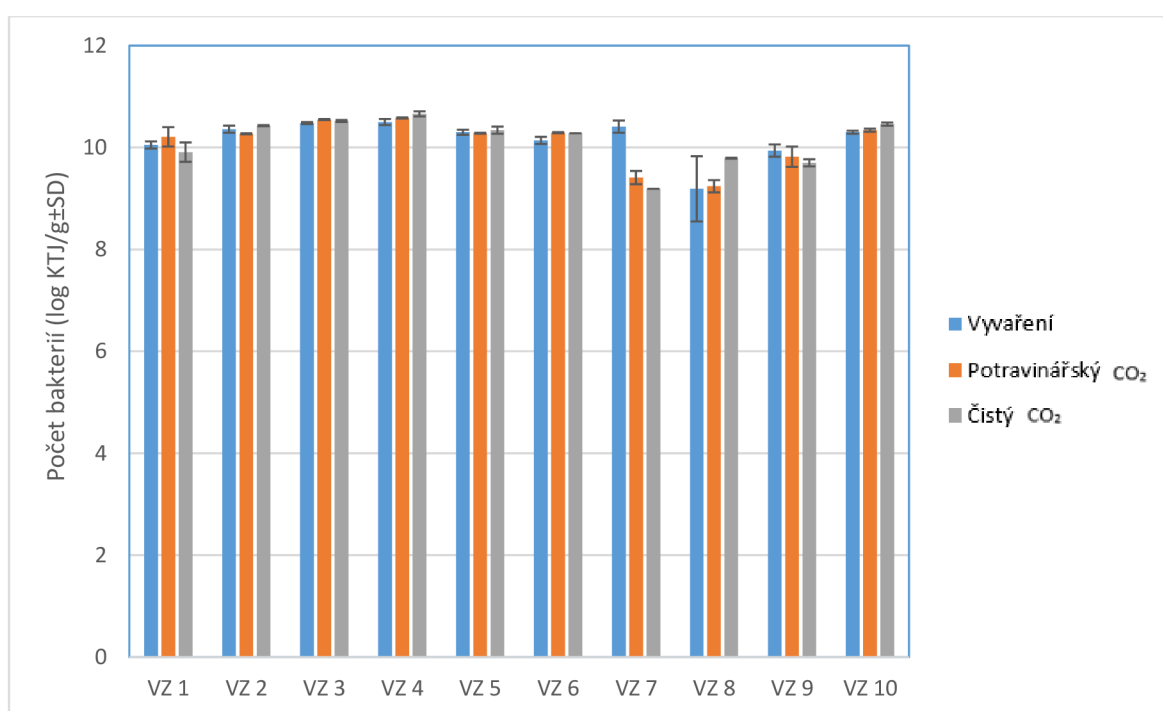
U bifidobakterií, které byly stanoveny ve vzorcích při různých způsobech přípravy ředící řady, byly nalezeny statisticky významné rozdíly pouze u vzorku 6, kde byl zjištěn statisticky významně nižší počet bifidobakterií u varianty potravinářský CO₂ oproti variantě vyvaření. Pro lepší grafické znázornění jsou výsledky uvedeny v Grafu 4.

Graf 4: Počty bifidobakterií ve vzorcích stolice (VZ = vzorek 1-10)



Nejvíce statisticky významných rozdílů ve vzorcích bylo zjištěno při stanovení CPM při různých způsobech přípravy ředící řady. Jednalo se o vzorky 2, 3, 4, 6, 7 a 10. U vzorku 2 byl statisticky významně vyšší počet CPM u varianty potravinářský CO₂ oproti variantě vyvaření. Statisticky významně nižší počty byly u vzorku 4 u varianty vyvaření oproti variantě potravinářský CO₂. Nejvyšší rozdíly v počtech byly zaznamenány u vzorku 7, kdy byly počty při způsobu přípravy ředícího média formou vyvaření až o řád vyšší než u varianty potravinářský CO₂. Při stanovení CPM při různých způsobech přípravy ředící řady nebyl nalezen žádný vzorek, u kterého by byl statisticky významný rozdíl mezi všemi variantami. Pro lepší grafické znázornění jsou výsledky uvedeny v Grafu 5.

Graf 5: Celkové počty mikroorganismů ve vzorcích stolice (VZ = vzorek 1-10)



Při porovnání průměrných počtů nebyly u laktobacilů, bifidobakterií ani CPM zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly. Nejvyšší průměrné počty laktobacilů byly u varianty potravinářský CO₂, a naopak nejnižší průměrné počty byly u varianty čistý CO₂. U bifidobakterií byly zaznamenány nejvyšší průměrné počty u varianty čistý CO₂ a nejnižší průměrné počty byly u varianty potravinářský CO₂. CPM měly nejvyšší průměrné počty u varianty vyvaření a nejnižší průměrné počty byly u varianty potravinářský CO₂.

6 Diskuze

Probiotika jsou živé nepatogenní mikroorganismy, které se konzumují za účelem zlepšení střevní mikrobiální rovnováhy (Hill et al. 2014). Jsou součástí fermentovaných potravin, doplňků stravy nebo jsou to samostatná léčiva. Probiotické výrobky často obsahují kvasinky, bifidobakterie, laktobacily a další bakterie mléčného kvašení, v menší míře i další mikroorganismy (Binda et al. 2020). Tradiční probiotika mají spíše obecné nespecifické účinky, jako je schopnost zlepšení/udržení správné rovnováhy střevní mikrobioty, schopnost inhibovat rozvoj střevních patogenních bakterií, modifikovat funkce imunitního systému a další (Hill et al. 2014). Tradičně používaná probiotika často nejsou typickou součástí trávicího traktu a nejsou schopna trávicí trakt trvale kolonizovat. Příčinou může být to, že přirozená mikrobiota nedovolí, aby se v trávicím traktu usídlily, nebo kultivací v laboratoři ztratí schopnost trvalého osídlení trávicího traktu. Mikroorganismy, které byly izolovány z trávicího traktu a svým působením specificky ovlivňují konkrétní patologický jev nebo fyziologický stav, jsou nazývány probiotika nové generace (Plaza-Diaz et al. 2019).

Probiotické mikroorganismy musí být živé a svou životaschopnost by si měly zachovávat i při průchodu trávicím traktem (Hill et al. 2014). Pozitivní vliv na hostitele však mohou mít i neživé formy, které jsou pak nazývány postbiotika nebo parabiotika (Cuevas- González et al. 2020). Aby probiotika, která jsou používána v potravinářství nebo při výrobě probiotických doplňků stravy, mohla být podávána živá a v dostatečném množství, musí být odolná proti působení žaludečních šťáv a musí být schopna růst a množit se v anaerobních podmínkách. Všechny tyto podmínky ovlivňuje i složení probiotických potravin nebo probiotických doplňků stravy a v neposlední řadě i jejich samotná výroba. Klíčovým faktorem pro výrobu probiotických doplňků stravy je zajištění životaschopnosti v dostatečném množství až do konce doby trvanlivosti (Fenster et al. 2019). Aby bylo zajištěno, že deklarovaná dávka bude dodržena až do data expirace a aby se kompenzovaly možné ztráty během skladování a manipulace, je do výrobního procesu běžně začleněno vyšší množství mikroorganismů (Sreeja & Prajapati 2013). I přes tuto skutečnost velmi často probiotické doplňky stravy nesplňují deklarované množství mikroorganismů, a to ani na začátku doby minimální trvanlivosti (Marinova et al. 2019).

Část této diplomové práce je zaměřena na ověření deklarovaného počtu mikroorganismů v probiotických doplňcích stravy, kdy byl potvrzen fakt, že tyto doplňky stravy nesplňují deklarované množství mikroorganismů před koncem doby minimální trvanlivosti. Bylo zjištěno, že některé probiotické doplňky stravy nesplňují deklarované množství ani na začátku doby minimální trvanlivosti. Bylo testováno 10 vzorků probiotických doplňků stravy, kdy polovina vzorků v době měření byla před koncem doby minimální trvanlivosti a druhá polovina byla zcela nově zakoupena. Testované výrobky zahrnovaly převážně kombinaci druhů laktobacilů a bifidobakterií. Ze vzorků, které se blížily k datu expirace, nesplňovalo deklarované množství 100 %. U vzorků, které byly zcela nově zakoupeny, nesplňovalo

deklarované množství pouze 5 %. Z celkového hlediska nevyhovělo 60 % vzorků. Počty bakterií nejčastěji počty klesaly až o 2 řády.

Měření bylo provedeno ve třech sériích a drobné rozdíly se pohybují v rámci běžného rozpětí chyb při kultivačním stanovení. Jak již bylo uvedeno, výrobci tradičních probiotik nejsou často schopni dodržet deklarované množství probiotických mikroorganismů (Marinova et al. 2019). Vzhledem k tomuto zjištění se objevuje otázka, zda při zavádění průmyslové výroby probiotik nové generace budou výrobci schopni zajistit deklarované počty bakterií. Zabezpečit správné podmínky kultivace a skladování je totiž u probiotik nové generace vzhledem k náchylnosti na kyslík ještě mnohem těžší. Pokud by probiotika nové generace výrobce zaregistroval jako léčiva, musela by splňovat odlišné legislativní podmínky, konkrétně Zákon o léčivech č. 378/2007 Sb., než běžné probiotické doplňky stravy, které jsou definovány Zákonem o potravinách č. 110/1997 Sb. a upraveny Vyhláškou č. 58/2018 Sb.

K podobným výsledkům, jaké jsou prezentovány v této práci, dospěli i autoři mnoha jiných studií. Například Marinova a kol. (2019) zkoumali probiotické doplňky stravy s obsahem laktobacilů na bulharském trhu. Bylo zjištěno, že obsah živých bakterií v žádném ze 16 vzorků plně neodpovídal množství uvedenému na etiketě. Životaschopné bakterie nebyly detekovány v 11,53 % testovaných vzorků a 7,69 % obsahovalo pouze minimální množství (10^2 KTJ/g). Další studie zkoumala probiotické doplňky stravy na italském a evropském trhu opět z hlediska množství životaschopných buněk. Všechny označené druhy v deklarovaném množství obsahovalo 14 z 24 produktů. Nevyhovělo 10 z 24 vzorků a u čtyřech z nich dokonce nebyla nalezena žádná životaschopná kolonie (Toscano et al. 2013).

Jak zdůrazňuje Hill a kol. (Hill et al. 2016), na správné probiotické nomenklatuře záleží, proto se i tato práce věnovala správnosti deklarovaného názvu probiotických druhů na probiotických doplňcích stravy. Správnost všech deklarovaných druhů splnil pouze 1 z 10 vzorků. Konkrétně se jedná o vzorek č. 10. U všech ostatních vzorků byl název špatně deklarován minimálně u dvou druhů.

Kromě špatně deklarovaného názvu probiotických bakterií na probiotických doplňcích stravy, se i ve vědeckých databázích bohužel stále vyskytují příklady nepřesné nomenklatury nebo neúplného taxonomického popisu probiotických kmenů (Hill et al. 2016). Tuto skutečnost potvrzuje i článek od Han a kol. (2015). Zde jsou mikroorganismy označeny jako „*Lactobacillus subtilis*“ a „*Streptococcus faecium*“. „*Streptococcus faecium*“ je nomenklatura, která je stará již desítky let. Pravděpodobně se jedná spíše o druh *Enterococcus faecium*. Neexistuje žádný mikroorganismus s názvem *Lactobacillus subtilis*. Autoři článku pravděpodobně používají tento název omylem jako nesprávné označení pro *Bacillus subtilis* (Hill et al. 2016).

Hlavní část práce je zaměřena na vliv postupu přípravy ředících médií na stanovené počty laktobacilů, bifidobakterií a celkového počtu anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií ve vzorcích probiotických doplňků stravy a stolice dospělých dobrovolníků. Byly připraveny 3 varianty ředících řad: vyvaření, potravinářský CO₂ a čistý CO₂. Předpokládalo se, že postup

přípravy ředícího média nebude mít téměř žádný vliv na laktobacily, protože se jedná o fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní mikroorganismy a jejich citlivost ke kyslíku není velká (Mayo et al. 2010). Naopak u bifidobakterií se očekával alespoň určitý vliv, neboť jsou to striktně anaerobní mikroorganismy (Biavati & Mattarelli 2015). Výsledky neposkytly žádné přesvědčivé důkazy o tom, že by jakákoliv z variant měla výraznější vliv na stanovené počty laktobacilů nebo bifidobakterií jak u probiotických doplňků stravy, tak u vzorků stolice. U doplňků stravy byly v průměru stanoveny nejvyšší počty laktobacilů u varianty vyvaření. Výsledky se ale od ostatních počtů statisticky významně nelišily. U bifidobakterií byly zaznamenány nejvyšší průměrné počty u varianty potravinářský CO₂ a nejnižší průměrné počty byly u varianty čistý CO₂, jako tomu bylo u laktobacilů. Výsledky opět neukázaly statisticky významné rozdíly. U laktobacilů je tento výsledek víceméně pochopitelný, neboť laktobacily nejsou striktně anaerobní (Mayo et al. 2010). Nelze tudíž očekávat, že příprava ředící řady bude mít na jejich růst významný vliv. U bifidobakterií, které byly stanoveny v probiotických doplňcích stravy, lze dosažené výsledky vysvětlit tím, že u probiotických výrobků se selektují kmeny, které jsou více odolné vůči kyslíku (Kullisaar et al. 2002). Kyslík je jeden z nejdůležitějších technologických faktorů, který ovlivňuje životaschopnost bakterií při výrobě probiotik (Lee & O'Sullivan 2010). Tento fakt, by také mohl vysvětlit, proč byly nejnižší počty bifidobakterií paradoxně stanoveny u varianty čistý CO₂. Dá se očekávat, že u kmenů, které jsou v trávicím traktu, bude citlivost ke kyslíku větší. Bifidobakterie, které byly stanoveny ve vzorcích stolice, tuto teorii potvrdily. V porovnání s bifidobakteriemi z probiotických doplňků stravy byly opravdu stanoveny nejvyšší počty, ale ne statisticky významně, právě u varianty čistý CO₂. Na druhou stranu, u celkových počtů mikroorganismů stanovených ve vzorcích stolice, u kterých se opět předpokládá, že budou vůči kyslíku méně rezistentní, byly nejvyšší počty naopak u varianty vyvaření. Výsledky však ani u CPM nebyly statisticky průkazné. Výsledky z celkového hlediska ukázaly, že způsob přípravy ředících médií nemá vliv na stanovené počty bakterií ani v probiotických doplňcích stravy ani ve vzorcích stolice. Tudíž byla tato hypotéza zamítnuta.

Mikroorganismy, jež obývají lidské střevo, se vyznačují převážně anaerobními či mikroaerofilními vlastnostmi, což znamená, že vyžadují prostředí s minimálním nebo žádným obsahem kyslíku (Talwalkar & Kailasapathy 2004). Mezi tyto mikroorganismy patří mimo jiné i bifidobakterie. Kyslík má na buňky těchto mikroorganismů devastující vliv jinak označovaný jako "kyslíková toxicita" (Talwalkar & Kailasapathy 2004). Aby nedošlo k buněčné smrti, disponují některé z těchto mikroorganismů enzymy jako jsou NADH oxidáza a NADH peroxidáza, které vychytávají kyslík z prostředí (Condon 1987). Aktivita NADH oxidáz vede ke vzniku peroxidu vodíku, což podněcuje NADH peroxidázy k vychytání H₂O₂ a zabránění již zmíněné buněčné smrti (Shimamura et al. 1992). I když jsou bifidobakterie obecně popisovány jako striktní anaeroby, některé z nich mohou tolerovat určité množství kyslíku a jejich citlivost vůči kyslíku se mění v závislosti na druhu či kmeni (Kawasaki et al. 2006; Biavati & Mattarelli 2015). Mezi bifidobakterie, které omezeně rostou v přítomnosti kyslíku, za předpokladu,

že atmosféra obsahuje zvýšené množství CO₂, patří *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*, *Bifidobacterium thermophilum* a *Bifidobacterium longum* subsp. *suis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium mongoliense*, *Bifidobacterium psychraerophilum* a *Bifidobacterium tsurumiense*. Na rozdílnou citlivost kmenů bifidobakterií poukazuje i studie od Bulduc a kol. (2006). Byly vybrány kmeny bifidobakterií (*B. bifidum* KYO, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. longum* ssp. *longum* Rosell-R023, *B. longum* ssp. *longum* 411 BBL, *B. longum* ssp. *longum* ATCC 15708, *B. breve* ATCC 15700, *B. longum* ssp. *infantis* ATCC 15697 a *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140), které byly naočkovány do klasického mléka (aerobní prostředí) a do mléka zbaveného kyslíku (anaerobní prostředí). Bylo zjištěno, že stanovené počty kmene *B. longum* ssp. *longum* ATCC 15708 se ve variantách aerobní a anaerobní prostředí statisticky významně lišily, na rozdíl od kmenů *B. longum* ssp. *longum* Rosell-R023, *B. longum* ssp. *longum* 411 BBL, kde žádný statisticky významný rozdíl ve stanovených počtech nebyl zaznamenán. Počty u kmene *B. longum* ssp. *longum* ATCC 15708 byly statisticky významně vyšší u anaerobního prostředí. Statisticky významné rozdíly mezi aerobním a anaerobním prostředím byly stanoveny i u kmenů *B. longum* ssp. *infantis* ATCC 15697, *B. breve* ATCC 15700, kde byly opět statisticky významně vyšší počty u anaerobního prostředí. U zbylých kmenů nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi aerobním a anaerobním prostředím.

Mnoho dalších studií, které se zabývaly vlivem ředícího média na životaschopnost probiotických bakterií, dospělo k podobným závěrům jako tato diplomová práce. Ve studii provedené Champagne a kol. (2010) byly buňky *Lactobacillus rhamnosus* R0011 a *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* ATCC 15708 po vytvoření ředící řady ponechány 30 minut v ředícím médiu a až po této době byly nanášeny na misky a přelévány kultivačním médiem. V ředícím médiu nebyly nijak zajištěny anaerobní podmínky. Ředící médium bylo pouze sterilizováno při 121 °C po dobu 10 minut. Bylo zjištěno, že ponechání *L. rhamnosus* R0011 a *B. longum* ssp. *longum* ATCC 15708 o 30 minut déle v ředícím médiu nemá vliv na stanovené počty. V jiné studii byl zjišťován vliv kyslíku o různé koncentraci na růst kmenů *B. bifidum* JCM1255, *B. breve* JCM1192, *B. longum* ssp. *infantis* JCM1222 a *B. longum* ssp. *longum* JCM1217. Tyto kmeny se často používají v mléčných výrobcích a probiotických doplňcích stravy. Byla připravena média, která byla probublána čistým N₂, hermeticky uzavřena a umístěna do autoklávu. Poté byl do médií přidán sterilní O₂ o koncentracích 0 %, 5 %, 10 %, 20 % a výše zmíněné bakteriální kmeny. Bylo zjištěno, že kmeny *B. longum* ssp. *infantis* JCM1222 a *B. longum* ssp. *longum* JCM1217 v médiích s přítomností kyslíku nerostly. Naopak kmeny *B. bifidum* JCM1255 a *B. longum* ssp. *longum* JCM1217 přestaly růst při koncentraci kyslíku 10 %, ale je zajímavé, že nejvíce rostly při koncentraci kyslíku 5 %, přitom největší růst byl očekáván v médiích bez kyslíku (Kawasaki et al. 2006).

Bakterie kmenů Firmicutes a Bacteroides jsou nejvíce zastoupené mikroorganismy v lidské střevní mikrobiotě. Důležitou součástí je i kmen Actinobacterie, který zahrnuje rod *Bifidobacterium* (Collado et al., 2012; Breban, 2016). Kmen Firmicutes zahrnuje například

čeled' Lactobacillaceae, rod *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Eubacteria* a kmen *Bacteroides* zahrnuje mimo jiné rod *Porphyromonas* a *Prevotella*. Některé druhy a kmeny těchto bakterií jsou fakultativně anaerobní. Tento fakt by také mohl vysvětlit, proč nejvyšší, ale ne statisticky významně nejvyšší, průměrně počty CPM byly u varianty vyvaření. Na odolnost klostridií, které spadají do řádu *Firmicutes*, vůči kyslíku se zaměřila i nedávná studie od Boekhoud a kol. (2020). Vzhledem k jejich striktně anaerobnímu životnímu stylu je pro klostridie přítomnost kyslíku značným stresem (Paredes et al. 2005). Nicméně studie od Boekhoud a kol. (2020) naznačuje, že tyto bakterie mají vyšší schopnost adaptace na kyslík, než se původně předpokládalo u bakterií vyžadujících úplný nedostatek kyslíku pro život. Tato adaptace je způsobena jejich schopností zachytávat, detoxikovat a zužitkovávat kyslík. Po vystavení kyslíku mění klostridie svůj hlavní metabolický proces na proces vedlejší, který je méně citlivý ke kyslíku, a aktivují geny kódující enzymy podílející se na redukci kyslíku a opravě oxidovaných poškozených molekul.

Použití probiotik je přirozený způsob, jak obnovit zdravou střevní rovnováhu (Langella et al. 2019). Probiotika se užívají buď preventivně, anebo za účelem zlepšení střevní rovnováhy po jejím narušení, které nastává nejčastěji po antibiotické léčbě, při průjmu nebo zácpě (Sanders et al., 2018). Probiotické doplňky stravy velmi často obsahují vysoké počty laktobacilů, je to také z toho důvodu, že se s nimi relativně jednoduše pracuje (Fenster et al. 2019). Zjištěné počty laktobacilů stanovených ve vzorcích stolice nejsou nijak zásadně vysoké, což je běžné. Laktobacily se ve stolici dospělých lidí obvykle pohybují v rozmezí 1–2 % z celkového množství střevní mikrobioty (Heilig et al. 2002; Riaz Rajoka et al. 2017). Pokud je tedy doporučováno suplementovat ty mikroorganismy, které jsou přirozenou součástí střevní mikrobioty (Langella et al. 2019), tak současné probiotické doplňky stravy tuto skutečnost často nereflektují. V trávicím traktu se nejčastěji vyskytují rody *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Proteus*, *Clostridium* (Plaza-Diaz et al., 2019) a v probiotických doplňcích stravy se nejčastěji vyskytují kvasinky *Saccharomyces boulardii*, bakterie mléčného kvašení (bakterie čeledi *Lactobacillaceae*, a rody *Streptococcus*, *Lactococcus* aj.) nebo bakterie rodu *Bifidobacterium* (Binda et al. 2020). Větší počty laktobacilů v probiotických doplňcích stravy rozhodně nepředstavují žádné riziko, avšak vyvstává otázka, zda je skutečně nutné doplňovat probiotika preventivně ve formě potravinových doplňků, nebo by bylo prospěšnější podporovat střevní mikrobiotu prostřednictvím správné životosprávy. To znamená zaměřit se na dostatečný příjem prebiotik. Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, která podporují růst prospěšných mikroorganismů v lidské střevní mikrobiotě. Aby se nestravitelná složka potravy mohla označit jako prebiotikum, musí projít nezměněně horní částí trávicího traktu až do střev, kde ji využijí mikroorganismy s prospěšnými účinky na zdraví. Prebiotické látky jsou především obsaženy v rostlinné stravě, často ve formě oligosacharidů. Oligosacharidy jsou chemické látky neboli polymery, které se skládají z 2 až 10 cukerných jednotek. Mezi nejznámější a nejčastěji využívané patří fruktooligosacharidy (FOS), tvořené fruktózou, a galaktooligosacharidy

(GOS), obsahující galaktózové jednotky. Další oligosacharidy, které jsou považovány za prebiotika, jsou například rezistentní škrob, xylooligosacharidy, arabinooligosacharidy, ale i synteticky vyráběné laktulóza, polydextróza, izomaltooligosacharidy a další (Pandey et al. 2015). Dále je také dobré zaměřit se na pravidelný příjem kysaných mléčných výrobků, které jsou mnohem méně finančně náročné než probiotické doplňky stravy, a zařadit jakoukoli pravidelnou pohybovou aktivitu (Hasan & Yang 2019). Jak již bylo zmíněno výše, probiotika je ale určitě vhodné suplementovat například po antibiotické léčbě. Tuto skutečnost potvrdila i studie od Madden a kol. (2005). Tato pilotní dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná klinická studie analyzovala chování střevní mikrobioty u 30 pacientů s infekcí *Helicobacter pylori* v reakci na probiotický doplněk obsahující *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* během sedmidenní antibiotické léčby. Pacienti byli rozděleni do tří skupin: skupina I obdržela placebo v období od 1. do 15. dne, skupina II byla placebem léčena od 1. do 7. dne a od 8. do 15. dne byla léčena probiotiky, zatímco skupině III byla podávána probiotika po celou dobu studie (od 1. do 15. dne). Výsledky ukázaly, že u pacientů ve skupinách I a II docházelo mezi dny 1 a 7 k významnému nárůstu počtu fakultativních anaerobů. Ve skupině I se tento nárůst udržel až do dne 27, avšak ve skupině II došlo mezi dny 7 a 27 k výraznému poklesu počtu fakultativních anaerobů zpět na výchozí hodnotu. U pacientů ve skupině III populace fakultativních anaerobů zůstala stabilní po celou dobu studie. Celkový počet anaerobů se ve skupině I významně zvýšil k 27. dni oproti výchozí hodnotě, ve skupině II se nezměnil a ve skupině III došlo mezi dny 1 a 7 k významnému poklesu, který se však do 27. dne vrátil na výchozí hodnotu. Z těchto výsledků lze vidět, že probiotická suplementace pozitivně moduluje střevní mikrobiotu po antibiotické léčbě.

7 Závěr

- Probiotické doplňky stravy s blížícím se datem expirace nesplňují deklarované počty mikroorganismů. Naopak, téměř všechny probiotické doplňky stravy, které byly na začátku doby trvanlivosti splňují deklarované počty mikroorganismů.
- Správnost deklarovaných názvů mikroorganismů na obalech probiotických doplňků stravy splnil jen jeden výrobce.
- Je nezbytné zajistit přísnější kontroly probiotických doplňků stravy dodávaných na trh, aby nedocházelo ke klamání spotřebitele.
- Je zapotřebí hledat účinné metody umožňující spolehlivou identifikaci a detekci jednotlivých mikroorganismů přítomných v probiotických doplňcích stravy.
- Postupy přípravy ředících médií testované v této práci neměly vliv na stanovené počty anaerobních mikroorganismů ve vzorcích probiotických doplňků stravy a stolice dospělých dobrovolníků.
- Jako nejlepší postup byl vyhodnocen postup technicky a časově nejméně náročný, tedy odstranění kyslíku média vyvařením.

8 Literatura

- Abe F, Miyauchi H, Uchijima A, Yaeshima T, Iwatsuki K. 2009. Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *International Journal of Dairy Technology* **62** (2):234–239.
- Akbaba M, Gökmen GG, Kışla D, Nalbantsoy A. 2022. In vivo investigation of supportive immunotherapeutic combination of *Bifidobacterium infantis* 35624 and doxorubicin in murine breast cancer. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **1**:1–9.
- Almeida D, Machado D, Andrade JC, Mendo S, Gomes AM, Freitas AC. 2020. Evolving trends in next-generation probiotics: a 5W1H perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **60** (11):1783–1796.
- Alonso BL, Irigoyen von Sierakowski A, Sáez Nieto JA, Rosel AB. 2017. First report of human infection by *Christensenella minuta*, a gram-negative, strictly anaerobic rod that inhabits the human intestine. *Anaerobe* **44**:124–125.
- Belzer C, Chia LW, Aalvink S, Chamlagain B, Piironen V, Knol J, Vos WM. 2017. Microbial metabolic networks at the mucus layer lead to diet-independent butyrate and vitamin B12 production by intestinal symbionts. *mBio* **8** (5) (e00770-17) DOI: 10.1128/MBIO.00770-17.
- Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* **54** (9):2325–2340.
- Biavati B, Mattarelli P. 2015. *Bifidobacterium*. Pages 1–57 in Trujillo ME, Dedysh S, DeVos P, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey FA, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Hoboken, New Jersey.
- Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders, ME, Tremblay A, Ouwehand AC. 2020. Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements. *Frontiers in Microbiology* **11**:1662.
- Boekhoud IM, Michel AM, Corver J, Jahn D, Smits WK. 2020. Redefining the *Clostridioides difficile* σ B Regulon: σ B Activates Genes Involved in Detoxifying Radicals That Can Result from the Exposure to Antimicrobials and Hydrogen Peroxide . *MSphere* **5** (5).
- Bolduc MP, Raymond Y, Fustier P, Champagne CP, Vuilleumard JC. 2006. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *International Dairy Journal* **16** (9):1038–1048.
- Bonfrate L, di Palo DM, Celano G, Albert A, Vitellio P, de Angelis M, Gobbetti M, Portincasa P. 2020. Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in IBS patients. *European Journal of Clinical Investigation* **50** (3) (e13201) DOI: 10.1111/EJI.13201.
- Bottacini F, van Sinderen D, Ventura M. 2017. Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *Biochemical Journal* **474** (24):4137–4152.
- Breban M. 2016. Gut microbiota and inflammatory joint diseases. *Joint Bone Spine* **83** (6):645–649.

- Broeckx G, Vandenhoevel D, Claes IJJ, Lebeer S, Kiekens F. 2016. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics* **505** (1–2):303–318.
- Bunesova V, Lacroix C, Schwab C. 2018. Mucin cross-Feeding of infant *Bifidobacteria* and *Eubacterium hallii*. *Microbial Ecology* **75** (1):228–238.
- Bunesova V, Musilova S, Geigerova M, Pechar R, Rada V. 2015. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *Journal of Microbiological Methods* **109**:106–109.
- Călinoiu LF, Vodnar DC, Precup G, 2016. The probiotic bacteria viability under different conditions. *Bulletin UASVM Food Science and Technology* **73**:55-60.
- Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. 2014. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64** (1):60–65.
- Carlier JP, Bedora-Faure M, K'ouas G, Alauzet C, Mory F. 2010. Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Séguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov., and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60** (3):585–590.
- Cassir N, Benamar S, la Scola B. 2016. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* **22** (1):37–45.
- Champagne CP, Raymond Y, Tompkins TA. 2010. The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. *Food Microbiology* **27** (8):1104–1111.
- Collado MC, Cernada M, Bäuerl C, Vento M, Pérez-Martínez G. 2012. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* **3** (4).
- Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews* **3** (3):269–280.
- Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. 2020. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International* **136**:109502.
- ČSN ISO 7889. 2004. Jogurt – Stanovení počtu charakteristických mikroorganismů – Technika stanovení počtu kolonií při 37 °C. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 9232. 2004. Jogurt – Identifikace charakteristických mikroorganismů - (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*). Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 20128. 2007. Mléčné výrobky – Stanovení počtu presumptivního *Lactobacillus acidophilus* na selektivní živné půdě – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 37 °C. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 29981. 2010. Mléčné výrobky – Stanovení počtu presumptivních bifidobakterií – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 37 °C. Český normalizační institut, Praha.

- Din AU, Hassan A, Zhu Y, Zhang K, Wang Y, Li T, Wang Y, Wang G. 2020. Inhibitory effect of *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 on colitis and its mechanism. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **79**:108353.
- Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS, Flint HJ. 2002. *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52** (5):1615–1620.
- Engels C, Ruscheweyh HJ, Beerenwinkel N, Lacroix C, Schwab C. 2016. The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. *Frontiers in Microbiology* **7**:713.
- Erturk-Hasdemir D, Kasper DL. 2018. Finding a needle in a haystack: *Bacteroides fragilis* polysaccharide A as the archetypical symbiosis factor. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1417** (1):116–129.
- Esteban-Fernández A, Ferrer MD, Zorraquín-Peña I, López-López A, Moreno-Arribas MV, Mira A. 2019. In vitro beneficial effects of *Streptococcus dentisani* as potential oral probiotic for periodontal diseases. *Journal of Periodontology* **90** (11):1346–1355.
- Everard A, et al. 2013. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110** (22):9066–9071.
- Evropský parlament, Rada Evropské unie. 2018. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 ze dne 25. listopadu 2015 o nových potravinách, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97 a nařízení Komise (ES) č. 1852/2001. Úřední věstník Evropské unie, Štrasburk.
- Evropský parlament, Rada Evropské unie. 2006. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. Úřední věstník Evropské unie, Brusel.
- Evropský parlament, Rada Evropské unie. 2002. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES ze dne 10. června 2002 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se doplňků stravy. Úřední věstník Evropské unie, Lucembursko.
- Farida E, Nuraida L, Giriwono PE, Jenie BSL. 2020. Lactobacillus rhamnosus Reduces Blood Glucose Level through Downregulation of Gluconeogenesis Gene Expression in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Food Science*.
- Fekry MI, Engels C, Zhang J, Schwab C, Lacroix C, Sturla SJ, Chassard C. 2016. The strict anaerobic gut microbe *Eubacterium hallii* transforms the carcinogenic dietary heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Environmental Microbiology Reports* **8** (2):201–209.
- Fenster K, Freeburg B, Hollard C, Wong C, Laursen RR, Ouwehand AC. 2019. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms* **7** (3):83

- Ferreira-Halder CV, Faria AV de S, Andrade SS. 2017. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **31** (6):643–648.
- Fonseca F, Cenard S, Passot S. 2015. Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods in Molecular Biology* **1257**:477–488.
- Forssten SD, Sindelar CW, Ouwehand AC. 2011. Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe* **17** (6):410–413.
- Han SH, Suk KT, Kim DJ, Kim MY, Baik SK, Kim YD, Cheon GJ, Choi DH, Ham YL, Shin DH, Kim EJ. 2015. Effects of probiotics (cultured *Lactobacillus subtilis*/ *Streptococcus faecium*) in the treatment of alcoholic hepatitis: Randomized-controlled multicenter study. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **27** (11):1300–1306.
- Hasan N, Yang H. 2019. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* **8** (e7502) DOI: 10.7717/PEERJ.7502/FIG-3.
- Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL, De Vos WM. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (1):114–123.
- Hiippala K, Jouhten H, Ronkainen A, Hartikainen A, Kainulainen V, Jalanka J, Satokari R. 2018. The potential of gut commensals in reinforcing intestinal barrier function and alleviating inflammation. *Nutrients* **10** (8):988.
- Hill C, et al. 2014. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **11** (8):506–514.
- Hill C, Scott K, Klaenhammer TR, Quigley E, Sanders ME. 2016. Probiotic nomenclature matters. *Gut Microbes* **7** (1):1–2.
- Ho YT, Tsai YC, Kuo TBJ, Yang CC. H. 2021. Effects of *Lactobacillus plantarum* ps128 on depressive symptoms and sleep quality in self-reported insomniacs: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial *Nutrients* **13** (8):2820.
- Hoffman FA, Heimbach JT, Sanders ME, Hibberd PL. 2008. Executive summary: scientific and regulatory challenges of development of probiotics as foods and drugs. *Clinical Infectious Diseases* **46** (2):53–57.
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. 2004. Probiotics. *Best practice & research clinical gastroenterology* **18** (2):299–313.
- Jackson SA, Schoeni JL, Vegge C, Pane M, Stahl B, Bradley M, Goldman VS, Burguière P, Atwater JB, Sanders ME. 2019. Improving end-user trust in the quality of commercial probiotic products. *Frontiers in Microbiology* **10**:448777.
- Kanmani P, Clua P, Vizoso-Pinto MG, Rodriguez C, Alvarez S, Melnikov V, Takahashi H, Kitazawa H, Villena J. 2017. Respiratory commensal bacteria *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

- improves resistance of infant mice to respiratory syncytial virus and *Streptococcus pneumoniae* superinfection. *Frontiers in Microbiology* **8**:1613.
- Kawasaki S, Mimura T, Satoh T, Takeda K, Niimura Y. 2006. Response of the microaerophilic Bifidobacterium species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (10):6854–6858.
- Kim E, Yang SM, Lim B, Park SH, Rackerby B, Kim HY. 2020. Design of PCR assays to specifically detect and identify 37 Lactobacillus species in a single 96 well plate. *BMC Microbiology* **20** (1):1–14.
- Kobayashi Y, Kuhara T, Oki M, Xiao JZ. 2019. Effects of *Bifidobacterium breve* A1 on the cognitive function of older adults with memory complaints: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Beneficial Microbes* **10** (5):511–520.
- Kobayashi Y, Sugahara H, Shimada K, Mitsuyama E, Kuhara T, Yasuoka A, Kondo T, Abe K, Xiao JZ. 2017. Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer’s disease. *Scientific Reports* **7** (1):1–10.
- Kolaček S, Hojsak I, Berni Canani R, Guarino A, Indrio F, Orel R, Pot B, Shamir R, Szajewska H, Vandenas Y, Van Goudoever J, Weizman Z. 2017. Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **65** (1):117–124.
- Kropp C, le Corf K, Relizani K, Tambosco K, Martinez C, Chain F, Rawadi G, Langella P, Claus SP, Martin R. 2021. The keystone commensal bacterium *Christensenella minuta* DSM 22607 displays anti-inflammatory properties both in vitro and in vivo. *Scientific Reports* **11** (1):1–12.
- Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A. 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **72** (3):215–224.
- Lai CH, Wu SR, Pang JC, Ramireddy L, Chiang YC, Lin CK, Tsen HY. 2017. Designing primers and evaluation of the efficiency of propidium monoazide – Quantitative polymerase chain reaction for counting the viable cells of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus salivarius*. *Journal of Food and Drug Analysis* **25** (3):533–542.
- Lai HC, Lin TL, Chen TW, Kuo YL, Chang CJ, Wu TR, Shu CC, Tsai YH, Swift S, Lu CC. 2022. Gut microbiota modulates COPD pathogenesis: role of anti-inflammatory *Parabacteroides goldsteinii* lipopolysaccharide. *Gut* **71** (2):309–321.
- Langella P, Guarner F, Martín R. 2019. Editorial: Next-generation probiotics: from commensal bacteria to novel drugs and food supplements. *Frontiers in Microbiology* **10**:1973.
- Lee JH & O’Sullivan DJ. 2010. Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74** (3):378–416.
- Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A. 2016. *Akkermansia muciniphila* protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in apoe^{-/-} mice. *Circulation* **133** (24):2434–2446.

- Li S, Wang C, Zhang C, Luo Y, Cheng Q, Yu L, Sun Z. 2021. Evaluation of the effects of different *Bacteroides vulgatus* strains against DSS-induced colitis. *Journal of Immunology Research* (e9117805) DOI: 10.1155/2021/9117805.
- López-López A, Camelo-Castillo A, Ferrer MD, Simon-Soro Á, Mira A. 2017. Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: the case of *Streptococcus dentisani*. *Frontiers in Microbiology* **8**:379.
- Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. 2017. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *The ISME Journal* **11** (4):841–852.
- Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D, Sabat-Mir M, Duncan SH, Flint HJ, Aldeguer X, Garcia-Gil LJ. 2014. Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co-abundance can distinguish IBS and IBD phenotypes. *International Journal of Medical Microbiology* **304** (3–4):464–475.
- Luo W, et al. 2019. *Roseburia intestinalis* supernatant ameliorates colitis induced in mice by regulating the immune response. *Molecular Medicine Reports* **20** (2):1007–1016.
- Lynch SV, Pedersen O. 2016. The human intestinal microbiome in health and disease. *New England Journal of Medicine* **375** (24):2369–2379.
- Madden JAJ, Plummer SF, Tang J, Garaiova I, Plummer NT, Herbison M, Hunter JO, Shimada T, Cheng L, Shirakawa T. 2005. Effect of probiotics on preventing disruption of the intestinal microflora following antibiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled pilot study. *International Immunopharmacology* **5** (6):1091–1097.
- Marinova VY, Rasheva IK, Kizheva YK, Dermenzhieva YD, Hristova PK. 2019. Microbiological quality of probiotic dietary supplements. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **33** (1):834–841.
- Markowiak P, Ślizewska K. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* **9** (9):1021.
- Martín R, et al. 2017. Functional characterization of novel *Faecalibacterium prausnitzii* strains isolated from healthy volunteers: a step forward in the use of *F. prausnitzii* as a next-generation probiotic. *Frontiers in Microbiology* **8**:1226.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., & Bardowski, J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 3–33.
- Mazier W, et al. 2021. A new strain of *Christensenella minuta* as a potential biotherapy for obesity and associated metabolic diseases. *Cells* **10** (4):823.
- Mihailović M, et al. 2017. Oral administration of probiotic *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 attenuates diabetes-induced liver and kidney damage in rats. *Journal of Functional Foods* **38**:427–437.

- Mikami A, Ogita T, Namai F, Shigemori S, Sato T, Shimosato T. 2020. Oral administration of *Flavonifractor plautii* attenuates inflammatory responses in obese adipose tissue. *Molecular Biology Reports* **47**(9): 6717–6725.
- Mikami A, Ogita T, Namai F, Shigemori S, Sato T, Shimosato T. 2021. Oral administration of *Flavonifractor plautii*, a bacteria increased with green tea consumption, promotes recovery from acute colitis in mice via suppression of IL-17. *Frontiers in Nutrition* **7**:376.
- Miyaoka T, et al. 2018. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 as adjunctive therapy for treatment-resistant major depressive disorder: a prospective open-label trial. *Clinical Neuropharmacology* **41** (5):151–155.
- Morotomi M, Nagai F, Watanabe Y. 2011. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order *Clostridiales*, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62** (1):144–149.
- Net MESM, Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol* **11**:506–514.
- Nikolic M, López P, Strahinic I, Suárez A, Kojic M, Fernández-García M, Topisirovic L, Golic N, Ruas-Madiedo P. 2012. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **158** (2):155–162.
- Nishida S, Ishii M, Nishiyama Y, Abe S, Ono Y, Sekimizu K. 2017. *Lactobacillus paraplantarum* 11-1 isolated from rice bran pickles activated innate immunity and improved survival in a silkworm bacterial infection model. *Frontiers in Microbiology* **8**:436.
- Okubo R, et al. 2019. Effect of *Bifidobacterium breve* A-1 on anxiety and depressive symptoms in schizophrenia: a proof-of-concept study. *Journal of Affective Disorders* **245**:377–385.
- O’Toole PW, Marchesi JR, Hill C. 2017. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Microbiology* **2** (5):1–6.
- Ottman N, Geerlings SY, Aalvink S, de Vos WM, Belzer C. 2017. Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **31** (6):637–642.
- Ouwerkerk JP, van der Ark KCH, Davids M, Claassens NJ, Finestra TR, de Vos WM, Belzer C. 2016. Adaptation of *Akkermansia muciniphila* to the oxic-anoxic interface of the mucus layer. *Applied and Environmental Microbiology* **82** (23):6983-6993.
- Ozdamar T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. 2016. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* **8** (2):78.
- Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology* **52** (12):7577–7587.

- Paredes CJ, Alsaker KV, Papoutsakis ET. 2005. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology* **3** (12):969–978.
- Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition* **10** (1):49–66.
- Plovier H, 2016. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine* **23** (1):107–113.
- Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C, Tomaro-Duchesneau C, Coussa-Charley R. 2011. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: Targets and Therapy* **5**:71-86.
- Riaz Rajoka MS, Shi J, Mehwish HM, Zhu J, Li Q, Shao D, Huang Q, Yang H. 2017. Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Science and Human Wellness* **6** (3):121–130.
- Saarela MH. 2019. Safety aspects of next generation probiotics. *Current Opinion in Food Science* **30**:8–13.
- Sakkas H, Bozidis P, Touzios C, Kolios D, Athanasiou G, Athanasopoulou E, Gerou I, Gartzonika C. 2020. Nutritional status and the influence of the vegan diet on the gut microbiota and human health. *Medicina* **56** (2):88.
- Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. 2018. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin* **43** (3):212–225.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology* **105** (1):1–13.
- Sbírka zákonů České republiky. 1997. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Česká republika.
- Sbírka zákonů České republiky. 2007. Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. Česká republika.
- Sbírka zákonů České republiky. 2018. Vyhláška č. 58/2018 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. Sbírka zákonů České republiky. Česká republika.
- Schellekens H, et al. 2021. *Bifidobacterium longum* counters the effects of obesity: partial successful translation from rodent to human. *eBioMedicine* **63**:103176.
- Schultz M, Göttl C, Young RJ, Iwen P, Vanderhoof JA. 2004. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **38** (3):293–297. <https://doi.org/10.1097/00005176-200403000-00012>
- Seo M, Inoue I, Tanaka M, Matsuda N, Nakano T, Awata T, Katayama S, Alpers DH, Komoda T. 2013. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 improves high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Digestive Diseases and Sciences* **58** (12):3534–3544.
- Seth EC & Taga ME. 2014. Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Frontiers in Microbiology* **5**:103649.

- Shen Z, Zhu C, Quan Y, Yang J, Yuan W, Yang Z, Wu S, Luo W, Tan B, Wang X. 2018. Insights into *Roseburia intestinalis* which alleviates experimental colitis pathology by inducing anti-inflammatory responses. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **33** (10):1751–1760.
- Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M. 1992. Relationship Between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of Bifidobacterium Species. *Journal of Dairy Science* **75** (12):3296–3306.
- Sousa S, Gomes AM, Pintado MM, Malcata FX, Silva JP, Sousa JM, Costa P, Amaral MH, Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Freitas AC. 2012. Encapsulation of probiotic strains in plain or cysteine-supplemented alginate improves viability at storage below freezing temperatures. *Engineering in Life Sciences* **12** (4):457–465.
- Sousa S, Gomes AM, Pintado MM, Silva JP, Costa P, Amaral MH, Duarte AC, Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Freitas AC. 2015. Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and Bioprocess Processing* **93**:90–97.
- Sreeja V & Prajapati JB. 2013. Probiotic Formulations: Application and Status as Pharmaceuticals- A Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **5** (2):81–91.
- Stenman LK, Patterson E, Meunier J, Roman FJ, Lehtinen MJ. 2020. Strain specific stress-modulating effects of candidate probiotics: a systematic screening in a mouse model of chronic restraint stress. *Behavioural Brain Research* **379**:112376.
- Suková I. 2014. Označování potravin: průvodce pro spotřebitele. Praha: Ministerstvo zemědělství, Odbor bezpečnosti potravin. ISBN 978-80-7434-169-4.
- Špelina V, Winklerová D. 2009. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatrica pre praxi* **10** (6):315-318.
- Talwalkar A & Kailasapathy K. 2004. Úloha kyslíku v životaschopnosti probiotických bakterií s odkazem na *L. acidophilus* a *Bifidobacterium* spp. *Aktuální problémy střevní mikrobiologie* **5** (1):1-8.
- Tian P, O’Riordan KJ, Lee Y, Wang G, Zhao J, Zhang H, Cryan JF, Chen W. 2020. Towards a psychobiotic therapy for depression: *Bifidobacterium breve* CCFM1025 reverses chronic stress-induced depressive symptoms and gut microbial abnormalities in mice. *Neurobiology of Stress* **12**:100216.
- Toscano M, de Vecchi E, Rodighiero V, Drago L. 2013. Microbiological and genetic identification of some probiotics proposed for medical use in 2011. *Journal of Chemotherapy* **25**(3):156–16.
- Tuddenham S, Sears CL. 2015. The intestinal microbiome and health. *Current Opinion in Infectious Diseases* **28** (5):464.
- Udayappan S, et al. 2016. Oral treatment with *Eubacterium hallii* improves insulin sensitivity in db/db mice. *npj Biofilms and Microbiomes* **2** (1):1–10.
- Umbrello G, Esposito S. 2016. Microbiota and neurologic diseases: potential effects of probiotics. *Journal of Translational Medicine* **14** (1):1–11.

- Venema K, do Carmo AP. 2015. Probiotics and Prebiotics: Current research a future trends. Beneficial Microbes Consultancy, Wageningen.
- Wade WG. 2015. *Eubacterium*. Pages 1–36 in Trujillo ME, Dedysh S, DeVos P, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey FA, Whitman WB, editors. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Hoboken, New Jersey.
- Wieers G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, de Foy JMP, Dequenne I, de Timary P, Cani PD. 2020. How Probiotics Affect the Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 454.
- Williams NT. 2010. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* **67** (6):449–458.
- Woo TDH, Oka K, Takahashi M, Hojo F, Osaki A, Hanawa T, Kurata S, Yonezawa H, Kamiya S. 2011. Inhibition of the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain. *Journal of Medical Microbiology* **60** (11):1617–1625.
- Wu TR, Lin CS, Chang CJ, Lin TL, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Lu CC, Young JD, Lai HC. 2019. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis*. *Gut* **68** (2):248–262.
- Yang B, Huang Z, He Z, Yue Y, Zhou Y, Ross RP, Stanton C, Zhang H, Zhao J, Chen W. 2021. Protective effect of *Bifidobacterium bifidum* FSDJN7O5 and *Bifidobacterium breve* FHNFQ23M3 on diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Food & Function* **12** (16):7271–7282.
- Yoshida N, et al. 2018. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. *Circulation* **138** (22):2486–2498.
- Yuan S, Shen J. 2021. *Bacteroides vulgatus* diminishes colonic microbiota dysbiosis ameliorating lumbar bone loss in ovariectomized mice. *Bone* **142**:115710.
- Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L. 2013. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLOS ONE* **8** (e71108) DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0071108.
- Zhao X, Yang J, Wang L, Lin H, Sun S. 2017. Protection mechanism of *Clostridium butyricum* against *Salmonella enteritidis* infection in broilers. *Frontiers in Microbiology* **8**:1523.
- Zhou JS, Shu Q, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK, Gill HS. 2000. Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* **38** (2–3):153–161.