

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**SELEKTIVNÍ STANOVENÍ PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ  
V POTRAVINÁCH A POTRAVNÍCH DOPLŇCÍCH**

**Disertační práce**

**Autor:** Mgr. Radko Pechar

**Školitel:** prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

**Školitel specialista:** Ing. Jiří Killer, Ph.D.

**Praha 2018**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

V Praze dne 1. 8. 2018

.....

Autor

## **Poděkování**

V první řadě bych rád poděkoval kolektivu Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, kolegům, přátelům a spoluautorům publikací. Velký dík patří prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za přímý, pozitivní a ohleduplný přístup, rady, pomoc a důvěru. Ing. Jiřímu Killerovi, Ph.D. děkuji za výraznou odbornou i osobní komunikaci, přátelství, pomoc a cenné rady, a prof. Ing. Vojtěchovi Radovi, CSc. děkuji za přátelský i profesionální vztah, za možnost práce v jeho týmu, a také za konstruktivní pohled na anaerobní mikrobiologii. Ing. Jakubovi Mrázkovi, Ph.D. děkuji za mnohou odbornou radu i pomoc. Za porozumění děkuji vedení Výzkumného ústavu potravinářského Praha, v. v. i, mého stávajícího působiště. Rád bych také poděkoval těm, kteří mě učili biologii a pomáhali mi. V první řadě RNDr. Františce Lellákové, CSc., RNDr. Janovi Fottovi, CSc., doc. RNDr. Josefovi Chalupskému, CSc., prof. RNDr. Jaroslavovi Kuldovi, CSc., Ing. Vojtěchovi Zavadovi, CSc., prof. RNDr. Otovi Olivovi, CSc., prof. RNDr. Janovi Bucharovi, DrSc. a prof. RNDr. Bohumilovi Ryšavému, DrSc. Mgr. Vladimírovi Sychrovskému, Ph.D. děkuji za inspirativní diskuzi. Svým rodičům Miladě a Vladimírovi, ženě Haně Andrejcové a všem blízkým děkuji za všestrannou pomoc, neskutečnou trpělivost a toleranci.

## Obsah

1	Úvod .....	6
2	Současný stav problematiky .....	7
2.1	Probiotika .....	7
2.1.1	Koncepce a funkčnost probiotik .....	7
2.1.2	Mikrobiota trávicí soustavy a její skladba .....	10
2.1.3	Osídlení GIT mikrobiotou a vývoj jejího bakteriálního složení .....	12
2.1.4	Prebiotika – nástroj pro modulaci složení stávající mikrobioty .....	14
2.1.5	Probiotické bakterie .....	15
2.2	Selektivní stanovení a identifikace probiotických bakterií .....	22
2.2.1	Kultivační stanovení probiotik a jeho omezení .....	24
2.2.2	Metody stanovení a identifikace probiotik nezávislé na kultivaci.....	26
2.3	Kultivační stanovení bifidobakterií.....	29
2.3.1	Selektivní média pro stanovení bifidobakterií (bez mupirocinu) .....	31
2.3.2	Selektivní média s mupirocinem.....	34
2.3.3	Mucin jako možný selektivní faktor pro stanovení druhu <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	35
3	Hypotéza .....	39
4	Cíl práce.....	39
5	Publikované práce.....	40
5.1	Hodnocení probiotických výrobků Společností pro probiotika a prebiotika. Stanovení probiotických bakterií v potravinách a potravních doplňcích .....	40
5.2	Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements .....	45
5.3	Anticlostridial agent 8-hydroxyquinoline improves the isolation of faecal bifidobacteria on modified Wilkins-Chalgren agar with mupirocin.....	50
5.4	Mupirocin-mucin agar for selective enumeration of <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	57

6	Shrnutí výsledků a diskuze .....	61
7	Závěry a perspektivy.....	74
8	Seznam literatury .....	76
9	Seznam zkratk .....	95
10	Seznam tabulek a obrázků .....	98
11	Přílohy.....	100

## 1 Úvod

Zákaz plošné aplikace antibiotik ve výživě hospodářských zvířat, nové poznatky zejména z oblasti gastroenterologie a imunologie, a posléze také i výrazný nárůst zájmu populace o spektrum nesourodých témat označovaných jako *zdravý životní styl*, otevřely široký prostor pro výzkum mikrobioty trávicího traktu a tzv. probiotik. Na restriktce, motivované nezbytnou kontrolou vzniku rezistence bakterií vůči antibiotikům a logický posun priorit moderní společnosti, pochopitelně reagovala také komerční sféra a stále roste sortiment potravin a potravních doplňků, které obsahují živé probiotické kultury. Díky hlubšímu porozumění provázaných vztahů hostitelského organismu a jeho mikrobioty, jsou jako probiotika v současnosti, spolu s tradičními bakteriemi mléčného kvašení, intenzivně využívány bakterie, které jsou přirozenými rezidenty trávicího traktu hostitele. Ideálními mikroorganismy se z takového pohledu zdají být bifidobakterie.

Byl proto zhodnocen současný stav a tendence zájmu o probiotika a možnosti jejich selektivního stanovení v potravinách, potravních doplňcích a gastrointestinálním traktu hostitele. Pozornost byla dále zaměřena na probiotické bakteriální kmeny rodu *Bifidobacterium* a možnosti jejich selektivní detekce, zvláště pak pro obtížné analýzy gastrointestinálních vzorků. Byla testována stávající selektivní média vhodná ke stanovení bifidobakterií, a byly vyvinuty nové selektivní půdy: *modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s 8-hydroxychinolinem*, k eliminování (klostridiálních) kontaminací při stanovení bifidobakterií; a selektivní médium tzv. *mupirocin-mucin agar* pro stanovení humánního probiotického druhu *B. bifidum* v přítomnosti dalších probiotických bifidobakteriálních druhů, aplikovaných v probiotických potravinách a potravních doplňcích.

## 2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

### 2.1 Probiotika

#### 2.1.1 Koncepce a funkčnost probiotik

Podle Organizace pro výživu a zemědělství a Světové zdravotnické organizace (FAO/WHO, 2001) jsou probiotika *živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují zdravotní přínos pro hostitele*. Upravená definice pracovní skupiny odborníků označuje jako probiotika *živé mikroorganismy, jež jsou-li požívány v živém stavu a v dostatečném množství, vykazují pozitivní vliv na zdraví, překračující běžný výživový efekt* (Anadon at al., 2006). Již sama existence různých definic a fakt, že jsou takové nástroje k dispozici, vypovídá o „váze“ probiotik. Označit jako zdraví prospěšnou, otevřenou skupinu s neztetelnými hranicemi, a navíc živých mikroorganismů, je nepochybně pohyb na *tenkém ledě*. Opatrný postoj pochopitelně zaujímá i Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA, 2004). Různí autoři pracují také s více či méně odlišnými podobami oficiálnějších verzí definice: probiotika například pouze *mohou mít* zdravotní přínos, jsou-li *aplikována pravidelně* (Chaucheyras-Durand a Durand, 2010). Případně se uplatňuje stále živý názor, že termín probiotika nemusí zahrnovat pouze živé mikroorganismy, neboť pozitivní vliv na zdravotní stav příjemce vykazují nejen buňky neživé, ale také i konkrétní části jejich buněčných struktur (Ouwehand at al., 2002). Čistou podobu varianty s takovými kategoriemi formuloval na počátku sedmdesátých let minulého století Sperti (1971) a probiotika popsal jako *organismy a substance, které přispívají ke střevní mikrobiální rovnováze*. V roce 1989 pak Fuller rozsah zúžil a důraz kladl na aplikaci živých buněk mikroorganismů. Podle jeho definice jsou probiotika *živé mikrobiální krmné a potravní doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenózy* (Fuller, 1989). Dnes již půl století trvající diskuzi o hranicích obsahu pojmu dostala ovšem probiotika do vínků vlastně již s *rodným listem*. Termín použili poprvé v roce 1965 Lilly a Stillwell, ovšem v jiném kontextu: označili tak látku produkovanou jedním prvokem, která stimulovala růst prvoka jiného (Lilly a Stillwell, 1965). Posléze termín označoval krmné a potravní doplňky pro výživu: tedy živé kultury, mikrobiální metabolity, enzymy, aminokyseliny apod., a definice by zahrnovala i některá antibiotika.

V současné době mohou být probiotika vnímána také jako prostředek při profylaxi infekčních onemocnění. Melicherčíková (2015) je např. staví vedle antibiotik jako samostatnou funkční alternativu antiseptik (antivirotik a antiparazitik).

Mikroorganismy, označované jako probiotické, tedy prospěšné pro zdraví hostitele, musejí splňovat kritéria spojená s jejich bezpečnostními, funkčními a technologickými vlastnostmi. Mechanismus účinku probiotik je široký: jsou využívány různé mikroorganismy, příp. v různých kombinacích, a jejich účinek je závislý na aktuálním stavu příjemce. Podstatné jsou výsledné vlastnosti probiotik vyjadřující jejich efektivní účinky a použitelnost konkrétního probiotického produktu.

Podle *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* FAO/WHO (2002) musí být pro potvrzení zdravotních účinků mikroorganismů vždy vypracována klinická studie. Nezbytná je, v první řadě, identifikace potenciálního probiotika na úroveň rodu, druhu a kmene a jeho detailní fenotypová a genotypová charakterizace. Kmeny musejí být následně uloženy v mezinárodní sbírce mikroorganismů. Dále jsou testovány funkční charakteristiky pomocí *in vitro* testů (rezistence k nízkému pH a žlučovým solím), schopnost adherence na střevní buňky, či produkce specifických metabolitů. Zásadní je dále prokázat bezpečnost kultury (*in vitro* testy a pokusy na zvířatech): musejí být vyloučeny faktory patogenity (např. enteroinvazivita, produkce enterotoxinů), kmeny také nesmějí být nositeli genů zodpovědných za přenos antibiotické rezistence (Mathur a Singh, 2005), jakou je např. rezistence kódovaná plasmidy (Saarela et al., 2000). Pro humánní využití jsou nezbytné randomizované, dvojité zaslepené, placebem kontrolované aplikace lidským dobrovolníkům.

Další soubor nároků zohledňuje původ a funkční vlastnosti hodnocených mikroorganismů. Probiotika by se měla přirozeně vyskytovat v gastrointestinálním traktu (GIT) hostitele. Dodržení druhové specificity může být důležité i s ohledem na hostitelsky specifickou schopnost adheze mikroorganismu na střevní stěnu hostitelského GIT (Crociani et al., 1995; Zarate et al., 2002; Saarela et al., 2000; Laparra et al., 2009), a kmeny by měly být schopny alespoň dočasně kolonizovat GIT hostitele (*zde k zamyšlení*, pozn. autora). Probiotika by měla být izolována ze zdravých jedinců, ačkoliv tento logicky znějící požadavek zůstává z důvodu nesnadné identifikace původu některých mikroorganismů, např. tradičně používaných kmenů tzv. bakterií mléčného kvašení (BMK), k diskusi.



Důležitým faktorem ovlivňujícím funkčnost aplikovaného probiotika v GIT příjemce (hostitele) je také jeho dávka (Savard et al., 2011). Standardizovat její úroveň je však velmi obtížné, a přijatelnou tak zůstává formulace "adekvátní počty". Ty se sice mohou u každého probiotického bakteriálního kmene i jeho příjemce lišit (Verna a Lucak, 2010), přesto se však jako optimální jeví u člověka denní příjem  $10^9$  probiotických bakterií (Tannock, 2003).

Pokud jde o technologické vlastnosti, musejí být probiotické kmeny životaschopné v průběhu procesu výroby a stabilní v produktu během skladování. Nemají také nevhodně ovlivňovat organoleptické a technologické vlastnosti produktu (Donkor et al., 2006). Rozsahem kritérií hodnocení probiotických mikroorganismů a vymezením hranic minimálních nároků na jejich vlastnosti se zabývají mnozí autoři (Havenaar a Spanhaak, 1994; Giraffa, 2002, Vankerckhoven et al., 2008). V Evropě dosud žádné probiotikum nemá schválené zdravotní tvrzení, statut léčiv nemají probiotika ani v USA. Jejich výroba se proto řídí předpisy pro potraviny.

Probiotika jsou dnes obecně vnímána jako prevence a prostředek k „udržení zdraví“. Často se aplikují při nebo po antibiotické terapii, mohou modulovat skladbu střevní mikrobioty (pokles pH, produkce SCFA, změny aktivity mikrobiálních enzymů), vykazují prokazatelně imunostimulační účinky a podílejí se také na bariérovém efektu (produkce antimikrobiálních substancí, redukce kolonizace patogenních bakterií). Pozitivní účinky probiotik při léčbě konkrétních onemocnění jsou doložené např. jako podpůrná terapie u zánětlivých střevních onemocnění: ulcerativní kolitidě, Crohnově chorobě (Derwa et al., 2017; Holleran et al., 2017), průjmeh (Canani et al., 2007; Hickson et al., 2007), zácpě (Banaszkiewicz a Szajewska, 2005), jako prevence kolorektálního karcinomu (Rafter et al., 2007; Davis a Milner, 2009), či pro tlumení alergií: změnou mikrobiálního spektra (Lodinová-Žádníková et al., 2003; Kukkonen et al., 2008) a stimulací imunitního systému (Tubelius et al., 2005; Kohout, 2010).

Setkáme se ovšem i se zprávami o negativních účincích probiotik. Nejčastěji jsou zmiňovány fungémie (Bassetti et al., 1998; Cherifi et al., 2004; Munoz et al., 2005), bakteriémie, příp. sepse, často v souvislosti s *Lbc. rhamnosus* (De Groote et al., 2005; Land et al., 2005; Vahabnezhad et al., 2013), vzácně i bifidobakteriemi, konkrétně *B. breve* (Ohishi et al., 2010), endokarditida: laktobacily (Mackay et al., 1999; Presterl et al., 2001), či absces

jater: opět laktobacily (Rautio et al., 1999). Probiotika mohou uškodit také pacientům s akutní pankreatitidou (Besselink et al., 2008), lidem se sníženou imunitou, mohou vyvolat nadměrnou imunitní stimulaci u vnímavých jedinců, aplikace probiotik se nedoporučuje ani při akutní fázi IBD, a velká opatrnost je nutná při jejich aplikaci u nedonošených dětí (Boyle et al., 2006). Komplikace může vyvolat i podání laktobacilů s výraznou tvorbou levotočivé (D-) kyseliny mléčné (Mack, 2004). Zdá se také, že silné imunitní reakce (vnímané jako pozitivní), cílené na antigeny infikujícího mikroorganismu (MO), mohou též vyvolávat reakce autoimunitní. Experimentální modely ukazují, že intestinální mikrobiota zde jistě hraje podstatnou úlohu, a zdá se, že bakterie, které mohou spustit chronická zánětlivá autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému (CNS) patří právě spíše mezi pozitivní komensály, než mezi MO patogenní (Berer et al., 2011; Berer a Krishnamoorthy, 2012).

### **2.1.2 Mikrobiota trávicí soustavy a její skladba**

Pro konkrétní stanovení probiotik i jejich vhodnou formu aplikace, je znalost skladby a vztahů gastrointestinální mikrobioty s prostředím zásadní. Společenstva MO v GIT odrážejí dlouhodobé vztahy hostitele a okolního prostředí (Schell et al., 2002). V zásadě se nejedná o rychle se měnící vzorce a složení mikrobioty (díky velké diverzitě a funkční flexibilitě) tak má na hostitelský organismus podstatně stabilizační vliv. V GIT bakterie na jedné straně ochraňují hostitelský organismus před patogeny např. formou tzv. kolonizační rezistence, produkují některé vitamíny (B a K) a jiné látky důležité pro hostitelský organismus (mastné kyseliny s krátkým řetězcem apod.). U přezvýkavců se podílejí i na samotném trávení potravy, podstatné jsou také jejich imunostimulační funkce. Na druhé straně ovšem indigenní mikrobiota dokáže působit i negativně: např. produkcí toxických látek (amoniak, indoly, thioly aj.), zpětným uvolňováním jedů detoxikovaných játry a vyloučených žlučí, produkcí tělesných pachů, či prostou kompeticí o živiny (Rada a Marounek, 2005). Dlouho se také nezdálo pravděpodobné, že by mikrobiota GIT mohla být odpovědná i za procesy mimo trávicí ústrojí: stále však roste množství prací, které podporují koncept „osa střevo - mozek“ (*Gut-Brain Axis*, GBA). CNS a GIT spolu nepochybně vzájemně intenzivně komunikují také prostřednictvím mikrobiálních metabolických procesů (Cryan a Dinan, 2012; Holzer a Farzi, 2014; Mittal et al., 2017; Torres-Fuentes et al., 2017). Nově se objevuje i propojení obratně analogicky označené jako *Gut-Muscle Axis* (Ticinesi et al., 2017).

Z prostředí lidského gastrointestinálního traktu bylo izolováno přibližně 500 bakteriálních druhů, molekulárně-genetickými metodami nezávislými na kultivačním stanovení jich byl identifikován již asi dvojnásobek. Rajilić-Stojanović a de Vos (2014) v případě lidského intestinálního mikrobiomu shrnují výsledky publikované za posledních 150 let a dospívají k 1057 druhům mikroorganismů. Konkrétně dosud víme o 957 různých druzích bakterií, 8 druzích domény Archaea a o 92 eukaryotních organismech, jež osídlují náš GIT. Dominantními bakteriálními rody jsou zde *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* a *Ruminococcus*, časté jsou také rody *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* a *Proteus* (Simon a Gorbach, 1984; Salminen et al., 1998; Vaughan et al., 2000). Každý hostitelský organismus je osídlen určitou kombinací bakteriálních druhů s majoritním podílem zástupců zmíněných rodů. Byly definovány tři odlišné humánní typy, takzvané enterotypy: každý enterotyp charakterizuje relativně vysoká úroveň zastoupení bakterií jediného rodu, konkrétně *Bacteroides*, *Prevotella* či *Ruminococcus* (Arumugam et al., 2011). Druhovému složení celého bakteriálního spektra je však výrazně individuální (Moore a Moore, 1995). Skladbě mikrobioty GIT dospělých lidí se věnovalo více autorů (Bartosch et al., 2004; Mariat et al., 2009; Rajilic-Stojanovic et al., 2009). Schnorr et al. (2014) a Turroni et al. (2016) např. zaznamenali u tanzánských lovců - sběračů kmene Hadza výrazně široké spektrum bakteriálního osídlení GIT v porovnání s evropskou populací (Italy). Autoři referují o výrazné dominanci Firmicutes, absenci bifidobakterií (Actinobacteria) a také o odlišné kompozici mikrobioty mužů a žen u etnika Hadza. Bhute et al. (2016) se zabývali skladbou mikrobioty GIT Indů, a porovnávali ji s mikrobiotou obyvatel Bangladéše, Koreje, Španělska a USA, a také s nehumánními primáty - dále ještě rozlišenými na druhy masožravé, všežravé a býložravé. Mikrobiom GIT Indů sdílel vysokou podobnost s mikrobiálním osídlením obyvatel blízkého Bangladéše, výrazně se však lišil od mikrobiomu Američanů (Lin et al., 2013), Španělů (Peris-Bondia et al., 2011), ale i Korejců (Nam et al., 2011). Zajímavá byla podobnost skladby mikrobioty GIT Indů s jinými, nehumánními primáty, výrazná zvláště u býložravých druhů (Ley et al., 2008; Muegge et al., 2011).

### 2.1.3 Osídlení GIT mikrobiotou a vývoj jejího bakteriálního složení

Donedávna byl obecně přijímán předpoklad, že trávicí ústrojí zdravého plodu je před porodem prakticky sterilní. V nedávné době pak byly publikovány informace o mikrobiomu osídlujícím lidskou placentu, obecnou platnost zjištění je však potřeba potvrdit. Mikrobiom této niky podle autorů vykazuje výraznou podobnost s mikrobiomem lidských úst (Aagaard et al., 2014). Zdá se, že mikrobiom plodu se podobá právě mikrobiomu úst (Wang et al., 2013) a placenty, ne mikrobiomu vaginálnímu (Prince et al., 2014). Přesto zůstává nesporné, že při samotném porodu dochází orálně k masivnímu osídlování GIT novorozence druhově specifickou mikrobiotou matky. Pro vaginální mikrobiotu jsou typické bakterie rodu *Lactobacillus* (Redondo-Lopez et al., 1990), jejichž dominantní postavení zde v průběhu těhotenství ještě posiluje (Romero et al., 2014). Je zajímavé, že právě laktobacily výrazně nekolonizují GIT novorozence, na rozdíl od střevních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Bifidobacterium* (Tannock et al., 1990; Freitas a Hill, 2018). Trávicí trakt novorozence je však potencionálně infikován nejen přirozenou mikrobiotou vagíny, ale také bakteriemi z dalších nik matky, jako jsou kůže, ústa, nos, kaudální části GIT (Sonnenborn et al., 1990) apod., či mikroorganismy z okolního prostředí. Podstatnou úlohu zde proto hraje i způsob porodu (vaginální porod či císařský řez) a další faktory. Například i trávicí trakt vaginálně porozených dětí v prostředí tzv. velkých městských porodnic s vysokou úrovní hygieny je prokazatelně významně osídlován bakteriemi z tohoto prostředí (Guarner a Malagelada, 2003; Wassenaar a Panigrahi, 2014). Po dvou dnech od narození obsahuje tlusté střevo kojenců již přibližně  $10^{10}$  bakteriálních buněk v 1 gramu tráveniny a do pěti dnů se koncentrace bakterií ještě o řád zvýší. Dominantními kolonizátory GIT kojenců se v období mléčné výživy stávají bifidobakterie a to nejen u dětí, ale i u dalších savců (Vlková et al., 2006), a je prokázáno, že kmeny nalezené u dítěte jsou vertikálně získané od matky (Mikami et al., 2012). Původním zdrojem těchto komensálních bakterií je tedy pravděpodobně střevní mikrobiota matky. Mléčná žláza sice může obsahovat bakterie i v období mimo laktaci (Urbaniak et al., 2014) a mateřské mléko v některých případech obsahuje bifidobakterie a laktobacily (Martín et al., 2003, 2009), u zdravých jedinců je ale mateřské mléko sterilní, a jsou-li zde přítomny např. bifidobakterie, jedná se pravděpodobně o sekundární kontaminaci, kdy jejím hlavním zdrojem se jeví sám kojenec (Rada et al., 2011).

Zajímavá je ovšem také koexistence komensálních bakterií a dendritických buněk imunitního systému u hlodavců (Uhlig a Powrie, 2003; Macpherson a Uhr, 2004). U myši byl

transport bakteriálních kmenů ze střeva do mléčné žlázy krví zprostředkovaný makrofágy (dendritickými buňkami) pozorován (Donnet-Hughes et al., 2010). Analogie u člověka by se potom nezdála být nerealistická (Perez et al., 2007; Fernández et al., 2013). Je možné, že neonatální imunitní systém dokáže rozlišit specifické bakteriální molekulární vzorce a odpovídajícím způsobem reaguje na přítomnost komensálních či patogenních mikroorganismů (Perez et al., 2007).

Skladba střevní mikrobioty novorozenců je logicky závislá také na způsobu výživy (Bezirtzoglou et al., 2011). Například u kojenců ve věku 3 měsíců, plně kojených mateřským mlékem, se na skladbě mikrobioty podílely největší měrou kmene Actinobacteria (37,1%), Proteobacteria (26,4%), Bacteroidetes (19,6%) a Firmicutes (9,8%). U stejně starých dětí krmených umělou výživou bylo procentuální zastoupení bakteriálních kmenů výrazně odlišné; podobně jako v předešlém případě také zde zastával dominantní postavení kmen Actinobacteria (46,4%), výrazně však vzrostl počet bakterií kmene Firmicutes (35,1%) a naopak kleslo zastoupení Proteobacteria a jen zlomkem procenta se na celkovém počtu mikrobioty podílel kmen Bacteroidetes (Donovan et al., 2012).

Biagi et al. (2010, 2016) se detailně zabývali rozdíly ve střevní mikrobiotě v různých věkových kategoriích, počínaje lidmi mladšími, tedy ve věku kolem 30 let, staršími do 75 let, a lidmi velmi starými - ve věku 100 a více než 100 let. Hodnocené osoby byly fenotypicky (jejich fyzický a kognitivní zdravotní stav) dobře charakterizované, představovaly obecnou populaci omezené zeměpisné oblasti (severní Itálie), přičemž tvořily relativně homogenní skupinu s ohledem na životní styl či stravovací návyky. Analýza mikrobioty, která koexistovala s hostitelem již více než 100 let, ukázala, že změny v ekosystému GIT, pokud jde o jeho složení a rozmanitost, nesledovaly lineární vztah s věkem. Ve skutečnosti byl rozdíl mezi střevní mikrobiotou mladých dospělých a starších lidí (zde v průměru více než 40 let věkového rozdílu) pozoruhodně malý ve srovnání s rozdílem pozorovaným mezi lidmi staršími a stoletými (v tomto případě méně než 30 let života). Mladí a starší dospělí vykazovali srovnatelnou celkovou strukturu střevní mikrobioty, přičemž kmene Bacteroidetes a Firmicutes byly vysoce dominantní (přibližně 95% všech bakterií), v menší míře se pak vyskytovali zástupci Actinobacteria a Proteobacteria (také Ley et al., 2008; Tap et al., 2009). U extrémně starých lidí Bacteroidetes a Firmicutes stále dominovaly (představovaly více než 93% všech bakterií), střevní mikrobiota stoletých se však ukázala být „bohatší“ o zástupce

Proteobacteria, skupinu zahrnující mnoho druhů definovaných jako patobionty (Sansone et al., 2007; Round a Mazmanian, 2009).

Relativně stálá struktura střevní mikrobioty v dospělosti (Vanhoutte et al., 2004), zmiňovaná jako stabilizační prvek v oddílu 2.1.2 *Mikrobiota trávicí soustavy a její skladba*, může, zdá se, existovat déle, než se obecně předpokládalo. Proces stárnutí začne výrazně ovlivňovat složení střevní mikrobioty později než ve věku 65 let, což je u lidí obvyklý prahový věk pro označení stáří. Zdá se tedy, že hodnoceno *pohledem* střevní mikrobioty se tato hranice posouvá mezi 75 - 80 let věku člověka. V korelaci jsou i data získaná užitím HITChip, kde byl u starších dospělých, s průměrným věkem 71 let, zaznamenán nárůst počtu bakterií Bacilli a naopak pokles Bacteroidetes (Rajilic-Stojanovic et al., 2009). U stoletých potom byly zaznamenány významně vyšší počty bakteriální třídy Bacilli, zatímco populace Bacteroidetes již zůstala nezměněna. U stoletých bylo rovněž zajímavé zaznamenané snížení abundance bakterií druhu *Faecalibacterium prausnitzii*, vzhledem k tomu, že tato bakterie prokazatelně omezuje střevní zánětlivé procesy (Sokol et al., 2008, 2009) a bylo také zjištěno významné snížení počtu bifidobakterií (Woodmansey et al., 2004; Mueller et al., 2006). Dále byla u stoletých zaznamenána také remodelace složení populace bakterií kmene Firmicutes: zde klesaly počty druhů, u kterých bylo v GIT prokázáno protizánětlivé působení, a naopak rostly počty těch druhů, u kterých dosud nebyly takové pozitivní vlastnosti potvrzeny (Biagi et al., 2010).

#### **2.1.4 Prebiotika – nástroj pro modulaci složení stávající mikrobioty**

Ovlivnit složení mikrobioty lze buď přímou aplikací probiotik *per os*, či podporou indigenních bakterií (zdraví prospěšných taxonů), které již hostitelův GIT obývají. Stimulace stávajících mikroorganismů se zdá být efektivnější. Lze ji realizovat právě prostřednictvím prebiotik. Tak jsou označovány složky potravy, které jsou nevyužitelné trávicím traktem hostitele, jež ovšem mohou být zpracovány jeho mikrobiotou. Podobně jako v případě probiotik, také u prebiotik se setkáme s různými definicemi. Tradičně přijímaný je pohled Gibsona a Roberfroida - prebiotika definují jako *nestravitelné složky potravin, které příznivě ovlivňují hostitele pomocí selektivní stimulace růstu a/nebo aktivity jednoho bakteriálního druhu, či omezené skupiny více druhů, obývajících tlusté střevo, což může zlepšit zdraví hostitele* (Gibson a Roberfroid, 1995). Roberfroid (2007) posléze jako prebiotika označuje

*selektivně fermentované složky potravy, které umožňují konkrétní změny ve složení a/nebo aktivitě gastrointestinální mikroflóry, která má prokazatelně prospěšný vliv na zdraví a celkovou pohodu hostitele.* Podobně jako probiotika musejí také prebiotika splňovat určitá základní kritéria. Substrát, který má být klasifikován jako prebiotikum, nesmí být hydrolyzován v žaludku či absorbován v tenkém střevě hostitele, musí být využitelný střevní mikrobiotou, a musí selektivně podporovat růst a/nebo aktivitu prospěšných komensálních bakterií v tlustém střevě (Roberfroid, 2007). Fermentace prebiotika by měla v hostitelském organismu vyvolávat pozitivní systémové účinky, mezi které lze zahrnout jejich imunostimulační působení, zlepšení trávicích pochodů hostitele, syntézu vitamínů, inhibici růstu potenciálních patogenů, snížení hladiny cholesterolu, snížení tvorby plynů, omezení produkce karcinogenní látek a toxinů (zácpa, poškození jater, střevní infekce) či omezení hnilobných procesů ve střevě (Manning a Gibson, 2004). Široké spektrum běžně citovaných prebiotik zúžil v roce 2007 Roberfroid: na základě prokázaných pozitivních účinků označuje za probiotika pouze inulin, oligofruktosu (Roberfroid et al., 1998), galaktooligosacharidy (Rowland a Tanaka, 1993) a laktulosu (Crittenden, 1999). V Japonsku řadí k prebiotikům (oprávněně) také sójové oligosacharidy (Mitsuoka, 1996). Pro savce je prvním a přirozeným zdrojem prebiotik mateřské mléko. V něm obsažené oligosacharidy, tzv. oligosacharidy mateřského mléka (OMM), podporují rozvoj a následnou kolonizaci GIT kojence probiotickými kmeny bifidobakterií (Coppa et al., 2004). OMM tvoří skupinu složitých glykanů, odolných vůči gastrointestinálnímu trávení, podobných buněčným povrchovým glykanům, např. mucinu (viz oddíl 2.3.3 *Mucin jako možný selektivní faktor pro stanovení druhu Bifidobacterium bifidum*).

## **2.1.5 Probiotické bakterie**

### **2.1.5.1 Probiotika aplikovaná v potravinách a potravních doplňcích**

V současné době jsou nejfrekventovanějšími probiotiky bakteriální rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Jako humánní probiotika jsou nejčastěji používány BMK, z nich především rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Ve většině se jedná o grampozitivní, kataláza negativní, mikroaerofilní, acidotolerantní a nesporeující tyčinky či koky. Z taxonomického hlediska je skupina heterogenní. BMK jsou favorizovány jednak dlouhodobou zkušeností člověka (zpracování mléka, výroba nakládané zeleniny, siláž), poměrně snadnou kultivací (v porovnání se striktními anaeroby) a ovšem také tím, že jsou v naprosté většině nepatogenní (Rada a Marounek, 2005). Dominantní postavení v rámci

**Tab. 1 Přehled nejčastěji používaných probiotických bakterií (upraveno: Holzapfel et al. 2001; Rada a Marounek, 2005).**

Skupina	Druh, poddruh
<i>Bakterie mléčného kvašení</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>E. faecium</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lbc. amylovorus</i>
	<i>Lbc. brevis</i>
	<i>Lbc. casei</i>
	<i>Lbc. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>
	<i>Lbc. fermentum</i>
	<i>Lbc. gallinarum</i>
	<i>Lbc. helveticus</i>
	<i>Lbc. paracasei</i>
	<i>Lbc. plantarum</i>
	<i>Lbc. reuteri</i>
	<i>Lbc. rhamnosus</i>
	<i>Lbc. salivarius</i>
	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>Bifidobakterie</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
	<i>B. animalis ssp. lactis</i>
	<i>B. bifidum</i>
	<i>B. breve</i>
	<i>B. infantis</i>
	<i>B. longum</i>
	<i>B. pseudolongum</i>
	<i>B. thermophilum</i>
<i>Ostatní bakterie</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>B. licheniformis</i>
	<i>B. mesentericus</i>
	<i>B. natto</i>
	<i>B. subtilis</i>
	<i>B. toyoi</i>
	<i>Clostridium butyricum</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>



BMK náleží rodu *Lactobacillus*. Z laktobacilů jsou obecně aplikovány druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lbc. casei*, *Lbc. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lbc. helveticus*, *Lbc. paracasei*, *Lbc. plantarum*, *Lbc. reuteri* a snad pro svou výraznou vitalitu také mírně problematický (viz oddíl 2.1.1 *Koncepce a funkčnost probiotik*) *Lbc. rhamnosus*. Významným druhem BMK je *Lactococcus lactis*, známý produkcí cytokinů, a přechodně obývajícím GIT (Nouaille et al., 2003). Některé tradičně využívané BMK se v GIT hostitele přirozeně trvale vyskytují, např. zástupci rodu *Streptococcus*. Z dalších rodů využívaných jako humánní probiotika jsou to např. *Bacillus* a *Propionibacterium*, či klostridie *Clostridium butyricum* (Hungin et al., 2013), příp. konkrétní kmeny *Escherichia coli* (nejčastěji slavný, historický *E. coli* Nissle 1917 - dnes obsažený v léku Mutaflor (Schutz, 1989)). Důležitou a *moderní* skupinou probiotik (nebo jejich kandidátů), jsou již mnohokrát citované bifidobakterie (Rada a Marounek, 2005). O této významné taxonomické skupině bakterií se podrobněji zmíníme v následujícím oddílu 2.1.5.2 *Bifidobakterie*. V GIT člověka, a jako s akceptovanými probiotickými druhy, se běžně setkáváme s *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* a *B. longum*. Pro zvířata je typický *B. animalis* (Vlková et al., 2004). V chovu přežvýkavců, drůbeže, ale i prasat jsou, s ohledem na fyziologii jejich trávicího ústrojí, jako probiotika vhodnější (a stále také široce využívány) BMK - běžně zástupci rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* a *Enterococcus* (Garriga et al., 1998; Gaggia et al., 2010).

Přehled nejčastěji používaných druhů probiotických bakterií je uveden v *Tab. 1*.

### **2.1.5.2 Bifidobakterie**

Čeleď *Bifidobacteriaceae* (Actinobacteria) zahrnuje dnes 65 druhů a 10 poddruhů (LPSN, 2018). Druhově dominantní rod *Bifidobacterium* tvoří 6 fylogenetických skupin (Ventura et al., 2006). Bifidobakterie jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporující, pleomorfní tyčinky. Vedle relativně pravidelných, kratších či delších tyčinek vytvářejí také buňky kyjovité, nebo kokovité, typické jsou pro tento rod buňky ve tvaru písmene Y, V, případně útvary jinak větvené. Morfologie buněk je sice pro jednotlivé druhy do určité míry charakteristická, ovšem, zvláště u větvených buněk je značně variabilní. Výrazně se tvar buněk mění i podle podmínek okolního prostředí: např. při absenci vhodných substrátů, růstových faktorů, příp. při vyšší koncentraci kyslíku v prostředí bývají buňky výrazněji větvené, či nezvyklého tvaru (deformované). V kultivačním médiu bývají uspořádány

jednotlivě, v řetízcích, palisádovitě nebo ve shlucích. Vytvářejí lesklé, hladké, diskovité, vypouklé kolonie s pravidelnými okraji, v různých odstínech krémově bílé až světle žlutošedé barvy. Jsou striktně anaerobní, některé druhy ale mohou určitou tenzi kyslíku tolerovat či rostou také v aerobních podmínkách, jako např. *B. animalis* ssp. *lactis* (Meile et al., 1997), *B. asteroides* (Scardovi a Trovatelli, 1969), *B. psychraerophilum* (Simpson et al., 2004), příp. *B. tsurumiense* (Okamoto et al., 2008). Optimální pH se pohybuje v rozpětí 6,5 - 7,0. Klesne-li pod 4 nebo naopak, stoupne-li nad 8, růst bifidobakterií ustává (Scardovi, 1986; Felis a Dellaglio, 2007). Teplotní optimum většiny bifidobakterií obývajících GIT člověka leží mezi 36-38 °C, zatímco druhy původem z animálního trávicího traktu preferují teploty vyšší, mezi 41-43 °C (Ventura et al., 2004). Teplotní optimum některých druhů tohoto rodu nespadá do zmiňovaných rozsahů - například *B. thermacidophilum* roste i při teplotě takřka 50°C. Zhu et al. (2003) uvádí konkrétních 49,5°C. *B. psychraerophilum* roste naopak ještě při pouhých 4°C (Simpson et al., 2003).

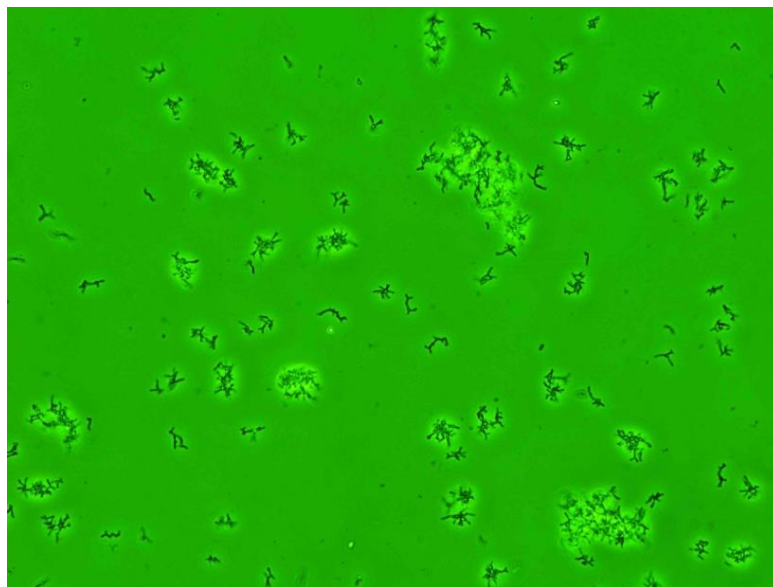
Bifidobakterie jsou řazeny mezi sacharolytické bakterie produkující kyselinu octovou a mléčnou v přibližném molárním poměru 3:2, ve velmi malém množství také etanol, kyselinu mravenčí a jantarovou (Scardovi, 1986). Za specifických podmínek mohou také produkovat kyselinu propionovou a máselnou (Han et al., 2005), a při degradaci glukonátu také oxid uhličitý (Ventura et al., 2004). Je proto možné charakterizovat je jako heterofermentativní bakterie. Od heterofermentativních BMK se ale odlišují specifickým způsobem zkvašování glukosy a ostatních hexos. Postrádají enzym glukosa-6-fosfát dehydrogenasu a aldolasy, a naopak disponují enzymem fruktosa-6-fosfát fosfoketolasy (F6PPK). Specifická fermentace hexos se stala důležitým taxonomickým (i identifikačním) znakem charakteristickým pro rod *Bifidobacterium* (Scardovi a Trovatelli, 1965; De Vries et al., 1967). F6PPK byla však prokázána také u druhu *Gardnerella vaginalis* ze stejné čeledi (Gavini et al., 1996). Tento rod je sice podle současných zjištění fylogeneticky situován spíše do rodu *Bifidobacterium*, a měl by být tudíž reklasifikována (Lugli et al., 2017), ovšem dnes je zřejmé, že aktivitu F6PPK (spolu s aktivitou blízké xyluloso-5-fosfát fosfoketolasy) vykazují zástupci celé čeledi *Bifidobacteriaceae* (Killer et al., 2010, 2014). Posléze byla tato popsána také u dvou druhů laktobacilů: *Lbc. reuteri* a *Lbc. mucosae* (Arskold et al., 2007; Bolado-Martínez et al., 2011) a Gupta et al. (2017) poté dále referují o přítomnosti F6PPK také u bifidobakterií blízkým koriobakterií (*Coriobacteriales*, Actinobacteria). Dalšími enzymy, podílejícími se na fermentaci sacharidů jsou transaldolasy, transketolasy a enzymy EMP dráhy (Scardovi, 1986). Glukosu fermentují, až na nemnohé výjimky (Rada a Petr, 2000), všechny druhy

bifidobakterií; takřka všechny druhy fermentují také fruktosu, sacharosu, maltosu, galaktosu, melibiosu a rafinosu, některé druhy i melecitosu a laktosu (Scardovi, 1986; Sgorbati et al., 1995). Většina bifidobakteriálních kmenů je schopna využívat jako zdroj dusíku amonné soli (Hassinen et al., 1951), některé animální druhy jej ale vyžadují v organické podobě (Ballongue, 2004). Bifidobakterie zřídka bývají vybaveny účinnými proteolytickými enzymy (Tamine et al., 1995).

Jednotlivé druhy bifidobakterií nacházíme obecně v GIT primátů a člověka, ale také prasat, skotu, některých hlodavců, králíků, drůbeže a některého sociálního hmyzu: opylovačů - včel a čmeláků (Killer et al., 2014). Zástupci rodu *Bifidobacterium* osídlují několik ekologických nik, podle Ventura et al. (2007) jsou to střevo, ústní dutina, potraviny, střevo hmyzu a odpadní vody. Russell et al. (2011) uvádí nik sedm (lidský trávicí trakt a vagina, ústní dutina, potraviny, zvířecí trávicí trakt, odpadní vody, trávicí trakt hmyzu). U výskytu bifidobakterií v odpadních vodách, mléku a v potravinách (vedle probiotických doplňků) lze předpokládat, že jejich původním či primárním zdrojem bude pravděpodobně také některý GIT, jako tomu bylo např. u *B. minimum* popsaného právě z odpadní vody. Tento druh byl později detekován také v trávicím traktu prasat (Simpson et al., 2003).

Hlavními druhy obývajícími GIT člověka jsou *B. adolescentis*, *B. bifidum* (Obr. 1), *B. catenulatum*, *B. infantis*, *B. breve* a *B. longum* (Matsuki et al., 2003). Většina bifidobakterií byla považována nejenom za hostitelsky specifickou, ale také za velmi konzervativní, pokud jde o změnu konkrétní životní niky. Podle zjištění Venturova týmu se však zdá být rozšíření bifidobakteriálních druhů v GIT hostitelských druhů organizováno jinak a podstatně volněji (Milani et al., 2017). Trávicí trakt bifidobakterie osídlují v určité fázi hostitelova vývoje (Conway, 1997). Obvykle standardně tvoří jednu z dominantních bakteriálních skupin v trávicím traktu člověka i mláďat některých savců v období jejich mléčné výživy (Abe et al., 1995; Rada et al., 2006; Vlková et al., 2006). V GIT kojených dětí jsou nejfrekventovanějšími druhy *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* a *B. longum* (Matsuki et al. 2003). Po ukončení kojení se jejich počty sice snižují, u dospělých lidí však stále reprezentují asi 3 až 5% z celkové mikrobioty (Schell et al., 2002). V trávicím traktu, resp. vagíně, dospělých lidí jsou nejčastěji identifikovány druhy *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* a *B. pseudocatenulatum* (Freitas a Hill, 2018).

U starých lidí se nejčastěji setkáme s druhy *B. adolescentis*, *B. longum* a v menší míře také s *B. angulatum* a *B. bifidum* (Hopkins et al., 2003; Silvi et al., 2003). Podle Hopkins et al. (2003) se u seniorů snižují nejenom celkové počty bifidobakterií v GIT, ale klesá i jejich druhová diverzita, jiné práce, jako například Canzi et al. (2002), ovšem taková zjištění nepotvrzují počty bifidobakterií v GIT, ale klesá i jejich druhová diverzita, jiné práce, jako například Canzi et al. (2002), ovšem taková zjištění nepotvrzují.



**Obr. 1** *Bifidobacterium bifidum* DSM 29521<sup>T</sup>; foto: Nikon Eclipse E 200, kamera Nikon DS-Fi2, zvětšení 15 x 40, Pechar, 2017.

Působení bifidobakterií v GIT je považováno za jeden z podstatných faktorů ovlivňujících vyvážený stav střevní mikrobioty (Satokari et al., 2001). U intestinálních kmenů nebyla zjištěna žádná míra patogenity, a i proto se zdají být ideálními kandidáty na probiotika (Mitsuoka, 1982). V současné době je probiotický potenciál střevních bifidobakterií vnímán hlavně v těchto oblastech: 1/ Vytvoření stabilní mikrobioty u předčasně narozených dětí; 2/ Imunomodulační účinek bifidobakterií; 3/ Pozitivní vliv bifidobakterií na metabolismus hostitele; 4/ Inhibiční účinek bifidobakterií vůči střevním patogenům; 5/ Terapeutický účinek bifidobakterií na střevní zánětlivá onemocnění; a 6/ Vliv složení mikrobioty GIT ve vztahu k obezitě. Úloha bifidobakterií při prevenci rozvoje kolorektálního karcinomu je diskutovaná. Probiotické vlastnosti bifidobakterií jsou široce studovány u zvířat a na zvířecích modelech; méně časté jsou humánní studie (Saavedra et al., 1994; Kiessling et al., 2002; Furrie et al., 2005; Wang et al., 2007; Le et al., 2015).

S bifidobakteriemi jako probiotiky se běžně setkáváme v mlékárenských fermentovaných výrobcích (MFV), např. jogurtech a sýrech, ale také v potravinových doplncích a kojeneckých výživách (Champagne et al., 2005). Místy se objevují také pokusy o jejich další, jiné aplikace, např. *B. animalis* aplikované jako probiotikum ve fermentovaných uzeninách (Holko et al., 2013). Je ovšem nutné poznamenat, že osazení takových komodit bifidobakteriemi není, vzhledem k jejich fyziologickým vlastnostem, snadné. V potravinách se nejlépe uplatňují odolnější druhy, tedy ty, dobře schopné zvládat technologické postupy výroby a skladování produktů. Obecně využívaným druhem v MFV, je *B. animalis* subsp. *lactis*. Jeho druhové jméno výrobci často *maskují* (orientaci spotřebitelům neusnadňují) - od „*Bifidobacterium lactis*“, přes různé obchodní (spotřebitelsky akceptovatelné) názvy, jako např. Bifidus actiregularis, Bifidus activ či Bifidus essensis. Hlavní bifidobakteriální kmeny používané jako probiotika v MFV jsou uvedeny v Tab. 2. V potravních doplncích, na trhu dostupných standardně ve formě lyofilizovaných prášků v sáčcích anebo kapslích, se nejčastěji setkáváme s humánními druhy *B. bifidum*, *B. longum* a *B. breve*: *křehké* bifidobakteriální druhy, reprezentované např. *B. bifidum*, šetrné technologické postupy (lyofilizace, zmrazení, některé typy enkapsulace) v akceptovatelné míře snášejí. Řídce se lze setkat i s jejich (možným) použitím v MKV, např. Serafini et al. (2014) referuje o kultivaci *B. bifidum* PRL2010 v kefiru.

**Tab. 2 Přehled nejčastěji komerčně používaných kmenů probiotických bifidobakterií v MFV (upraveno: Pokusaeva et al., 2011).**

Kmen	Zdroj
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i> bb-12	Christian Hansen H/S (Dánsko)
<i>B. animalis ssp. lactis</i> DN-173010	Danone Vitapole (Francie)
<i>B. animalis ssp. lactis</i> FK120	Fukuchan milk (Japonsko)
<i>B. animalis ssp. lactis</i> HN019 (DR-10)	New Zealand Dairy Board (Nový Zéland)
<i>B. animalis ssp. lactis</i> LKM512	Fukuchan milk (Japonsko)
<i>B. breve</i> kmen Yakult	Yakult Honsha (Japonsko)
<i>B. longum ssp. longum</i> BB-46	Christian Hansen H/S (Dánsko)
<i>B. longum ssp. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry (Japonsko)
<i>B. longum ssp. longum</i> SBT-2928a	Snow Brand Milk Products Co., Ltd (Japonsko)

## 2.2 Selektivní stanovení a identifikace probiotických bakterií

Probiotika v současnosti představují atraktivní segment trhu, a proto zákonitě vznikl také požadavek pro jejich selektivní kvantitativní kontrolu v probiotických produktech. Jako probiotika se tradičně využívají bakterie mléčného kvašení, nejčastěji různé druhy rodu *Lactobacillus*, nověji také typičtí obyvatelé zdravého GIT, např. bakterie rodu *Bifidobacterium*. Podle mezinárodních ISO/IDF norem však v současnosti existuje pouze postup pro selektivní stanovení druhu *Lactobacillus acidophilus* (ISO/IDF 20128/192:2006). Pro ostatní druhy laktobacilů, jako je běžně aplikovaný *L. casei*, *L. paracasei*, *L. reuteri* a *L. rhamnosus*, neexistuje spolehlivá a závazná metoda, jak požadovaný stav ověřit. Také u bifidobakterií existuje pouze norma pro stanovení na úroveň rodu (ISO/IDF 29981/220:2010), přičemž jednotlivé druhy rozlišit nelze (Hartemink a Rombouts, 1999; Roy, 2001). Pro stanovení se často využívají nezávazné metody, které vycházejí z publikovaných dat, anebo zkušeností jednotlivých laboratoří, výsledky jsou však těžko porovnatelné. BMK jsou kultivovány na mnoha komerčně dostupných půdách. Obecně je využíváno např. standardní MRS médium, příp. různé jeho modifikace. Doplnky ovšem nemusejí zajišťovat dostatečný selektivní tlak v daném případě, a samotné MRS médium podporuje růst širokého spektra mikroorganismů. Komerčně dostupných médií pro selektivní stanovení různých skupin bakterií (zde platí pro BMK) je celá řada, jejich účinnost je ale při reálných aplikacích různou měrou problematická. Vždy je nutné brát na zřetel nemilý fakt, že žádná selektivní půda není zcela selektivní.

Zmíníme dále vybrané půdy, vhodné pro selektivní kultivaci frekventovaných skupin probiotických bakterií, jakými jsou laktobacily, propionové bakterie či enterokoky; bifidobakterie pak v samostatné podkapitole 2.3 *Kultivační stanovení bifidobakterií*.

Pro izolaci či stanovení počtů laktobacilů ve směsném vzorku lze uplatnit, vedle úzké nutriční nabídky, také nízké pH, jako je tomu např. u doporučeného, a dnes již i legendárního Rogosa agaru (sestavajícího z tryptonu, kvasničného extraktu, glukosy, sorbitolmono-9-oktadecenoátu, dihydrogenfosforečnanu draselného, citronanu amonného, octanu sodného, sulfátu hořečnatého, síranu železnatého a agaru; pH upraveno kyselinou octovou na cca 5,4 (Rogosa et al., 1951); či přídavek antibiotik, - jako např. u přínosného LAMVAB média, selektivního díky kombinaci nízkého pH a vankomycinu a použitelného

nejenom pro obvykle méně náročné izolace, např. z potravin, ale také pro obtížnou izolaci laktobacilů z fekálních vzorků (Hartemink et al., 1997).

Tak také stanovení propionových bakterií není snadné, i když různé navržené či komerčně dostupné půdy existují. Selektivní růst propionových bakterií dobře podporuje např. tzv. GLIM agar (Thierry a Madec, 1995; Lacmanová et al., 2010), obsahující lithium laktát (25°C, 6 dnů, neutrální pH, za anaerobních podmínek), je však rozumné provést mikroskopickou kontrolu jednotlivých kolonií a potvrdit přítomnost kyseliny propionové.

Pro kultivaci enterokoků je používáno selektivní Slanetz-Bartley medium obsahující azid sodný a trifenyltetrazoliumchlorid (TTC). Pro stanovení enterokoků se využívá jejich schopnosti redukovat a hydrolyzovat aeskulin: na Slanetz-Bartley agaru bude, v přítomnosti enterokoků, bezbarvý TTC redukován na červeně zbarvený formazan (37°C / 48 h). Pro potvrzení stanovení bude v postupu ještě dále aplikován žluč-aeskulin-azidový agar (45°C / 2 h), kde budou přítomné enterokoky hydrolyzovat aeskulin na dihydroxykumarin, který spolu s ionty železa vytvoří hnědočernou sloučeninu difundující do média v okolí kolonií enterokoků. Princip postupu zohledňuje norma ČSN EN ISO 7899-2 Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů. Tato metoda se ovšem využívá pro stanovení intestinálních enterokoků v pitné a povrchové vodě, a bylo by ji možné v principu využít, není však vhodná pro analýzu vzorků s vysokým obsahem nerozpuštěných látek, či s mnoha interferujícími mikroorganismy. V literatuře se lze také setkat se selektivními kultivačními půdami, které dovolují rozlišení některých jednotlivých druhů: např. *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*: *Enterococcus Differential Agar Base*, kde je využito thalium acetátu a TTC, a každý druh při kultivaci vytváří kolonie jiné barvy: *E. faecalis* s tmavě červeným středem a úzkým bílým okrajem, *E. faecium* bílé nebo světle růžové (Barnes, 1956); příp. skupiny druhů (*E. faecium*, *E. raffinosus*, *E. mundtii*, *E. gallinarum* a *E. casseliflavus*), které bylo možné odlišit díky schopnosti využít arabinosu (Ford et al., 1994).

V posledních desetiletích došlo k velkému rozvoji a následně také k výraznému zlevnění analýz využitelných pro stanovení a identifikaci mikroorganismů. Jedná se například o postupy s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR), dostupná je dnes již místy také identifikace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, či různé

techniky sekvenační. Skupiny bakteriálních společenstev lze relativně levně a úspěšně sledovat díky dnes již v některých ohledech překonané metodě denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). Stručný výčet metod viz oddíl 2.2.2 *Metody stanovení a identifikace probiotik nezávislé na kultivaci*. Pro rutinní kontrolu probiotických potravin je ovšem ideální vyvinout jednoduché postupy snadno proveditelné v běžných laboratořích. Zatím se totiž stále jeví plošné použití molekulárně-genetických metod jako nereálné, kontrola vyžaduje využití náročných technologií a různé technologické přístupy je navíc nezbytné i operativně kombinovat. Správná identifikace bakterií na rodovou, druhovou a kmenovou úroveň je jedním ze základních předpokladů pro jejich průmyslové využití. Dříve běžně využívané biochemické testy jsou v posledních letech nahrazovány podstatně validnějšími molekulárně-genetickými analýzami. V některých případech ale mohou být v identifikačních postupech uplatněny i velmi prosté přístupy, jako je například využití odlišného teplotního optima bakterií osídlujících různé niky či skupiny hostitelů: jak jsme již zmiňovali, humánní kmeny bifidobakterií preferují teplotu kolem 37 °C, zatímco teplotní optimum většiny kmenů animálního původu leží cca o 5 °C výš (Ventura et al., 2004). Gavini et al. (1991) proto navrhli pro odlišení těchto skupin kultivaci při teplotě 46°C, která je pro většinu animálních kmenů akceptovatelná, zatímco kmeny původem z lidského GIT zde již nerostou.

### **2.2.1 Kultivační stanovení probiotik a jeho omezení**

Nesporné přednosti široce frekventovaných standardních kultivačních technik, vedle tradice pak podstatnou měrou ona nenáročnost, sebou nesou také negativa. Vedle mnohdy výrazně limitující časové náročnosti těchto technik, zde ovšem existují omezení mnohem zásadnější. Je např. náročné samotné exaktní stanovení počtů životaschopných buněk v testovaném vzorku. Jejich kultivační stanovení vyžaduje standardizované metodiky, které by detekovaly pouze bakterie schopné růst na syntetických médiích a za specifických podmínek. Standardními kultivačními technikami, běžně používanými pro kvantifikaci probiotických kmenů, jsou ale zachyceny pouze replikující se buňky: za životaschopné jsou tradičně považovány pouze buňky vytvářející kolonie na agarové plotně. Některé frakce živých probiotik mohou reagovat na stres při manipulaci tak, že vstoupí do tzv. VBNC stavu (*viable but non-culturable state*), tedy stavu sice životaschopného, avšak nekultivovatelného: buňky se nemnoží, zůstávají ale nějakou měrou metabolicky aktivní. Např. probiotičtí komensální GIT jsou připraveni pro život v trávicím traktu svého hostitele, to ovšem



podmínky laboratorní kultivace z mnoha důvodů imitují jen velmi vzdáleně, - kupříkladu vzhledem k absenci interbakteriálních interakcí (Vartoukian et al., 2010; Tanaka a Benno, 2015). Jsou-li navíc bakterie vystaveny stresu během technologického zpracování probiotického produktu a jeho skladování, může přejít/část bakteriální populace právě do zmiňovaného VBNC stavu. Po přenesení buněk do příznivějších environmentálních podmínek mohou tyto opět plnohodnotně obnovit své fyziologické funkce a dále se také replikovat (Oliver, 2010). Vzhledem k tomu, že standardní metody kultivačního stanovení bakterií registrují právě pouze množící se buňky, lze u tohoto typu analýz očekávat získané hodnoty nižší. Životaschopné buňky ovšem, po dosažení pro ně přirozené niky, mohou opět obnovit své funkce a zvýšit tak funkční kapacitu probiotického produktu navzdory výsledkům kultivačního stanovení. Populace bakterií navíc není zcela homogenní soubor buněk a jednotlivé mikroorganismy existují současně v různých fázích růstu a různém metabolickém stavu (González-Cabaleiro et al., 2015). Pouze určitá jejich část je, v daném čase a za daných podmínek, právě schopna aktivního růstu. Vedle bakterií mrtvých nebo nevratně poškozených, nezahrneme tedy do počtů ani některé buňky, které jsou sice životaschopné a nadále i metabolicky aktivní, ale z nějakého důvodu právě nejsou schopné vytvářet viditelné, a tedy počítatelné kolonie. Také působením stresových faktorů, zatěžujících kmen při technologickém zpracování probiotického produktu, jakými jsou např. tlak, nevhodná teplota, osmotický tlak, aktivita vody, či zmrazení, lyofilizace, příp. přítomnost rozpouštědel, různým způsobem ovlivní normální fyziologický stav jednotlivých buněk bakteriální populace (Carvalho et al., 2004; Mathipa a Thantsha, 2015).

Bakterie tedy mohou být, stresované či z nějakého důvodu neschopné replikace, přesto ale zůstávají metabolicky aktivní a je otázkou, které z takových buněk by do stanovovaných počtů měly být nesporně zahrnuté. Naproti tomu ale bakterie mrtvé, výhledově neživotaschopné či nenapravitelně poškozené, by do stanovovaných počtů být zahrnuty už nejspíš neměly. Pak bychom již ale diskutovali úroveň živá / mrtvá probiotika (viz oddíl 2.1.1 *Koncepce probiotik a prebiotik*).

Výsledky mohou zkreslovat např. buňky, které se právě dělí, buňky tvořící řetízky nebo shluky, či typy uzavřené v exopolysacharidové (EPS) matrix. U takových bakterií je vysoká pravděpodobnost, že nebudou prostřednictvím tradičních kultivačních analýz zaznamenány. Selektivní kultivační techniky také nemusejí zachytit výskyt všech druhů ve vzorku (Ashraf a Smith, 2015). Pokud by pro stanovení počtů takto vnímané nehomogenní populace probiotik

bylo využito pouze kultivačních technik, došlo by nepochybně k podhodnocení reálného stavu. Vzhledem k tomu, že významné probiotické účinky kmenů mohou záviset na metabolické aktivitě buněk, je také možným kritériem pro hodnocení tvorba určitých metabolitů, např. SCFA. Zdá se ovšem nesporné, že i buňky mrtvé anebo genomová DNA mají nějaké konkrétní *probiotické* účinky (Taverniti a Guglielmetti, 2011).

Pro kvantifikaci bakterií ve vzorku se rutinně využívá počítání tzv. *kolonií tvořících jednotky*, KTJ (v mateřštině; příp. frekventovanější CFU = *colony forming units*), vztaženo na 1 gram nebo 1 ml vzorku, kultivovaných na agarových plotnách. Hodnota KTJ poskytuje odhad počtu přítomných buněk schopných vytvářet kolonie za daných experimentálních podmínek, založený na kvalifikované interpretaci počtu kolonií na agarové plotně. Kolonie mohou vzniknout z jednotlivé buňky, či jejich různě velkých seskupení.

Spolehlivá kvantifikace navíc vyžaduje dodržení přijatelného rozsahu počitatelnosti kolonií na plotně, obvykle se akceptují rozsahy mezi 25-250, resp. 30-300 KTJ na jedné standardní agarové plotně. Různé faktory, jako dynamika růstu kolonií, bakteriální metabolity i dostupnost substrátů apod., mohou sousední kolonie ovlivňovat: omezovat je v růstu, nebo jejich růst naopak stimulovat. Horní hranice počtů KTJ na plotně je dosaženo, pokud začnou bakterie soutěžit o prostor a živiny. Některé plotny z jakékoliv série realizovaných rozborů jsou proto vhodnější pro výpočty než ostatní. Výběr ploten vhodných pro stanovení bakteriálních počtů tak sebou může nést velké zatížení dat subjektivním přístupem, o kterém např. hovoří již v roce 1916 Breed a Dotterrer, umocněným neznalostí i erudicí.

### **2.2.2 Metody stanovení a identifikace probiotik nezávislé na kultivaci**

Pro většinu validních závěrů je dnes využití různých variant kombinací těchto metod nezbytností. V orientačním výčtu dále zmíníme vybrané biochemické, enzymové, imunologické, molekulárně-genetické, chemotaxonomické metody a metody sloužící k třídění buněk.

Biochemické, enzymové a imunologické metody: 1/ *Biochemické testy (soupravy)* - Schopnosti bakteriálních kmenů zkvašovat různé konkrétní substráty lze využít pro kmenovou, příp. druhovou identifikaci (srovnáním získaných fermentačních profilů

s publikovanými výsledky, daty v identifikačních tabulkách (Scardovi, 1986) či databázích výrobců komerčních souprav testů) - výsledky jsou nicméně obtížně reprodukovatelné (Ventura et al., 2004). Touto cestou je však současně možné získat cenné informace o metabolických vlastnostech testovaných kmenů, a Vlková et al. (2005) pomocí průkazu specifické enzymatické skladby, s užitím komerčních biochemických testů, informovali o snadné detekci bifidobakterií v dětských fekálních vzorcích. 2/ *Identifikace pomocí detekce enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy (F6PPK)* - Metoda detekce F6PPK je spolehlivá (omezení např. viz oddíl 2.1.5.2 *Bifidobakterie*) pro stanovení čeledi *Bifidobacteriaceae*. Tato lyasa štěpí fruktoso-6-fosfát na acetylfosfát a erytrózo-4-fosfát, který reaguje s  $\text{FeCl}_3$  za vzniku barevné komplexní sloučeniny. Metoda je vhodná také pro snadnou detekci bifidobakterií přímo ve fekálních vzorcích, aniž by průkazu musela předcházet izolace kmenů. 3/ *Stanovení imunologickými metodami* - Tyto jsou založené na reakci antigenu se specifickou protilátkou (sérologické), či jsou např. protilátky označené enzymy, nebo radioaktivními látkami; apod. (Candlish, 1991).

Molekulárně-genetické metody: 4/ *Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)* – metodou lze detekovat nejenom různé taxonomické jednotky (kmen – rod), ale také např. skupiny příbuzných druhů (Langendijk et al., 1995). Vedle přímé identifikace čistých kultur metoda dovoluje nejenom selektivní kvantifikaci bakteriálních buněk ve smíšené populaci (Bezirtzoglou et al., 2011), ale také detekci mikroorganismů obtížně kultivovatelných či nekultivovatelných (Takada et al., 2004). Výhodou je i možnost sledovat několik typů různě označených subjektů v jednom vzorku současně. Jistou nevýhodou pak je poměrně vysoký detekční limit (LOD = cca  $10^6$  KTJ/g). 5/ *Polymerázová řetězová reakce (PCR)* - je široce aplikovatelná, rychlá, relativně jednoduchá a vysoce citlivá molekulárně-genetická metoda (Matsuki et al., 2003; Bunešová et al., 2014). Přítomnost nukleových kyselin ovšem nemusí nutně dokladovat přítomnost životaschopných bakterií: detekce delších intaktních úseků ale více souvisí s životaschopností testovaných buněk, než výskyt sekvencí kratších (McCarty a Atlas, 1993). K vizualizaci PCR produktů se v minulosti obecně používal silně toxický ethidium bromid - ten je dnes nahrazován akceptovatelnějšími barvivami, jako např. GelRed, GelGreen (Biotium, USA) či SYBR Green (Bio-Rad, UK). 6/ *PCR v reálném čase (real-time PCR, qPCR)* - PCR produkt je registrován prostřednictvím detekce fluorescenčního signálu, který je úměrný koncentraci nukleové kyseliny ve vzorku. K dispozici jsou dva způsoby kvantifikace – relativní a absolutní. Metoda je rychlá, přesná a citlivá (Patel et al., 2011). 7/ *Restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA (ARDRA)* - je založena na štěpení PCR

produktů vhodnými restričními enzymy na specifické fragmenty (Ward a Roy, 2005). ARDRA je rychlá, jednoduchá a dobře reprodukovatelná identifikační metoda. 8 /*Interrepetitivní PCR (rep-PCR)* - využívá specificky lokalizovaných, opakujících se sekvencí v genomu - fingerprintové profily pak umožňují detekci shodných taxonů (Ward a Roy, 2005). 9 /*Multiplexní PCR* – dovoluje porovnání různých nespecifických produktů vznikajících při aplikaci většího počtu dvojic primerů (Dong et al., 2000). 10 /*Denaturační/teplotní gradientová gelová elektroforéza (DGGE/TGGE)* – je úspěšně využitelná např. pro sledování zastoupení dominantních skupin bakteriálních populací ve vzorku. 11 /*Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)* – dovoluje separaci extrémně dlouhých fragmentů DNA (Herschleb et al., 2007). 12 /*Sekvenace genomu* – umožňuje přesnou identifikaci bifidobakterií a studium jejich fylogeneze. Bylo vyvinuto množství technik, používaných ke studiu genetické variability bakterií (i celých mikrobiálních společenstev). Řada nových metod, označovaných jako sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS), umožňuje rychlé sekvenování velkého množství vzorků současně. Nejčastěji používanými technologiemi dnes jsou: 454 (Roche), Solexa (Illumina), Solid (Applied Biosystems), Ion Torrent (Life Technologies), PacBio (Pacific Biosciences) či Nanopore sequencing (Oxford Nanopore Technologies) (Margulies et al., 2005; Bentley et al., 2008; Liu et al., 2012; Goodwin et al., 2016).

Chemotaxonomické metody: 12/ *Analýza struktury buněčné stěny* – pro identifikaci lze využít také složení buněčné stěny bifidobakterií. Ta obecně obsahuje N-acetylglukosamin, kyselinu muramovou, ornitin (místo substituovaný lyzinem), aspartát, glutamát, alanin a serin (Veerkamp, 1971; Lee a O'Sullivan, 2010). 13/ *Hmotnostní spektrometrie MALDI* - Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice tzv. *matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry* (MALDI MS) a s průletovým hmotnostním analyzátozem (*time-of-flight* (TOF)) se v současnosti stává také jednou z dobře využitelných identifikačních metod (Jurinke et al., 2004; Carbonnelle et al., 2011; Biswas a Rolain, 2013). Je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli a ke stanovení vyšších molekulových hmotností využívá ionizace laserem za přítomnosti matrice (ta zajišťuje kontrolovatelný přenos energie na vzorek a brání jeho degradaci). Výhodou MALDI-TOF MS je vysoká citlivost, rychlost měření či analýza více látek v jednom vzorku a také možnost její kombinace se separačními metodami (gelová elektroforéza, kapalinová chromatografie), pozitivem je i zanedbatelný vliv pozadí (například pufrační roztoky). Pro efektivní bakteriologické užití metody, kdy je pro

identifikaci mikroorganismů využívána analýza buněčných proteinů, je ovšem nutné vytvoření rozsáhlé databáze spekter jednotlivých taxonů.

Metody sloužící k třídění buněk: 14/ *Průtovová cytometrie (FC, flow cytometry)*, umožňující analýzu mnoha vlastností bakteriální populace - na úrovni jedné buňky, ve vzorku o velkém množství buněk a ve velmi krátkém časovém úseku (stanovením bifidobakterií FC se konkrétně zabýval Geng et al., 2014); příp. čítač buněk 15/ *Coulter counter* (Johnson et al., 1984; Tracy et al., 2010).

### **2.3 Kultivační stanovení bifidobakterií**

Pro (povětšinou striktně) anaerobní bifidobakterie je nezbytnou podmínkou vytvoření prostředí s nízkým oxidačně-redukčním potenciálem (ORP) kultivačního prostředí - u striktních anaerobů je limitující hodnotou cca -200 mV, pro tolerantnější druhy pak v rozmezí 0 až +150 mV (aerobní kultivace = cca +300 mV). Záporné hodnoty ORP lze v tekutých (a polotuhých) půdách dosáhnout prostými postupy, např. varem (např. 20 min, rychlé ochlazení), přidávkem redukujících substancí (např. cysteinu, kyseliny thioglykolové či její sodné soli, glukózy, redukovaného železa), převrstvením povrchu tekuté půdy parafinovým olejem, anebo přidáním malého množství agaru (řádově ‰) pro omezení difúze vzdušného kyslíku do media aj. Přístupy a jejich varianty je vhodné vzájemně kombinovat. V literatuře se lze setkat s mnoha zajímavými konkrétními aplikacemi (Stieglmeier et al., 2009; Börner, 2016). Anaerobní kultivační prostředí lze u tekutých půd realizovat roll-tube technikou (Hungate, 1969; Holdeman a Moore, 1972), pro kultivaci ploten pak s využitím generátorů anaerobní atmosféry (např. Anaerogen, Oxoid, Basingstoke, England) a speciálních kultivačních nádob – anaerostatů (od stejné společnosti; *Obr. 2*), dostupných na trhu (při stejné funkci) v několika typech.



**Obr. 2 Anaerobní kultivace humánních kmenů bifidobakterií v anaerostatu; foto: autor, 2017.**

Půdy vhodné pro kultivaci bifidobakterií lze rozlišit na komplexní, selektivní, semisyntetická a syntetická. Dále na neselektivní s elektivními sacharidy, média s antibiotiky, s propionátem sodným a chloridem lithným a s elektivními látkami a/nebo nízkým pH (Hartemink a Rombouts, 1999). Vhodná základní, příp. elektivní média jsou využitelná pro kultivaci, rutinní stanovení vstupního inokula a pro kontrolu počtu živých bifidobakterií v průběhu skladování v mléčných fermentovaných i nefermentovaných produktech (Rasic a Kurmann, 1983; Arroyo et al., 1994). V *Tab. 3* jsou shrnuta důležitá základní a elektivní média vhodná pro kultivaci bifidobakterií. Bifidobakteriální kmeny jsou obvykle kultivovány při teplotě 37°C (příp. jinak, podle jejich specifických nároků) po dobu 24 - 72 hodin.

**Tab. 3 Základní a elektivní média, obecně užívaná pro kultivaci bifidobakterií (upraveno: Roy, 2001; cit.: Roy 2001).**

Název	Zkratka	Typ	Literární zdroj
De Man Rogosa Sharpe	MRS	základní	De Man et al., 1960
Tryptone Phytone Yeast	TPY	základní	Scardovi, 1986
Glucose Blood-Liver	BL	základní	Mitsuoka et al., 1965
Columbia	CLB	základní	Ellner et al., 1958
Liver Cystine Lactose (Blaurock)	LCL	základní	Rasic a Sad, 1990
Reinforced Clostridia Medium	RCM	základní	Hirsch a Grinsted, 1954
Wilkins-Chalgren Medium	W (WCH)	základní	Wilkins a Chalgren, 1976
Modified MRS	mMRS	elektivní	Syker a Skinner, 1973
Modified MRS	mMRS + blood	elektivní	Pacher a Kneifel, 1996
Modified RCM	mRCM	elektivní	Reuter, 1990

### 2.3.1 Selektivní média pro stanovení bifidobakterií (bez mupirocinu)

Kultivace čistých kultur bifidobakterií není v zásadě náročná. Jinak je tomu ovšem s jejich kultivací selektivní. Spolehlivé selektivní kultivační stanovení bifidobakterií je stále aktuální téma (Miranda et al., 2011). Vhodná kultivační média sice existují, ale za určitých podmínek (např. rozборы vzorků, kde jsou výrazně dominantní některé jiné bakteriální skupiny) nejsou zcela spolehlivá. Stanovení bifidobakterií v potravinách a potravních doplňcích je tedy většinou relativně snadné, ovšem, jsou-li analyzované vzorky prosté bakteriálních kontaminací. Problematické tedy stanovení bifidobakterií stále je ve speciálních případech, a skutečným problémem zůstává v oblasti intestinální mikrobiologie.

Mnoho autorů publikovalo řadu typů a variant médií pro selektivní stanovení bifidobakterií (Pacher a Kneifel, 1996; Roy et al., 1997; Payne et al., 1999; Vinderola a Reinheimer, 1999), přehledně v review Roy (2001) a textu Shigwedha a Jia (2013), ale užití většiny z nich nevyhovuje požadovaným nárokům.

Pro průmyslové i spotřebitelské použití jsou bifidobakterie běžně dostupné lyofilizované či zmrazené (Tripathi a Giri, 2014). Kromě bifidobakterií aplikovaných v potravinách, existují

na trhu různé potravní doplňky a farmaceutické přípravky, obsahující také tato probiotika (Saad et al., 2013). Nejčastěji se ve sledované skupině produktů uplatňují druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis*. K dosažení příznivého účinku musí probiotika zůstat životaschopná ve výrobku až do doby spotřeby v dostatečném množství (zmiňované TM).

Zajímavé syntetické médium pro izolaci a kultivaci bifidobakterií navrhl již v padesátých letech minulého století Petuely (1956). Obsahovalo laktosu, octan sodný, cysteinu, biotin a kyselinu pantothenovou. Médium poté modifikovali Gyllenberg a Carlberg. Ti přidali riboflavin a báze nukleových kyselin - adenin, guanin, uracil (Gyllenberg a Carlberg, 1958). Tanaka a Mutai (1980) pak kyseliny nalixidovou a pyrohroznovou. Modifikacemi bylo dosaženo uspokojivé selektivity a médium bylo použitelné i pro nesnadnou izolaci bifidobakterií z fekálních vzorků.

V roce 1975 vyvinuli dobře použitelné selektivní médium pro stanovení počtu bifidobakterií v mléčných výrobcích Teraguchi et al. (Teraguchi et al., 1978). Jejich NPNL médium vycházelo z BL-agaru, doplněného neomycinem, paromomycinem, kyselinou nalidixovou a chloridem lithným (Laroia a Martin, 1991). NPNL médium bylo mnohými autory považováno za referenční médium pro izolaci bifidobakterií z fermentovaných mléčných výrobků (Lapierre et al., 1992; Lim et al., 1995; Tamine et al., 1995). Laroia a Martin (1991) současně upozorňují na nutnost velmi pečlivé přípravy média potřebné pro dosažení konzistentních výsledků. Vyskytují se také problémy s rozlišením bifidobakterií a *Lactobacillus casei*. Různí autoři testovali selektivní média, založená na použití komerčně dostupné půdy, a také média jednodušší konstrukce než je zmiňovaný NPNL agar. Lim et al. (1995) navrhli použití BL agaru obsahujícího navíc hovězí žluč (*ox gall*) a gentamicin. Modifikace je označena jako BL-OG agar. Bifidobakterie na této půdě dobře rostou, půda zajišťuje dostatečnou selektivitu (srovnatelnou s NPNL) a její příprava je podstatně jednodušší než v případě NPNL agaru. BL-OG agar je vhodný například pro stanovení bifidobakterií v prostředí jogurtové a acidofilní kultury (Lim et al., 1995; Payne et al., 1999). Další úpravu komerčního média zkoušeli Samona a Robinson (1991). Tradiční Rogosa agar modifikovali paromomycinem, neomycinem, propionátem sodným a chloridem lithným. Médium označili RMS agar. Takto upravený Rogosa agar dovoľoval růst bifidobakterií, zatímco růst laktobacilů a streptokoků byl inhibován. Nicméně, Rasic a Sad (1990)

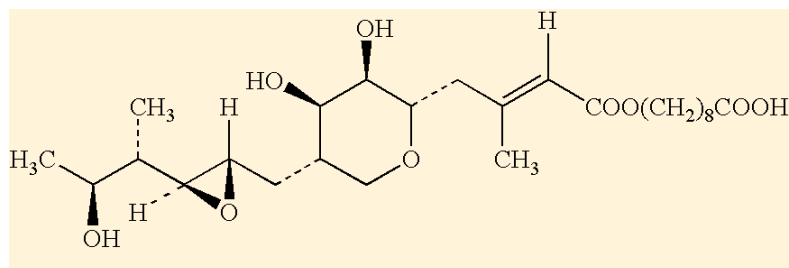


zaznamenali nižší počty bifidobakterií na RMS, v porovnání s neupraveným Rogosa agarem. Sozzi et al. (1990) modifikovali TPY medium přidáním dicloxacilinu a zaznamenali inhibici růstu laktobacilů a streptokoků, zatímco růst bifidobakterií nebyl omezen. Upravené MRS médium testovali také Cole a Fuller (1989), odebrali acetát a přidali rafínosu, fruktosu, galaktosu, kyselinu nalidixová, rifampicin a cystein. Médium však nevykazovalo dostatečnou selektivitu pro stanovení bifidobakterií. Lepšího výsledku při jiné modifikaci MRS dosáhli Pacher a Kneifel, kteří jej doplnili laktulosou, syrovátkou mateřského mléka, krevním sérem, titamíny a antibiotiky: netilmycinem, aztreonamem, kyselinou nalidixovou a paramomycinem (Pacher a Kneifel, 1996). Tzv. BIF médium je selektivní a elektivní, ovšem také zde dělá problémy *Lbc casei.*, případně streptokoky (*pin points* kolonie).

Vedle zmíněných kultivačních půd, jsou dnes využívány či testovány mnohé další, - jmenujme dále ty asi funkčně nejzajímavější: 1/AMC médium - selektivní médium se základem podobným LP agaru (Lapierre et al., 1992), obsahuje chlorid lithný, propionát sodný, kyselinou nalidixovou, paromomycin, polymyxin, kanymycin, jodoacetát a tetrazolium chlorid (Payne et al, 1999). Také zde byly zaznamenány potíže s odlišením *Lbc. casei.* 2/Modifikované Columbia médium - je pouze částečně selektivní půda. Vedle Columbia agaru obsahuje propionát sodný, raffínosu, cystein HCl a chlorid lithný (Roy et al., 1997). Médium je vhodné pro určitá diferenciační stanovení, opět jsou známy potíže s odlišením *Lbc. casei.* 3/DP médium - podobně jako předchozí půda také DP médium vychází z Columbia agaru, v tomto případě doplněném o kyselinu propionovou a dicloxacilin (Bonaparte et al., 2001). Půda dovoluje podobné využití (s obdobnými omezeními) jako předchozí modifikace. 4/RB médium - vychází z originální základní kompozice doplněné raffínosou, propionátem sodným, chloridem lithným a bromkresolovou červení (Hartemink et al., 1996). Jedná se o poměrně zdařilou půdu, primárně určenou pro izolaci bifidobakterií z fekálních vzorků. *Lbc casei* v tomto médiu také roste, vytváří ale pouze *pin points* kolonie. 5/MGLP médium – je selektivní půda, také originálního základu a dále s chloridem lithným, cysteinem HCl a penicilinem (Yakult Pharmaceutical, Japonsko). 6/TOS médium - částečně selektivní půda se speciální agarovou bází, obohacenou cysteinem HCl, propionátem sodným a galaktooligosacharidy (Yakult Pharmaceutical, Japonsko).

### 2.3.2 Selektivní média s mupirocinem

Antibiotikum mupirocin (*Obr. 3*), metabolit *Pseudomonas fluorescens*, (Fuller et al., 1971; Sutherland et al., 1985) inhibuje syntézu bakteriálních proteinů specifickou, reverzibilní vazbou na bakteriální izoleucyl-tRNA-syntetázu, negativně ovlivňuje také např. tvorbu buněčné stěny (Silvian et al., 1999; Ward a Campoli-Richards, 1986); jeho inhibiční vliv na růst bifidobakterií je však minimální (Serafini et al., 2011).



**Obr. 3 Mupirocin; Gulyas et al., 2008.**

V současné době je nejlepší existující půdou pro stanovení bifidobakterií tzv. Mupirocin médium. Jeho základem je TPY agar (Thitaram et al, 2005) nebo Wilkins-Chalgren agar (Wilkins a Chalgren, 1976) se selektivními faktory mupirocinem a ledovou kyselinou octovou. Půda doplněná pouze mupirocinem je vhodná pro stanovení bifidobakterií v mléčných kysaných produktech a potravních doplncích (Rada a Koc, 2000), modifikace s mupirocinem a ledovou kyselinou octovou je vhodná pro užití ve fekálních vzorcích (Rada a Petr, 2000, 2002). Mupirocinem následně modifikovali také jiná média někteří další autoři, např.: Simpson et al. (2004) MRS agar a Thitaram et al. (2005), současně i s ledovou kyselinou octovou, médium TOS. Miranda et al. (2014) referuje o RP-MUP (*Raffinose-Propionate lithium Mupirocin*) médiu, zdá se vhodné pro stanovení bifidobakterií ve fermentovaných mléčných produktech. V současné době jsou na trhu k dispozici také komerčně dostupné půdy: jejich testováním se zabývala Bunešová et al. (2015) viz podkapitola 5.2 *Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements*. Převládají-li ve fekálních vzorcích některé bakteriální skupiny (např. klostridie) rezistentní k mupirocinu, zdá se být velmi účinným obohacení půdy o norfloxacin (Vlková et al., 2015). Další cestou pravděpodobně může být také využití antiseptik, např. derivátů chinolinu (Colak et al., 2009), při zohlednění

tzv. indexu biokompatibility, tedy poměru baktericidní účinnosti a toxicity účinných látek ve vztahu k bakteriálním kmenům (Melicherčíková, 2015).

### **2.3.3 Mucin jako možný selektivní faktor pro stanovení druhu *Bifidobacterium bifidum***

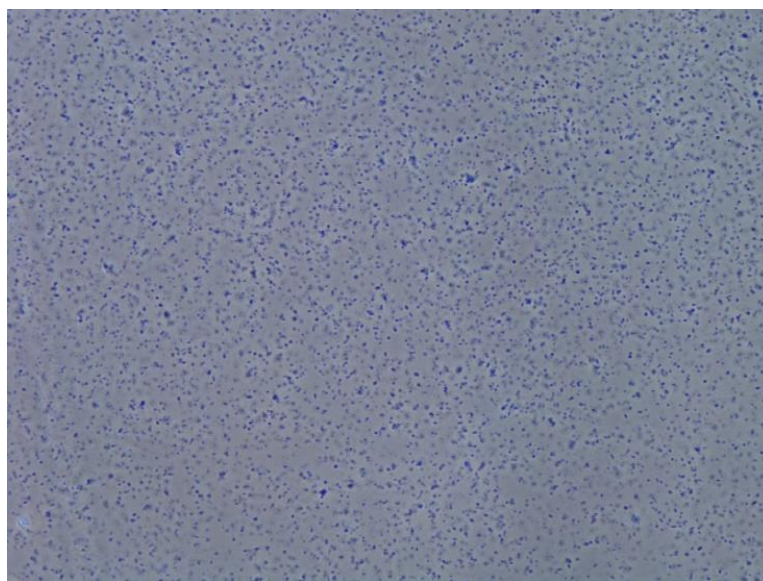
Ochrannou vrstvu kryjící enterocyty tvoří, spolu s buňkami imunitního systému a fyziologickou mikrobiotou, intestinální epitel (Hansson a Johansson, 2010; Belzer a de Vos, 2012). Ten obsahuje tzv. pohárkové (Gobletovy) buňky, které sekretují vysokomolekulární glykoproteiny, označované jako muciny. Dnes je jich identifikováno asi 20 typů, v tlustém střevě převládá mucin označený jako MUC2. Muciny jsou tvořeny peptidovým jádrem, na které jsou *O*- nebo *N*-glykosidickými vazbami navázány oligosacharidové řetězce, sestavené z jednoho či několika základních sacharidů (např. *N*-acetylglukosamin, *N*-acetylgalaktosamin, galaktosa, fukosa) a ty bývají zakončeny sialovými kyselinami či sulfátovými skupinami - tím je zajištěna vysoká odolnost vůči glykosidickému štěpení (Corfield, 1992). Sacharidová vrstva má velkou hydratační kapacitu, a také to uděluje mukóze vlastnosti, díky nimž je schopna plnit různé funkce: ze základních jmenujme proteolytickou resistenci, usnadnění pasáže tráveniny, tvorbu bariéry pro nebezpečné substance, toxiny či patogeny - ty je i sama schopna vázat a tím deaktivovat (Kunz et al., 2000). Velmi zajímavá je podobnost buněčných povrchových glykanů (mucin, glykolipidy) s OMM, disponujících funkcí tzv. rozpustných receptorů, tj. antiadhezivních, antimikrobiálních látek, které zabraňují uchycení různých enteropatogenů na epiteliální buňky, a tím chrání hostitele před kolonizací patogenními mikroorganismy (Hong et al., 2009).

A jak již bylo zmíněno, mukóza je také prostředím pro rezidentní mikrobiotu. Pro tu může vřdy přítomný mucin současně představovat důležitý zdroj energie, - zvláště v místech, kde jsou zdroje využitelných substrátů omezené. Taková situace právě nastává v prostředí tlustého střeva (MacFarlane et al., 1992). Některé druhy střevní mikrobioty jsou mucin schopné degradovat (*Tab. 4*), tato schopnost ale byla, ve většině, pozorována pouze ve směsné kultuře.

**Tab. 4 Bakteriální mucin-degradující enzymy, identifikované v lidském GIT (upraveno: Derrien et al., 2010).**

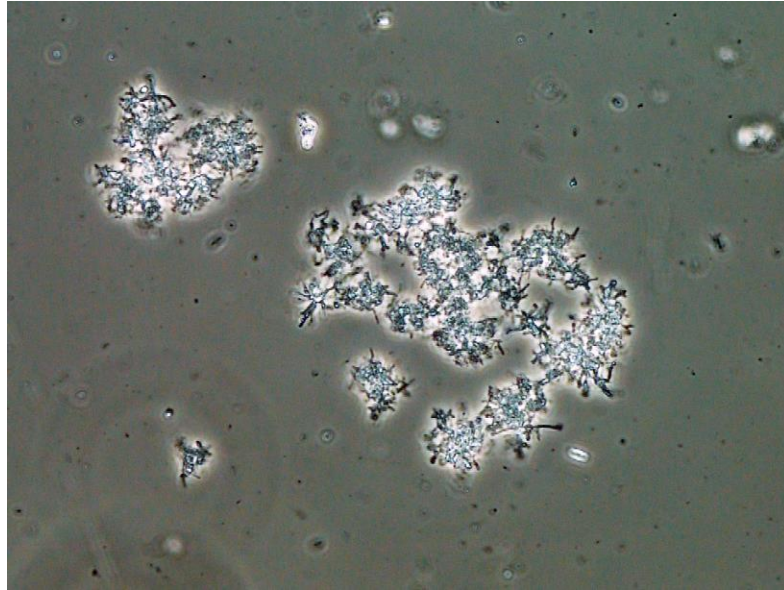
Druh	Enzymy	Literární zdroj
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\alpha$ - a $\beta$ -D-galaktosidasa, $\alpha$ -L fukosidasa, $\alpha$ - a $\beta$ -N-acetylgalaktosaminidasa, $\beta$ -N-acetylglukosaminidasa, neuraminidasa, sulfatasa	Derrien, 2007.
<i>Bacteroides fragilis</i>	proteasa, $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasa, $\beta$ -galaktosidasa, $\beta$ -N-acetyl-D-glukosaminidasa, $\alpha$ -L-fukosidasa, neuraminidasa, sulfatasa	Macfarlane a Gibson, 1991; Berg et al., 1983; Macfarlane et al., 1992.
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	$\alpha$ -fukosidasa, $\beta$ -galaktosidasa, $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasa, $\beta$ -N-acetylglukosaminidasa, neuraminidasa, sulfatasa	Xu et al., 2003; Tsai et al., 1992.
<i>Bacteroides vulgatus</i>	$\alpha$ - a $\beta$ -galaktosidasa, $\alpha$ -fukosidasa, $\beta$ -N-acetyl-D-glukosaminidasa, $\alpha$ - and $\beta$ -N-acetylgalaktosaminidasa, neuraminidasa	Ruseler-van Embden et al., 1989.
<i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Bifidobacterium bifidum</i>	$\alpha$ -L-fukosidasa, $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasa, galaktosyl-N-acetylhexosamin fosforylaza	Katayama et al., 2005.
<i>Clostridium cocleatum</i>	$\beta$ -galaktosidasa, $\beta$ -N-acetylglukosaminidasa, $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasa, neuraminidasa	Boureau et al., 1993.
<i>Clostridium septicum</i>	$\beta$ -Galaktosidasa, $\beta$ -N-acetyl-D-glukosaminidasa, glykosulfatasa, neuraminidasa	Macfarlane et al., 2001.
<i>Helicobacter pylori</i>	glykosulfatasa	Slomiany et al., 1992.
<i>Prevotella</i> sp. RS2	sulfoglykosidasa, glykosulfatasa	Wright et al., 2000; Rho et al., 2005
<i>Ruminococcus torques</i>	$\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasa	Hoeskins et al., 1997
<i>Streptomyces</i> sp.	$\alpha$ -L-fukosidasa	Goso et al., 2001

Několik druhů (např. *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* a *Bifidobacterium longum*) bylo schopno částečně mucin odbourávat také v čisté kultuře (Derrien et al., 2004). Taxony *B. longum* také *B. infantis* a *B. bifidum* produkují enzym  $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasu (Kiyohara et al., 2012), který z proteinového jádra mucinu odštěpuje O-glykosidicky vázaný disacharid galaktosyl-1,3-N-acetylgalaktosamin (Larson et al., 1988; Fujita et al., 2005), a u *B. longum* je navíc známá také N-acetylhexosamin 1-kinasa, schopná participovat při utilizaci mucinových oligosacharidů (Nishimoto a Kitaoka, 2007).



**Obr. 4** *Akkermansia muciniphila* DSM 22959, typový kmen kultivovaný v médiu s mucinem, jako jediným zdrojem uhlíku; foto: Nikon Eclipse E 200, kamera Nikon DS-Fi2, zvětšení 15 x 40, Pechar, 2017.

Dosud však známe pouze 3 druhy bakterií obývajících trávicí trakt, *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al., 2004; Obr. 4), *A. glycaniphila* (Ouwerkerk et al., 2016) a v této souvislosti již výše citovaný druh *Bifidobacterium bifidum* (Obr. 5), které jsou v čisté kultuře schopné využít mucin jako jediný zdroj uhlíku a lze je bez výhrad označit jako mucinolýtické (Killer and Marounek, 2011).



**Obr. 5: Růst *Bifidobacterium bifidum* JKM v médiu s mucinem, jako jediným zdrojem uhlíku; foto: Nikon Eclipse E 200, kamera Nikon DS-Fi2, zvětšení 15 x 40, Pechar, 2015.**

### **3 HYPOTÉZA**

Předpokládáme, že jednotlivé taxony probiotických bakterií se budou lišit svými fyziologickými vlastnostmi, v první řadě ve schopnosti využívat různé zdroje organického uhlíku a v rezistenci k antimikrobiálním látkám. Těchto vlastností bude využito jako selektivních faktorů ve vývoji nových kultivačních médií či postupů.

### **4 CÍL PRÁCE**

Cílem práce je vývoj nových médií či postupů, vhodných pro selektivní stanovení probiotických bakterií, v první řadě bifidobakterií, případně laktobacilů, či dalších bakterií obývajících trávicí trakt člověka, hospodářských zvířat a dalších živočichů. Pro rutinní kontrolu probiotických potravin je ideální vyvinout jednoduché postupy, snadno proveditelné v běžných laboratořích. Nově vyvinutá média budou dále využita pro izolaci nových kmenů potencionálních probiotik.

## **5 PUBLIKOVANÉ PRÁCE**

### ***5.1 Hodnocení probiotických výrobků Společností pro probiotika a prebiotika. Stanovení probiotických bakterií v potravinách a potravních doplňcích***

**2013**

**Pechar R., Rada V., Musilová Š., Bunešová V., Vlková E., Kmet' V., Killer J.**

***Mlékařské listy 139: 1-4***



## HODNOCENÍ PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ SPOLEČNOSTÍ PRO PROBIOTIKA A PREBIOTIKA

Radko Pechar<sup>1</sup>, Vojtěch Rada<sup>1</sup>, Šárka Musilová<sup>1</sup>,  
Věra Bunešová<sup>1</sup>, Eva Vlková<sup>1</sup>, Vladimír Kmetz<sup>2</sup>, Jiří Killer<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky,  
Česká zemědělská univerzita v Praze

<sup>2</sup> Ústav fyziologie hospodářských zvířat SAV, Košice

<sup>3</sup> Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR, Liběchov

### Testing of probiotic products by Society for Probiotics and Prebiotics

#### Abstrakt

Spoolečnost pro probiotika a prebiotika (SPP, [www.probiotika-prebiotika.cz](http://www.probiotika-prebiotika.cz)) zahájila testování probiotických potravin a potravních doplňků v roce 2009. Jsou testovány bifidobakterie a dále také laktobacily v mléčných kysaných výrobcích a lyofilizovaných prášcích, přičemž je stanovován celkový počet živých buněk v průběhu expirační doby. Testování probíhá podle IDF (International Dairy Federation) standardů a s použitím dalších metod. Výrobky vesměs splňují normu (kysané mléčné výrobky), nebo množství deklarované na obalu (lyofilizované produkty). V některých lyofilizovaných preparátech však byly nalezeny počty živých buněk mírně nižší, než udávají hodnoty uvedené na obalu. Kromě počtu živých buněk SPP provádí také izolaci čistých kultur a jejich identifikaci pomocí fenotypových a genotypových testů až na úroveň druhu, poddruhu a případně i kmene pomocí fingerprintových metod.

V mléčných kysaných výrobcích je prakticky výhradně nalézán druh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, zatímco v lyofilizovaných výrobcích bývají zastoupeny také druhy *B. longum*, *B. breve* a *B. bifidum*. Z laktobacilů bývají přítomny druhy *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* a *L. casei*.

SPP testuje také metody, jak selektivně stanovit ostatní probiotické mikroorganismy, jako jsou kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* a *S. boulardii*), enterokoky, *Escherichia coli* (v ČR jsou známy preparáty Mutaflor a Coliinfant), *Bacillus* spp. a další mikroorganismy.

Všichni výrobci a distributoři probiotik se mohou obrátit na SPP s žádostí o test svého produktu. Je třeba připomenout, že testy probíhají nad rámec standardních metod a průběžně se zařazují nové metody pro stanovení množství živých buněk (např. RT-PCR, FISH) a pro identifikaci druhů a kmenů (např. sekvence genů pro 16SrRNA a HSP60, MALDI-TOF MS). Případní zájemci také mohou kontaktovat přímo Laboratoř anaerobní mikrobiologie Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky ([rada@af.czu.cz](mailto:rada@af.czu.cz)) na ČZU v Praze, kde se testování pro SPP provádí.

**Klíčová slova:** probiotika, kysané mléčné výrobky, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, selektivní stanovení probiotických mikroorganismů

#### Abstract

Society for Probiotics and Prebiotics (SPP, [www.probiotika-prebiotika.cz](http://www.probiotika-prebiotika.cz)) began testing of probiotic foods and dietary supplements in 2009. Bifidobacteria and lactobacilli are tested in a milk fermented products and lyophilized powders. The total number of viable cells are determined during the expiration date. Testing carried out by IDF (International Dairy Federation) standards and by using other methods. The products generally meet the standard (fermented milk products), or the amount declared on the label (lyophilized product). In some of lyophilized preparations, however, were found living cell counts slightly lower than values indicated on the packaging. Besides the number of living cells SPP also performs the isolation of pure cultures and their identification using phenotypic and genotypic tests to the species, subspecies and possibly strain levels using fingerprint methods.

In fermented dairy products is usually almost exclusively found *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, whereas in lyophilized products are also represented species *B. longum*, *B. breve* and *B. bifidum*. The lactobacilli are present by species *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* and *L. rhamnosus*.

SPP also tested methods to selectively determine other probiotic microorganisms such as yeast (*Saccharomyces cerevisiae* and *S. boulardii*), enterococci, *Escherichia coli* (in the Czech Republic are known medications Mutaflor and Coliinfant), *Bacillus* spp. and other microorganisms.

All manufacturers and distributors of probiotics may apply to the SPP with a request to test their product. It should be noted that the tests are performed in excess of the standard methods and is continuously inserted new method for determining the amount of living cells (such as RT-PCR, FISH) and for the identification of species and strains (such as a gene sequence for 16SrRNA and HSP60, MALDI-TOF MS). Potential applicants may also contact the Laboratory of Anaerobic Microbiology, Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiological, Czech University of Life Sciences ([rada@af.czu.cz](mailto:rada@af.czu.cz)), where testing for the SPP is realised.

**Key words:** probiotics, fermented milk products, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, selective enumeration of probiotic microorganisms

#### Úvod

S ohledem na trvale rostoucí zájem spotřebitelů o sortiment potravin a potravních doplňků, které obsahují tzv. probiotika, je velmi aktuální vypracování postupů pro selektivní stanovení těchto mikroorganismů. Podle Organizace pro výživu a zemědělství a Světové zdravotnické organizace (FAO/WHO, 2001) jsou probiotika živé mikroorganismy přidávané do potravin, které při podávání v adekvátním množství pozitivně působí na trávicí trakt konzumenta. Pro rutinní kontrolu probiotických potravin je pak ideální vyvinout jednoduché postupy, snadno pro-



veditelné v běžných laboratořích. V současné době se však zdá vytvoření takových postupů nereálné a ke kontrole je proto potřebné také využití náročných technologií. Různé technologické přístupy je navíc nezbytné kombinovat. Proto, aby mohly být určité mikroorganismy využité jako probiotika, musí splňovat kritéria spojená s bezpečnostními, funkčními a technologickými vlastnostmi (Saarela et al., 2000). Mezi nejdůležitější požadované funkční vlastnosti probiotik patří použití hostitelsky specifických kmenů, rezistence vůči kyselému prostředí gastrointestinálního traktu a žlučovým solím, schopnost (alespoň přechodně) kolonizovat intestinální trakt, schopnost adherence na střevní epitel, antagonistické působení na patogenní bakterie, vyloučení faktoru patogenity, genetická stabilita a klinicky prokázané pozitivní zdravotní účinky. Z technologických vlastností je kladen důraz zejména na schopnost zachování ověřitelné životaschopnosti těchto mikroorganismů během procesu výroby a expirační doby produktu (Klaenhamer a Kullen, 1999; Kaur et al., 2002). Mikroorganismy je nutné identifikovat na úroveň rodu, druhu a kmene, pomocí fenotypových a molekulárně genetických metod, kmen musí být uložen v mezinárodní sbírce kultur. Pro určení bezpečnosti a účinnosti kmene jsou nutné *in vitro* testy a/nebo testy na zvířatech a poté také dvojité zaslepené, randomizované, placebem kontrolované (DZPK) klinické studie. Výrobek obsahující probiotické mikroorganismy pak musí obsahovat označení rodu, druhu a kmene a dále údaj o minimální koncentraci mikroorganismů do konce jeho záruční doby. S ohledem na tyto požadavky jsou jako probiotika nejčastěji využívány různé druhy laktobacilů a bifidobakterií. Logicky proto vznikl také požadavek pro jejich kvantitativní kontrolu. Podle mezinárodních ISO/IDF norem však v současnosti existuje pouze postup pro selektivní stanovení druhu *Lactobacillus acidophilus*. Pro ostatní druhy laktobacilů sice existuje požadavek ( $10^6$  v 1 g či 1 ml výrobku - tzv. terapeutické minimum) pro počet živých buněk obsažených v produktu do konce doby expirace, avšak neexistuje spolehlivá a závazná metoda jak požadovaný stav ověřit. Podobně u bifidobakterií existuje pouze ISO/IDF norma pro stanovení rodu *Bifidobacterium*, přičemž dosud nebylo možné rozlišit jednotlivé, v současné době používané, druhy.

## Materiál a metody

Pro testování bakterií obsažených v probiotických výrobcích bylo v první řadě použito jejich stanovení pomocí dostupných selektivních médií. Dále byla provedena identifikace na úroveň rodu (F6PPK, PCR) a na úroveň druhu a kmene (API, PCR, MALDI-TOF MS, sekvenace genů - 16SrRNA, HSP60). DNA vzorků byla izolována podle protokolu PrepMan® (Applied Biosystems®). Pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS byly připraveny čerstvě narostlé kultury (Kmet a Drugdova, 2012). Stanovení bifidobakterií je upraveno normou ISO 29981:2010 (IDF 220). Stanovení bifidobakterií v mléčných produktech. Bylo použito médium TOS s mupirocinem (50 mg/l), při pH 7,4 probíhala kultivace

anaerobně 48 hodin při 37°C. Pro selektivní stanovení *Bifidobacterium bifidum* bylo využito jeho schopnosti utilizovat mucin. Bylo testováno médium sestávající z tryptonu (5,0 g/l), živného bujónu č. 2 (25,0 g/l), kvasničného autolyzátu (2,5 g/l), tweenu (0,5 ml/l), cysteinu (0,25 g/l), mucinu (20 g/l) a bromkresolové červeně (0,01 g/l). Byl vyvinut selektivní MM (mucin, mupirocin) agar pro stanovení druhu *B. bifidum*. Složení MM agaru: trypton (5,0 g/l), živný bujón (Nutrien) (5,0 g/l), kvasničný autolyzát (Yest) (2,5 g/l), tween (0,5 ml/l), cystein (0,25 g/l), technický agar (10 g/l), mucin (20 g/l), mupirocin (100 mg/l). Pro selektivní stanovení *B. longum* a *B. breve* byla vyvinuta selektivní média s obdobným základním složením (MM bez mucinu), kde jako zdroj uhlíku byly použity: pro *B. longum* turanosa a pro *B. breve* sorbitol a mannitol. Stanovení *Lactobacillus acidophilus* bylo provedeno podle normy ISO 20128:2006 (IDF 192). Stanovení *Lactobacillus acidophilus* v mléčných produktech. Zde bylo použito médium MRS s klindamycinem (0,1 mg/l), médium však není dostatečně selektivní a nebylo možné jím odlišit řadu jiných druhů laktobacilů a rovněž kvasinky. Pro stanovení *L. casei* mezinárodní ISO/IDF norma neexistuje. Zde byl použit MRS agar (Oxoid) s přídavkem 1,5% žluči (Oxoid) a pH 5,4 (Vinderola a Reinheimer, 2000). Na Rogosa agaru při pH 5,4 probíhala kultivace anaerobně 14 dnů při 15 °C (Champagne et al., 1997).

## Výsledky a diskuse

Perspektivní probiotický druh, typický pro trávicí trakt člověka, je *Bifidobacterium bifidum*. Často se vyskytuje u kojených novorozenců, dobře využívá oligosacharidy mateřského mléka a je schopen využívat mucin. Setkáme se s ním hlavně v lyofilizovaných probiotických produktech. Byl navržen MM agar (mucin, mupirocin agar), který se ukázal být vhodný ke kultivačnímu stanovení druhu *B. bifidum*. Byly stanoveny počty *B. bifidum* v testovaných výrobcích v řádech od  $10^6$  do  $10^7$  KTJ/g výrobku (Tab. 1).

Tab. 1 Počty kolonií *Bifidobacterium bifidum* na MM agaru

Výrobek	LogKTJ / 1 g výrobku
Lepicol	8,05
Biopron Junior	8,06
Laktobacilky Baby	7,9
Probioflora	7,18
AB Aktiv	7,16

Dále byly stanoveny druhy *B. longum* a *B. breve*. Byla užita vyvinutá selektivní média, modifikované MM médium, s různými zdroji uhlíku: pro stanovení *B. longum* turanosa, pro *B. breve* sorbitol a mannitol.

Kultivační selektivní stanovení druhů *B. bifidum*, *B. longum* a *B. breve* bylo potvrzeno užitím druhově specifické PCR a dalších metod (Tab. 2, Obr. 1). Kmeny bifidobakterií byly identifikovány pomocí pozitivní F6PPK, rodové i druhové PCR, API 50 CHL, Rapid ID 32 A a MALDI-TOF MS.

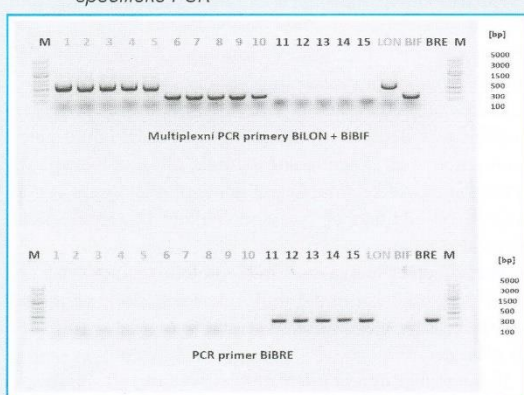


**Tab. 2** Identifikace bifidobakterií izolovaných z probiotických výrobků

Výrobek	F6PPK	PCR rodová	PCR druhová	API 50 CH	Rapid ID 32 A
Lepicol	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
Pangamin Bifi	+/-	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>
Probioflora	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
Biopron Junior	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
Candi Stop	+/-	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i>
Lactobene	+/-	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
Laktobacilky Baby	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
AB Aktiv	+	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>

(Pozn.: PCR dle Matsuki et al., 2003; F6PPK: + pozitivní, +/- nejednoznačný výsledek)

**Obr. 1** Selektivní stanovení a identifikace bifidobakterií *B. bifidum*, *B. longum* a *B. breve* pomocí druhově specifické PCR

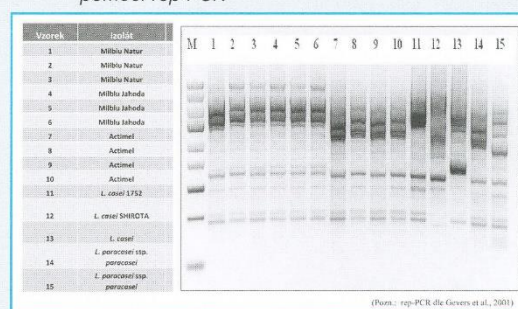


Mléčné kysané výrobky obsahovaly *Lactobacillus casei* v rádech od  $10^6$  do  $10^8$  KTJ/g výrobku (Tab. 3). Byla také provedena identifikace *Lactobacillus casei* na úroveň kmene (Actimel, Milblu). Vyhodnocení biochemických testů API 50 CHL programem Apibeb u produktů: Milblu Natur: *L. paracasei* subsp. *paracasei* (99,7 %; 0,79 T), Milblu Jahoda: *L. paracasei* subsp. *paracasei* (99,8 %; 0,775 T), Actimel (Natur, Jahoda): *L. paracasei* subsp. *paracasei* (99,6 %; 0,83 T), korespondovalo s rep-PCR (Obr. 2). Pro potvrzení získaných výsledků byla provedena sekvenace genů 16S rRNA a HSP60 (Obr. 3). Kmeny z Danone a Milblu se u 16S rRNA nelišily, lišily se však ve dvou bázích u genu pro HSP60.

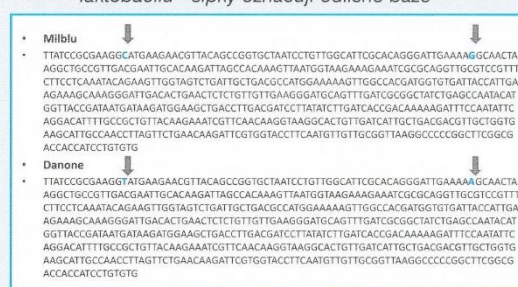
**Tab. 3** Počty kolonií izolovaných laktobacilů (*Lactobacillus casei*)

Výrobek	LogKTJ / 1 g výrobku
Actimel Jahoda	8,93
Actimel Natur	8,92
Probiotický drink natural	8,31
Bifidus Natur	7,8
Vian Probiotic Drink	7,73
Vivacto Probiotic jogurt drink	7,72
Acti Plus Drink	7,71
Probiotic Drink Classic	6,78

**Obr. 2** Charakterizace *Lactobacillus casei* a příbuzných druhů izolovaných z mléčných kysaných výrobků pomocí rep-PCR



**Obr. 3** Sekvenace genu pro HSP60 u dvou kmenů laktobacilů - šipky označují odlišné báze



**Závěr**

Stanovení většiny druhů bifidobakterií v potravinách je možné a spolehlivé. Médium s mucinem je vhodné pro selektivní stanovení *B. bifidum*, lze selektivně stanovit i ostatní aplikované druhy bifidobakterií.

Je nutné vypracovat spolehlivou normu pro stanovení *L. casei* a *L. acidophilus*. Metody fungující pro mléčné výrobky nemusí fungovat pro jiné potraviny (fermentované masné výrobky).

Stanovení kvasinek v probiotických výrobcích je snadné, jejich identifikace je však problematická.

**Obr. 4** Výrobci, kterým SPP udělila právo používat logo společnosti

**Logo SPP uděleno**

- Firmě Danone a.s., Konopištská 905, 256 37 Benešov za výrobky
  - Activia nápoj \*
  - Activia lehká & fit \*
  - Actimel Natur
  - Actimel Jahoda
- Firmě ASP Czech s.r.o., K Teplínám 679, Slušovice za výrobek
  - Lepicol
- S&D Pharma Ltd., Westfield Lane, Harrow HA39ED, Velká Británie za výrobky
  - Probio-Fix \*
  - Probio-Fix Imun \*
- Valosun a.s., Kytnerova 403/5, 621 00, Brno za výrobek
  - Biopron Junior

\* testované výrobky nezmínované v článku



Většina výrobků, testovaných SPP v roce 2013, obsahovala deklarované mikroorganismy, počty živých bakterií byly však v některých případech nižší.

Na základě výsledků realizovaných testů uděluje SPP výrobcům právo používat logo společnosti (Obr. 4).

### Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory NAZV v rámci grantu QJ1210093 - Nové metody pro výrobu, kontrolu kvality a účinků probiotických potravin.

### Literatura

- ISO 29981:2010 (IDF 220: 2010). Milk products - Enumeration of presumptive bifidobacteria - Colony count technique at 37 degrees C.  
 ISO 20128:2006 (IDF 192: 2006). Milk products - Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium - Colony count technique at 37 degrees C.  
 Champagne C.P., Roy D., Lafond A. (1997): Selective enumeration of *Lactobacillus casei* in yoghurt-type fermented milks based on a 15°C incubation temperature. *Biotechnology Techniques* 8, 567-569.  
 Gevers D., Huys G., Swings J. (2001): Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205, 31-36.  
 Kaur I.P., Chopra K., Saini A. (2002): Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 1-9.  
 Klaenhammer T.R., Kullen M.J. (1999): Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50, 45-57.  
 Kmet V., Drugdova Z. (2012): Antimicrobial susceptibility of microflora from ovine cheese. *Folia Microbiologica*, 57, 291-293.  
 Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R. (2003): Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4, 61-69.  
 Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.  
 Vinderola C.G., Reinheimer J.A. (2000): Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic acid starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10, 271-275.

Pozn.: Další literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku: 6. 5. 2013

Lektorováno: 22. 6. 2013

## STANOVENÍ LAKTOSY V MLÉČNÝCH MATERIÁLECH S UPRAVENÝM OBSAHEM MLÉČNÉ SUŠINY METODOU HPLC

Borková Markéta<sup>1</sup>, Marková Marie<sup>1</sup>, Mošnová Romana<sup>2</sup>,  
Elich Ondřej<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>2</sup> MILCOM a.s., Praha

### Determination of lactose in dairy materials with modified milk dry matter content by HPLC

#### Abstrakt

Laktosa byla v mléčných materiálech s upraveným obsahem mléčné sušiny stanovena technikou vysokoúčinné

kapalinové chromatografie na koloně Phenomenex Luna NH<sub>2</sub> s refraktometrickou detekcí. Kvantifikace laktosy byla provedena metodou přidavku vnitřního standardu monohydrátu D(+)-melezitosy.

Podrobněji byl sledován vliv navýšení obsahu mléčných bílkovin v mléčném vzorku přidavkem tekutých mléčných retentátů, sušeného nízkotučného a plnotučného mléka na obsah laktosy ve vzorku. V případě tekutých retentátů nebyl zaznamenán významný rozdíl v obsahu laktosy. Přídavkem sušeného mléka se obsah laktosy zvýšil z původních 4,65 g/100 g na 4,93 až 5,66 g/100 g. Výsledky stanovení laktosy technikou HPLC odpovídaly předpokládanému obsahu laktosy vypočtenému z hmotnostní bilance výchozí suroviny a jednotlivých přidavků. Získané výsledky potvrdily, že metoda HPLC je vhodná pro stanovení laktosy v mléčných matricích s upraveným obsahem mléčné sušiny.

**Klíčová slova:** laktosa, HPLC, bílkovinné koncentráty

#### Abstract

Lactose in milk material with modified milk dry matter content was determined using high pressure liquid chromatography on Phenomenex Luna NH<sub>2</sub> column with refractometric detection. Quantification of lactose was performed by addition of the monohydrate D(+)-melezitose internal standard.

The effect of increase of milk proteins content in milk sample by addition liquid milk retentates, dried skim and whole milk for lactose content of the sample was followed in great detail.

In the case of liquid retentate wasn't observed significant difference in the content of lactose. The content of lactose was increased by addition of dried milk from original 4.65 g/100 g to 4.93 up to 5.66 g/100 g. The results of determination of lactose by HPLC were similar as presumed content of lactose calculated from the mass balance of individual portions. The results verified that the method is suitable for HPLC determination of lactose in dairy materials with modified milk dry matter content.

**Keywords:** lactose, HPLC, protein concentrates

#### Úvod

V současné době je v mlékárenském průmyslu patrný trend vývoje nových výrobků, u kterých jsou uplatňovány zdokonalené a nové prvky technologie (např. ultrafiltrace), při kterých dochází ke změně složení obsahu složek mléčné sušiny vstupní suroviny. S tímto rozvíjejícím se trendem zavádění nových mléčných produktů obohacených o jednotlivé složky mléčné sušiny, je nutností zavést a optimalizovat vhodné metody pro stanovení jednotlivých složek mléčné sušiny, které nejsou rušeny změnou matrice vzorku.

V praxi se často používá navýšení obsahu mléčných bílkovin v mléčné matrici, a proto byla pozornost zaměřena zejména na vliv přidavku mléčné bílkoviny na obsah laktosy ve finálním produktu. Přídavek bílkovinné složky do vstupní suroviny na výrobu mléčných výrobků může být

**5.2 Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements**

**2015**

Bunesova V., Musilova S., Geigerova M., **Pechar R.**, Rada V.

*Journal of Microbiological Methods 109: 106-109*



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)

## Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements



Vera Bunesova<sup>\*</sup>, Sarka Musilova, Martina Geigerova, Radko Pechar, Vojtech Rada

Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, Prague 6-Suchbát, 16521, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 October 2014

Received in revised form 7 December 2014

Accepted 23 December 2014

Available online 24 December 2014

#### Keywords:

Bifidobacteria  
Probiotic supplements  
Enumeration  
Selective media  
Mupirocin

### ABSTRACT

An international standard already exists for the selective enumeration of bifidobacteria in milk products. This standard uses Transgalactosylated oligosaccharides (TOS) propionate agar supplemented with mupirocin. However, no such standard method has been described for the selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements, where the presence of bifidobacteria is much more variable than in milk products. Therefore, we enumerated bifidobacteria by colony count technique in 13 probiotic supplements using three media supplemented with mupirocin (Mup; 100 mg/l): TOS, Bifidobacteria selective medium (BSM) and modified Wilkins-Chalgren anaerobe agar with soya peptone (WSP). Moreover, the potential growth of bifidobacterial strains often used in probiotic products was performed in these media. All 13 products contained members of the genus *Bifidobacterium*, and tested mupirocin media were found to be fully selective for bifidobacteria. However, the type strain *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 and collection strain *B. bifidum* DSM 20239 showed statistically significant lower counts on TOS Mup media, compared to BSM Mup and WSP Mup media. Therefore, the TOS Mup medium recommended by the ISO standard cannot be regarded as a fully selective and suitable medium for the genus *Bifidobacterium*. In contrast, the BSM Mup and WSP Mup media supported the growth of all bifidobacterial species.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Bifidobacteria are probiotic microorganisms that are widely used in the food industry (Miranda et al., 2011). Probiotic microorganisms are usually available as culture concentrates in dried or deep-freeze form to be added to a food for industrial or home uses (Tripathi and Giri, 2014). In addition to the food probiotics, there are various health products and pharmaceutical preparations containing probiotics on the market (Saad et al., 2013). The most commonly used species of probiotic bacteria in lyophilised form and milk products are *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*. The amount of probiotic bacteria required for therapeutic effect is considered to be in the range of  $10^9$  cells of live microorganisms per day. To exert a beneficial effect, the bacteria must remain viable in the product until the time of consumption. Commercially available probiotics are usually in the form of freeze-dried, powdered bacteria or in the capsule-packed forms, which can affect their persistence and viability. According to Makinen et al. (2012) there are three major factors governing the stability of probiotics during manufacture and storage; strain robustness, process and storage

conditions. The manufacturer should correctly inform customers about bacteria amounts and species composition in the product. A widely used method for the microbiological control of food quality, including probiotics, is culturing. Different culture media have been proposed for the selective enumeration of bifidobacteria (Ashraf and Shah, 2011; Karimi et al., 2012; Roy, 2001). There also exists an ISO standard for the enumeration of bifidobacteria in food, such as milk products. The ISO standard, denoted by ISO 29981:2010 (IDF 220:2010) use a colony count technique performed at 37 °C under anaerobic conditions on Transgalactosylated oligosaccharides propionate agar (TOS, Yakult Pharmaceutical Industry, Co., Ltd., Tokyo, Japan) supplemented with mupirocin. This method is applicable for milk products such as fermented and non-fermented milk, milk powders, infant formulas and starter cultures. The TOS-mupirocin agar is selective even when bifidobacteria are present in combination with lactic acid bacteria. The basal medium (TOS) has for many years been commercially produced and marketed exclusively by Yakult-Japan. However, both the TOS and mupirocin are now licenced, produced and marketed by VWR in Europe and around the world (Raeisi et al., 2013). The use of mupirocin as a selective factor for the isolation and quantification of bifidobacteria in fermented dairy products was first described by Rada and Koc (2000). The authors of this study recommended the use of Wilkins-Chalgren agar (Oxoid, Thermofisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) supplemented with mupirocin (100 mg/l). This agar was modified with the addition of

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Kamycka 129, Prague, Czech Republic.  
E-mail address: [bunesova@af.czu.cz](mailto:bunesova@af.czu.cz) (V. Bunesova).



soya peptone (5 g/l), L-cysteine (0.5 g/l), and Tween 80 (1 ml/l; Bunešová et al., 2012). Soya peptone contains galactooligosaccharides, which promote the growth of bifidobacteria. Another commercial agar for the enumeration of bifidobacteria is available from Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

However, no standard method has been described for the selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. The use of bifidobacteria in pharmaceutical supplements is becoming increasingly popular, resulting in a wide variety of products being marketed with specific or generic claims of health benefits. These products often contain multispecies probiotic microorganisms indicating the presence of species other than bifidobacteria. The aim of this study was to evaluate different mupirocin selective media for the enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements.

## 2. Material and methods

### 2.1. Culture media

Three agars (Table 1) supplemented with mupirocin lithium salt at a concentration of 100 mg/l (Mup; Oxoid, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) were used in this study for the quantification of the most commonly used bifidobacterial species and bifidobacteria in different probiotic supplements.

### 2.2. Testing of pure bifidobacterial strains

The growth characteristics of *Bifidobacterium* sp. type strains of species often used in probiotic products were tested on different agars. The tested strains included *B. adolescentis* DSM 20083 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Leibniz, Germany), *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140, *B. bifidum* DSM 20456, *B. breve* DSM 20213, *B. longum* ssp. *infantis* DSM 20088 and *B. longum* ssp. *longum* DSM 20219. The *B. bifidum* collection strains DSM 20082, DSM 20215 and DSM 20239 were also added for verification of the results.

Cultures of pure bifidobacterial strains grown anaerobically overnight were serially diluted and inoculated into Petri dishes which were immediately filled with tested agars, and cultivated in anaerobic atmosphere (AnaeroGen Compact System, Oxoid) at 37 °C for 2 days.

### 2.3. Enumeration of bifidobacteria in probiotic products

A total of 13 different human and animal probiotic supplements (lyophilized capsules, sachets and drops) commercially available in the European market (Table 2) were analysed. All the probiotic products were tested prior to the expiration date indicated on the labels of the product and were stored according to the manufacturer's recommendations.

One gramme or millilitre of each probiotic product was aseptically homogenised in 9 ml of sterile Saline peptone diluent (Oxoid) and serially diluted under anaerobic conditions (roll-tube technique; Hungate, 1969). The appropriate dilutions were transferred to sterile dishes and immediately filled with media listed in Table 1. All the probiotic

products were tested in triplicate. The plates were incubated as described in Section 2.2.

### 2.4. Evaluation of agar selectivity

Twenty colonies per each sample and media were selected for further confirmatory tests. Pure isolates were cultivated in Wilkins-Chalgren broth supplemented with soya peptone (5 g/l, Oxoid). Tests were conducted for morphology, Gram staining, and fructose-6-phosphate phosphoketolase (specific enzyme for Bifidobacteriaceae family) activity (F6PPK-test; Orban and Patterson, 2000) in order to confirm the selectivity of the MUP agar for bifidobacteria.

### 2.5. Statistical analyses

Bifidobacterial counts were converted to log<sub>10</sub> Colony Forming Unit (CFU) per g or ml. The results, based on triplicate analysis of probiotic bacteria in the selective media (TOS Mup, BSM Mup, and WSP Mup) were evaluated by multiple range comparison. Multiple range tests ( $p < 0.001$ ) were performed using Statistica (Statistica 12.0, Tulsa, USA). The same statistical test was used to compare the growth of pure cultures in the tested media.

## 3. Results and discussion

All the tested pure cultures of bifidobacterial type strains were able to grow on all sets of tested media, in counts ranging from 5.78 to 10.25 log CFU/ml (Table 3), depending on the primary growth of individual strain in the enrichment media. All tested bifidobacterial type strains except for the type strain *B. bifidum* DSM 20456 showed similar counts on all three tested agars and no significant differences were found (Table 3). On the other hand, the type strain *B. bifidum* DSM 20456 showed a statistically significant lower increase in growth in TOS Mup medium, compared to WSP Mup and BSM Mup media. This increase was detected even in titrations where the order of magnitude of bacterial number was four times less. These results were verified by testing the three collection strains of *B. bifidum* (DSM 20082, DSM 20215 and DSM 20239). We observed that two of the collection strains (DSM 20082 and DSM 20215) showed growth on all tested media with identical counts (Table 3). However, the strain *B. bifidum* DSM 20239 again showed a statistically significant lower increase in TOS Mup media compare to WSP Mup and BSM Mup media. The lower counts of *B. bifidum* DSM 20456 and DSM 20239 may be due to the fact that these strains have limited abilities to utilize transgalactosylated oligosaccharides. TOS agar contains transgalactosylated oligosaccharides obtained by the transformation of lactose by the enzyme  $\beta$ -galactosidase, magnesium sulphate for enhancing recovery and growth of injured bifidobacteria, and sodium propionate as an inhibitor for other adjunct flora (Raeisi et al., 2013). These galacto-oligosaccharides as a specific substrate for bifidobacteria, however, cannot be specific to all bifidobacterial species. According to Miranda et al. (2014), the strain *B. animalis* ssp. *animalis* CIRMEDIA 1335 also showed no colony forming in these media. Moreover, many physiological characteristics of bifidobacteria are species- or strain-specific.

**Table 1**  
The media used for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products.

	Medium abbreviation	Medium name (producer)	Final concentration of additives
Mupirocin media (100 mg/l)	TOS Mup	TOS-propionate agar (Yakult Pharmaceutical Industry)	Acetic acid (final pH 6.3 + 0.2; at 25 °C)
	BSM Mup	Bifidobacteria selective medium (Fluka)	BSM supplement (0.116 g/l)
	WSP Mup	Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid)	Soya peptone (5 g/l) L-cysteine (0.5 g/l) Tween 80 (1 ml/l)

**Table 2**  
Tested products and declared bacterial composition.

Product	Producer	Origin	<i>Bifidobacterium</i> strains	<i>Lactobacillus</i> and other strains
Super Dophilus	Pharma Agency, s.r.o.	Canada	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
Probio-fix	S&D Pharma Ltd.	United Kingdom	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. acidophilus</i>
Infant Acidophilus	Swiss Herbal Remedies Ltd.	Canada	<i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i>	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i>
Biopron Junior	Valosun a.s.	Czech Republic	<i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i>	<i>L. acidophilus</i>
Bifolac Balance	Bifodan A/S	Denmark	<i>B. longum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
Apo-Baby Probio	Cell Biotech International A/S	Denmark	<i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i>	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Lactobene	Montefarmaco Milano for NTC S.r.l.	Italy	<i>B. bifidum</i>	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Bifiform (drops)	Ferrosan SRL	Romania	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Apo-Lactobacillus 10+	Profarma-Produkt s.r.o.	Czech Republic	<i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
GS Lactobacily FORTE 20	Green-Swan Pharmaceuticals CR, a.s.	Czech Republic	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>paracasei</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biolac Baby drops	Probiotech S.p.A.	Italy	<i>B. breve</i>	<i>L. plantarum</i>
Bio-Kult	Protexin®	United Kingdom	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
Doggy Care	Harmonium International Inc.	Canada	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Enterococcus faecium</i>

The presence of the genus *Bifidobacterium* was observed in all the tested probiotic products. The mupirocin media used were found to be fully selective, and all isolates were identified as bifidobacteria. The mupirocin antibiotic suppresses growth of lactobacilli, lactococci, leuconostocs, and streptococci without any inhibitory action towards bifidobacteria (Rada and Koc, 2000; Raesi et al., 2013), which corresponds with our results.

**Table 3**  
Results of bifidobacteria enumeration of pure culture and in tested products ( $\log_{10}$  CFU/g  $\pm$  SD).

Pure culture	BSM Mup	TOS Mup	WSP Mup
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083 <sup>a</sup>	8.63 $\pm$ 0.2	8.71 $\pm$ 0.03	8.64 $\pm$ 0.02
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 <sup>a</sup>	8.84 $\pm$ 0.05	8.88 $\pm$ 0.01	8.87 $\pm$ 0.01
<i>B. bifidum</i> DSM 20456 <sup>a</sup>	9.66 $\pm$ 0.05	<sup>c</sup> 5.78 $\pm$ 0.11	9.56 $\pm$ 0.05
<i>B. bifidum</i> DSM 20082 <sup>b</sup>	10.25 $\pm$ 0.02	10.14 $\pm$ 0.04	10.16 $\pm$ 0.06
<i>B. bifidum</i> DSM 20215 <sup>b</sup>	10.05 $\pm$ 0.03	9.91 $\pm$ 0.05	9.96 $\pm$ 0.03
<i>B. bifidum</i> DSM 20239 <sup>b</sup>	8.47 $\pm$ 0.03	<sup>c</sup> 6.76 $\pm$ 0.03	8.60 $\pm$ 0.13
<i>B. breve</i> DSM 20213 <sup>a</sup>	9.02 $\pm$ 0.02	9.03 $\pm$ 0.04	9.03 $\pm$ 0.02
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> DSM 20088 <sup>a</sup>	8.44 $\pm$ 0.03	8.38 $\pm$ 0.01	8.37 $\pm$ 0.04
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20219 <sup>a</sup>	6.83 $\pm$ 0.02	6.78 $\pm$ 0.01	6.85 $\pm$ 0.02
Mean of strains	8.92 $\pm$ 1.00	8.27 $\pm$ 1.45	8.89 $\pm$ 0.95
Product	BSM Mup	TOS Mup	WSP Mup
Apo-Lactobacillus 10+	8.58 $\pm$ 0.00	8.85 $\pm$ 0.01	8.53 $\pm$ 0.02
Apo-Baby Probio	8.42 $\pm$ 0.01	8.59 $\pm$ 0.05	8.71 $\pm$ 0.02
Bifiform (drops) <sup>c</sup>	5.03 $\pm$ 0.02	5.23 $\pm$ 0.05	5.04 $\pm$ 0.01
Bifolac Balance	8.64 $\pm$ 0.05	8.64 $\pm$ 0.04	8.57 $\pm$ 0.05
Bio-Kult	8.50 $\pm$ 0.02	8.48 $\pm$ 0.01	8.53 $\pm$ 0.02
Biolac Baby drops <sup>c</sup>	9.34 $\pm$ 0.02	9.38 $\pm$ 0.01	9.35 $\pm$ 0.01
Biopron Junior	9.20 $\pm$ 0.02	9.17 $\pm$ 0.04	9.20 $\pm$ 0.04
GS Lactobacily Forte 20	8.47 $\pm$ 0.01	8.19 $\pm$ 0.02	8.12 $\pm$ 0.03
Infant Acidophilus	9.32 $\pm$ 0.02	9.58 $\pm$ 0.01	9.43 $\pm$ 0.07
Lactobene	7.19 $\pm$ 0.02	7.33 $\pm$ 0.03	7.19 $\pm$ 0.03
Probio-fix	10.32 $\pm$ 0.04	10.45 $\pm$ 0.02	10.38 $\pm$ 0.03
Super Dophilus	9.41 $\pm$ 0.01	9.52 $\pm$ 0.01	9.37 $\pm$ 0.02
Doggy Care	10.05 $\pm$ 0.04	10.07 $\pm$ 0.02	10.08 $\pm$ 0.02
Mean of products	8.53 $\pm$ 1.30	8.61 $\pm$ 1.29	8.54 $\pm$ 1.32

Footnote: TOS: Transgalactosylated oligosaccharides propionate agar, BSM: Bifidobacteria selective medium, WSP: Wilkins-Chalgren anaerobe agar with soja peptone; Mup: mupirocin lithium salt (100 mg L<sup>-1</sup>), DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH.

<sup>a</sup> Type strain.

<sup>b</sup> Collection strain.

<sup>c</sup>  $\log_{10}$  CFU/ml  $\pm$  SD – drops.

<sup>d</sup> Significant differences among bacterial counts in tested media  $p < 0.001$ .

No bacteria other than bifidobacteria were found growing on the selective agars supplemented with mupirocin (100 mg/l). The ISO/IDF (International Dairy Federation) standard states that the antibiotic mupirocin lithium salt (50 mg/l) inhibits the growth of most lactic acid bacteria commonly used in fermented and non-fermented dairy products. However, the 50 mg/l dosage was not found to be fully selective in our preliminary tests (data not shown). All tested agars supplemented with a mupirocin dose of 100 mg/l were found to be suitable for the selective enumeration of bifidobacteria in all types of probiotic products such as capsules, sachets and drops. The bifidobacterial colony counts of the individual products tested in our study did not significantly differ ( $p < 0.001$ ; Table 3) between TOS Mup, BSM Mup, and WSP Mup.

The dose of ingested probiotic is an important factor impacting its concentration in the different parts of the gastrointestinal tract (Savard et al., 2011). Therefore, a standard acceptable level for probiotic bacteria may never be established, and it may not be possible to define the 'adequate numbers' referred to in the Food and Agricultural Organisation/World Health Organisation definition (Raesi et al., 2013). Also, according to Verna and Lucak (2010), the optimal number of CFU for each probiotic bacterial strain remains unknown. Doses of bacteria used for human trials are based on those tested during animal studies, despite the differences in intestinal surface area. An almost arbitrary dosage of 10<sup>9</sup> probiotic bacteria per day appears to have been concluded as optimal, presumably based on the appearance of the probiotic organism in the faeces of the majority of human subjects when this daily dose is consumed (Tannock, 2003). As probiotics are live organisms, it is critical to accurately enumerate the population of viable microbes in the preparation and to provide this information to the consumer on the product label (Davis, 2014). Commercially available probiotic formulations typically have at least 10<sup>6</sup> bacteria; however, they may carry up to 10<sup>12</sup> probiotic bacteria in 1 g. Therefore, product consumption should be controlled in order to achieve the minimal recommended dose of bacteria (10<sup>9</sup> per day). The bifidobacterial counts in the tested probiotic products are reported in Table 3, and are observed to vary between 10<sup>5</sup> and 10<sup>10</sup> CFU/g. Only one product (Bifiform) contained less than 10<sup>6</sup> CFU/ml of bifidobacteria. It was difficult to evaluate if the tested products contained sufficient numbers of bifidobacteria, as multispecies probiotic supplements do not declare the percentage of each bacterial species. This made it impossible to examine the total count of genus *Bifidobacterium*. The declared bacterial counts were equated to the amount in one capsule. However, as the weight of the capsule was not



reported, this complicated the setting of the control. Only four multispecies products (Super Dophilus, Infant Acidophilus, Apo-Baby Probio and Doggy Care) clearly declared the numbers of bifidobacteria, and our studies confirmed the specified values. The information supplied by the manufacturer is often not sufficient, and it is necessary to focus on the regulation and control of the probiotic market. The regulations regarding the identity of safe microorganisms are more definitive; as suggested by the European Food Safety Authority (2004), and Sanders (2009), the genus, species and strain of probiotic microorganisms should be clearly indicated on the label. Microbial analyses of probiotic products for human consumption have shown that the number and identity of the recovered species do not always correspond to those stated on the labels (Coeuret et al., 2004; Temmerman et al., 2003).

#### 4. Conclusion

BSM and WSP media supplemented with mupirocin at a concentration of 100 mg/l were determined to be suitable for the selective enumeration of bifidobacteria in the various probiotic supplements tested using a colony count technique under anaerobic conditions. In addition, the data presented by the manufacturer on the packaging was often found to be insufficient for clear verification of the bifidobacterial number in the probiotic supplements.

#### Acknowledgements

This study was supported by grants GP14-31984P and GP14-31501P of the Grant Agency of the Czech Republic and CIGA 20132023 of the Grant Agency of Czech University of Life Sciences Prague.

#### References

- Ashraf, R., Shah, N.P., 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt – A review. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 194–208.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Ročková, Š., Svobodová, I., Jebavý, I., Kmet', V., 2012. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains isolated from dog faeces. *Vet. Microbiol.* 160, 501–505.
- Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J.P., 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 147–156.
- Davis, C., 2014. Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J. Microbiol. Methods* 103, 9–17.
- EFSA, 2004. European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Colloquium on Microorganisms in Food and Feed: Qualified Presumption of Safety.
- Hungate, R., 1969. Chapter IV a roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* 3, 117–132.
- ISO/IDF, 2010. Milk products—enumeration of presumptive bifidobacteria-colony count technique at 37 °C. ISO Standard 29981/IDF 220: 2010.
- Karimi, R., Mortazavian, A.M., Amiri-Rigi, A., 2012. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food Microbiol.* 29, 1–9.
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhlim, R., Ananta, E., 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J. Biotechnol.* 162, 356–365.
- Miranda, R.O., Neto, G.G., de Freitas, R., de Carvalho, A.F., Nero, L.A., 2011. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm (TM) AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol.* 28, 1509–1513.
- Miranda, R.O., de Carvalho, A.F., Nero, L.A., 2014. Development of a selective culture medium for bifidobacteria, Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin (RP-MUP) and assessment of its usage with Petrifilm™ Aerobic Count plates. *Food Microbiol.* 39, 96–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.010> (ISSN 0740-0020, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002013002311>).
- Orban, J.I., Patterson, J.A., 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Methods* 40, 221–224.
- Rada, V., Koc, J., 2000. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft* 55, 65–67.
- Raeisi, S.N., Ouoba, L.I.I., Farahmand, N., Sutherland, J., Ghoddusi, H.B., 2013. Variation, viability and validity of bifidobacteria in fermented milk products. *Food Control* 34, 691–697.
- Roy, D., 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 167–182.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Sci. Technol. LEB* 50, 1–16.
- Sanders, M.E., 2009. How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic? A guideline for consumers and health care professionals. *Funct. Food Rev.* 1, 3–12.
- Savard, P., Lamarche, B., Paradis, M.-E., Thiboutot, H., Laurin, É., Roy, D., 2011. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 50–57.
- Tannock, G.W., 2003. Probiotics: time for a dose of realism. *Curr. Issue Intest. Microbiol.* 4, 33–42.
- Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., Swings, J., 2003. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 220–226.
- Tripathi, M., Giri, S., 2014. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods* 9, 225–241.
- Verna, E.C., Lucak, S., 2010. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Ther. Adv. Gastroenterol.* 3, 307–319.

***5.3 Anticlostridial agent 8-hydroxyquinoline improves the isolation of faecal bifidobacteria on modified Wilkins-Chalgren agar with mupirocin***

**2016**

Novakova J., Vlkova E., Salmonova H., **Pechar R.**, Rada V., Kokoska L.

***Letters in Applied Microbiology 62: 330-335***

ORIGINAL ARTICLE

## Anticlostridial agent 8-hydroxyquinoline improves the isolation of faecal bifidobacteria on modified Wilkins–Chalgren agar with mupirocin

J. Novakova<sup>1</sup>, E. Vlkova<sup>2</sup>, H. Salmonova<sup>2</sup>, R. Pechar<sup>2</sup>, V. Rada<sup>2</sup> and L. Kokoska<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Quality of Agricultural Products, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Nutrition and Diagnostics, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Crop Sciences and Agroforestry, Faculty of Tropical AgriSciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

**Significance and Impact of the Study:** Routine isolation of bifidobacteria from mammalian faeces does not use a reliable selective agar with an anticlostridial agent. Overgrowth of clostridia may result in incorrect estimation of bifidobacterial counts. Thus, in order to improve the selectivity of existing media for bifidobacterial isolation, we chose the modified Wilkins–Chalgren agar with mupirocin and supplemented it with 8-hydroxyquinoline (8HQ), a molecule that shows anticlostridial activity without affecting the growth of bifidobacteria. This newly composed medium showed enhanced selectivity and specificity compared to the original medium and therefore, can be recommended for the isolation of bifidobacteria from mammal faeces.

### Keywords

8-quinolinol, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, intestinal microbiota, isolation, selective agar.

### Correspondence

Ladislav Kokoska, Department of Crop Sciences and Agroforestry, Faculty of Tropical AgriSciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, 165 21 Prague 6–Suchbát, Czech Republic.  
E-mail: kokoska@ftz.czu.cz

2016/0014: received 21 April 2015, revised 5 January 2016 and accepted 30 January 2016

doi:10.1111/lam.12552

### Abstract

The need for suitable selective cultivation media for the isolation of *Bifidobacterium* spp. continues to be a real concern in the field of intestinal microbiology. Isolation of bifidobacteria from human and animal faecal samples using selective agar plating may be problematic especially in samples with increased clostridial counts than bifidobacterial counts. Due to the absence of anticlostridial agents in existing selective media, clostridia can displace bifidobacteria resulting in incorrect estimation of their counts. Therefore, we supplemented the existing selective medium 'modified Wilkins Chalgren agar with mupirocin' (MWM) with 90 mg l<sup>-1</sup> of 8-hydroxyquinoline (8HQ), which was recently proved to act selectively against clostridia. The newly composed 'modified Wilkins–Chalgren agar with 8HQ' (MWMQ) was tested on pure bifidobacterial and clostridial strains, their mixtures, and using faecal samples of mammalian origin; its selectivity was evaluated by genus-specific identification of isolates. The results demonstrated that the presence of 8HQ in this agar eliminated the growth of nonbifidobacterial strains on MWMQ compared to that on MWM, whereas the recovery of bifidobacterial counts was at satisfactory levels. In conclusion, MWMQ could be recommended for bifidobacterial isolation from human and animal faeces especially when bifidobacteria are not numerically dominant and there are chances of clostridial contamination.

### Introduction

The genus *Bifidobacterium* is currently gaining attention because of the health promoting effects of a majority of

its members which are intensively studied for use in probiotic-based therapies against gastrointestinal illnesses (Williams *et al.* 2010) and in functional food products (Sarkar 2013). Therefore, rapid and reliable methods for

bifidobacterial detection and isolation are of increasing importance. Modern molecular techniques, like nucleic acid amplification, visual imaging and cell sorting, which have the potential to rapidly determine strain abundance and metabolic activity, are often used in combination with cultivation methods for reliable quantification of the proportion of viable microbes in various metabolic states (Davis 2014). Thus, advances in culture techniques, such as the introduction of improved selective media for the isolation of specific bacterial genera, would be advantageous for routine work.

Although many selective media for bifidobacterial isolation have been developed in the last few decades (Beerens 1991; Mikkelsen *et al.* 2003; Thitaram *et al.* 2005; Bunesova *et al.* 2014), none is especially suitable for the analysis of faecal samples with low bifidobacterial count but high clostridial count. Together with coliforms and *Bacteroides* spp., clostridia has often been reported to be the predominant faecal bacteria in bifidobacteria-deficient samples (Edwards and Parrett 2002). As none of the media possesses an effective anti-clostridial component (Lakshminarayanan *et al.* 2013), the clostridial colonies overgrow the bifidobacteria, resulting in inaccurate determination of bifidobacterial counts (Apajalahti *et al.* 2003).

Bifidobacteria-deficient intestinal microbiota are usually observed in infants delivered in large hospitals, born with low weight, by caesarean section or those who are fed with infant formulas. These features may increase the incidence of clostridia in the gut microbiota of these infants (Vlkova *et al.* 2005). In animals, dogs (Handl *et al.* 2011) and pigs (Lu *et al.* 2007) are examples of species with characteristic clostridia-dominated microbiota. A selective medium supplemented with an anticlostridial agent would be advantageous for uncovering low abundance of bifidobacteria that may be masked by the growth of clostridia during faecal sample analyses, especially in individuals with suspected misbalanced microbiota.

The aim of this work was to improve the 'modified Wilkins–Chalgren agar with mupirocin' (MWM), previously developed by Rada and Petr (2000) for the isolation of glucose nonfermenting bifidobacteria from hen caeca, by adding the selective anticlostridial agent, 8-hydroxyquinoline (8HQ). According to our previous results (Novakova *et al.* 2013, 2014), 8HQ is selective for bifidobacterial growth in addition to possessing anticlostridial activity.

## Results and Discussion

In this study, a medium called 'modified Wilkins–Chalgren agar with 8HQ' (MWMQ) was developed by adding 8HQ to the existing selective medium for bifidobacterial isolation, herein called as MWM, which is described below. First, the bifidobacterial selectivity of MWMQ was confirmed by the finding that bifidobacteria are able to grow on it with satisfactory recovery, whereas growth of clostridia is inhibited (Table S1, available in the online Supporting Information). Next, the selectivity of MWM and MWMQ was compared, initially in co-cultures of pure bifidobacterial and clostridial strains in different ratios (Table S2, available in the online Supporting Information), and then in analyses of faecal samples of mammalian origin (Table 1). Increased selectivity and specificity of the newly composed MWMQ for bifidobacterial isolation than the original MWM were observed in both types of experiments.

### Selectivity of MWMQ evaluated on pure strain cultures and their mixtures

A series of experiments with 17 bifidobacterial and 20 clostridial pure strains showed that the best anticlostridial activity without any effect on bifidobacterial growth was observed at the concentration of 90 mg l<sup>-1</sup> of 8HQ, when

**Table 1** Faecal bifidobacteria enumeration and evaluation of the media selectivity

Faecal samples	Bacterial counts			Number of isolates/number of bifidobacteria	
	MW	MWM	MWMQ	MWM	MWMQ
Adults (n = 5)	10.11 ± 0.34 <sup>a</sup>	9.50 ± 0.37 <sup>b</sup>	9.34 ± 0.38 <sup>b</sup>	105/105	105/105
Bifidobacteria-positive infants (n = 5)	10.65 ± 0.12	10.38 ± 0.34	10.58 ± 0.18	48/48	48/48
Bifidobacteria-negative infants (n = 5)	9.79 ± 0.24 <sup>a</sup>	8.30 ± 0.78 <sup>b</sup>	3.82 ± 1.46 <sup>c</sup>	60/0	36/0
Bifidobacteria-positive dogs (n = 3)	10.18 ± 0.12 <sup>a</sup>	8.71 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.98 ± 2.78 <sup>c</sup>	45/12	29/24
Bifidobacteria-negative dogs (n = 3)	9.99 ± 0.47 <sup>a</sup>	8.29 ± 0.19 <sup>b</sup>	2.96 ± 1.51 <sup>c</sup>	36/0	34/0
Pigs (n = 3)	8.97 ± 0.26 <sup>a</sup>	8.50 ± 0.19 <sup>a,b</sup>	8.05 ± 0.47 <sup>b</sup>	36/29	36/35

The values are expressed as log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> (±SD). MW – modified Wilkins–Chalgren agar consisting of Wilkins–Chalgren agar, soya peptone (5 g l<sup>-1</sup>), L-cysteine (0.5 g l<sup>-1</sup>) and Tween 80 (1 ml l<sup>-1</sup>). MWM – modified Wilkins–Chalgren agar with mupirocin – consisting of MW supplemented with glacial acetic acid (1 ml l<sup>-1</sup>) and mupirocin (100 mg l<sup>-1</sup>). MWMQ – modified Wilkins–Chalgren agar with 8-hydroxyquinoline – consisting of MWM supplemented with 8-hydroxyquinoline (90 mg l<sup>-1</sup>). Values in lines with different letter superscripts are significantly different (P < 0.05).

supplemented to original MWM. It was simultaneously observed that concentrations of 8HQ higher than or equal to  $100 \text{ mg l}^{-1}$  resulted in decreased recovery of certain bifidobacterial strains (growth reduction of  $2 \log_{10} \text{ CFU ml}^{-1}$  or more), whereas concentrations of less than  $70 \text{ mg l}^{-1}$  did not inhibit all clostridial strains completely.

The selectivity of the newly composed MWMQ was first demonstrated on pure strain cultures (Table S1). The growth of clostridial strains on MWMQ was completely inhibited, whereas the counts of bifidobacteria were overall well-recovered, compared to that using the control MW agar. There was an exception in the recovery of two strains, namely *Bifidobacterium adolescentis* H1 and *Bifidobacterium longum* J2, where certain strain specificity was observed as their counts on the two media were significantly different ( $P < 0.05$ ). This slightly lowered recovery is an expected issue in selective media, if more selective supplements are used together (Apajalahti et al. 2003; Davis 2014). Next, the selectivity of MWM and MWMQ agars was evaluated using mixtures of pure strains of bifidobacteria and clostridia in different ratios compared to control agar MW without any selective supplements (Table S2). In most cases, the average bacterial counts determined on MW agar did not differ significantly from those detected on MWM medium and corresponded to the total numbers of inoculated bacteria. The fact that MWM agar is not fully selective and permits the growth of clostridia was confirmed by genus identification of the isolates. The same concern was also raised in our previous study (Vlkova et al. 2005). Evaluation of the variant samples with bifidobacteria and clostridia in a ratio of 1 : 1 showed that only 55 of 120 isolates were bifidobacteria. Bacterial viability was significantly decreased after cultivation of the bacterial mixtures on MWMQ agar in a ratio of 1 : 1 and the determined counts corresponded to the number of inoculated bifidobacteria. Similar results were also obtained after the cultivation of mock samples where clostridia outnumbered bifidobacteria by 1 and 2 orders of magnitude. Significantly lower bacterial counts were detected on MWMQ agar compared to both, MWM agar and control nonselective MW medium and counts on MWMQ corresponded to the number of inoculated bifidobacteria. This medium also showed very good selectivity since all isolates were identified as bifidobacteria. Comparable counts were determined on all three media tested in both variations where bifidobacteria outnumbered clostridia.

Of the many reported selective media for bifidobacteria isolation, none appear to be completely selective (Bunsova et al. 2014) due to the occurrence of some strains that are less susceptible to the selective supplements. Similarly, on MWMQ we observed decreased susceptibility in

one strain, namely *Clostridium clostridioforme* MAM that occurred rarely in very low counts or formed hardly visible microcolonies. The strain *Clostridium difficile* KK4 was not detected on any of the selective media, which may be explained by the previous finding of Sutherland et al. (1985) indicating that *Cl. difficile* was susceptible to mupirocin ( $\text{MIC} = 32 \text{ mg l}^{-1}$ ), which was present in both selective agars tested in the present study.

### Selectivity of MWMQ tested on faecal samples

In experiments done with fresh mammalian faecal samples, the counts of bacterial colonies grown on MWM and MWMQ, along with total counts of anaerobic bacteria grown on MW agar, were compared. The results showed that MWMQ showed markedly reduced growth of nonbifidobacterial species compared to MWM (Table 1). When bifidobacteria were actually present in the sample as a minor bacterial group, more bifidobacterial strains were isolated from MWMQ than from MWM.

In experiments with faecal samples from adults, MWM and MWMQ were completely selective for bifidobacteria, which were found at high counts in all tested samples. Infants were divided into two groups depending on the presence or absence of bifidobacteria in their faeces, thus providing five each of bifidobacteria-positive and bifidobacteria-negative samples. In bifidobacteria-positive infant samples, all isolates were strictly identified as bifidobacteria on both selective media. The recovery was very good, since there was no significant difference ( $P > 0.05$ ) between the mean of bacterial counts on MW, MWM and MWMQ media. In bifidobacteria-negative infant samples, the mean bacterial count enumerated on MWM ( $8.30 \pm 0.78 \log_{10} \text{ CFU g}^{-1}$ ) was significantly higher than that obtained on MWMQ ( $3.82 \pm 1.46 \log_{10} \text{ CFU g}^{-1}$ ). Among the isolates, clostridia prevailed on both selective media, but their average counts on MWMQ were very low. The high standard deviation indicated the occasional occurrence of colonies on MWMQ, which often appeared as hardly visible micro-colonies. Summing up, in 5 of 10 tested infants delivered by caesarean section, bifidobacteria were absent in agreement with findings previously described by Vlkova et al. (2005) and Liu et al. (2015). According to these reports, such types of infant faecal samples showed higher probability of decreased bifidobacterial counts and increased counts of clostridia. Due to the strong requirement for the use of anticlostridial supplements, this type of faecal samples was chosen for testing the improved selective medium for bifidobacterial isolation.

In the assay performed with dog faeces, three bifidobacteria-positive and three bifidobacteria-negative samples were identified. In bifidobacteria-positive dog



samples, there were significant differences ( $P < 0.05$ ) between the mean total counts of anaerobes on MW ( $10.18 \pm 0.12 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ), the average counts on MWM ( $8.71 \pm 0.36 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ) and on MWMQ ( $3.98 \pm 2.78 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ ). On MWM, bifidobacteria were identified only in one of the three samples tested (all 12 bifidobacterial isolates were obtained from this single sample, Table 1), whereas no bifidobacteria were isolated from the agar in the other two samples. In contrary, bifidobacteria were also detected in those two samples on MWMQ, where no bifidobacteria were found on MWM, and their counts were about  $3 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ . Thus, according to their cultivation on MWM agar, these two samples would be considered as bifidobacteria-negative, because bifidobacteria were displaced by clostridia in these samples. These findings demonstrated the increased specificity of MWMQ in comparison with MWM, because 24 of 29 isolates were identified as bifidobacteria on MWMQ agar. Low counts of bifidobacteria in dogs have been reported in literature (Handl *et al.* 2011). Only one of six dog samples showed high counts of bifidobacteria on both selective media, in contrast to the normal gut microbiota in dogs, which is usually dominated by the phyla Firmicutes and Bacteroidetes with *Clostridium* and *Ruminococcus* as the respective prevailing genera. In the remaining five dog samples examined, along with clostridia, Gram-positive pleomorphic rods that were fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) negative also appeared, and were tentatively identified as propionic acid bacteria according to their phenotypical traits.

In bifidobacteria-negative dog samples, significantly higher ( $P < 0.05$ ) counts were obtained on MWM compared to MWMQ, and the average bacterial counts appearing on MWMQ were in the range of  $2.96 \pm 1.51 \log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ . Even though these bacteria were also identified as clostridia, their counts on MWMQ were so low that it had a minor significance for the practical use of the agar, mostly because they mainly formed hardly visible micro-colonies. Conclusively it should be emphasised that MWMQ was most successfully used for the analysis of dog faeces, because bifidobacteria were isolated even from those samples that were negative on MWM due to displacement by clostridia.

Analyses of pig faeces showed detection of high counts of bifidobacteria on both selective media. However, among the isolates on MWM, clostridia were also identified in 7 of 36 isolates (Table 1). On MWMQ, only one isolate out of 36 was identified as *Clostridium* spp., indicating its more successful application. In contrast to data provided in studies that describe Clostridiales, unclassified Firmicutes, Bacteroidales and others as dominant groups using high-throughput sequencing (Hill *et al.* 2002; Lamendella *et al.* 2011), the major bacterial group in the

gut microbiota of pigs tested in our study seemed to be the bifidobacteria. This difference could be caused by variations in factors such as their diet, breed, weaning and administration of antibiotics or probiotics (Pajarillo *et al.* 2015).

In summary, addition of 8HQ significantly improved bifidobacterial selectivity and specificity of MWM at the expense of slightly lower recovery, as was shown with pure strains (Table S1). Comparison of MWM and MWMQ suggested that both selective media could be successfully used for enumeration and isolation of bifidobacteria if they are the dominant bacterial group in the sample. However, MWMQ is advantageous in bifidobacteria-poor samples, because it reduces the number of nonbifidobacterial isolates compared to MWM. Therefore, the newly composed MWMQ containing the anti-clostridial agent 8HQ may be preferably recommended for bifidobacterial isolation from faecal samples of human and animal origin.

## Materials and methods

### Bacterial cultures and faecal samples

Wild strains of *Bifidobacterium* spp. and *Clostridium* spp. obtained from the Collection of Microorganisms of the Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics (CMDMND) of the Czech University of Life Sciences, Prague (CULS), were used in this study. These were originally isolated from infant faeces according to Rada and Petr (2000), and were identified according to Vlckova *et al.* (2005). All strains were stored as described in Novakova *et al.* (2014).

The faecal samples used in this study were freshly collected from infants delivered by caesarean section (aged 1–2 months) (informed written consent for analysis of faecal samples was obtained from the parents), adult volunteers (20–35 years old), pet dogs (2–6 years old) of volunteers and from pigs (1–2 years old) raised at the farm of CULS. One gram of each sample was aseptically transferred to a tube with 9 ml of Wilkins–Chalgren Anaerobe Broth (WB) (Oxoid, Brno, Czech Republic) prepared by the roll-tube technique and transported within 2 h to the laboratory for subsequent analysis.

### Solid media for bacterial enumeration

Two related selective media were used and compared. The first, MWM, was prepared as described below for MW and was then enriched by addition of  $100 \text{ mg l}^{-1}$  of mupirocin (AppliChem, Darmstadt, Germany) and  $1 \text{ ml l}^{-1}$  of glacial acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) as described by Rada and Petr (2000). The stock

solution of mupirocin in DMSO at a concentration of  $0.1 \text{ g ml}^{-1}$  was first diluted in sterile water (1 : 10), and then in respective sterile agar (1 : 100). The second selective medium tested, MWMQ, was prepared as MWM and supplemented with the stock solution of  $9 \text{ mg ml}^{-1}$  of 8HQ (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) (100 : 1) to receive the final concentration of  $90 \text{ mg l}^{-1}$ . The stock solution dissolved in DMSO was prepared ahead and stored at  $4^\circ\text{C}$  for a maximum of 1 month. The appropriate concentration was determined as the MIC of 8HQ towards clostridial isolates which did not reduce the growth of bifidobacterial isolates. As controls, pure bacterial strains, their mixtures, as well as faecal samples were cultivated on nonselective MW consisting of Wilkins-Chalgren agar,  $5 \text{ g l}^{-1}$  of soya peptone,  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  of L-cysteine and  $1 \text{ ml l}^{-1}$  of Tween 80.

#### Microbiological assays for testing selectivity of solid media

In the first step, the growth of pure bifidobacterial and clostridial strains (Table S1) on the newly composed MWMQ was tested and compared with the nonselective MW. Overnight cultures were serially diluted in WB under anaerobic conditions. Appropriate dilutions were transferred to sterile Petri dishes, which were immediately filled with media and incubated in anaerobic conditions at  $37^\circ\text{C}$  for 3 days.

In the second step, mixtures of pure strains of bifidobacteria and clostridia were grown on MWM and MWMQ to compare their selectivity, where the nonselective MW was used as control (Table S2). Six variants of mock samples prepared in the laboratory contained mixtures of pure strains of bifidobacteria and clostridia (Table S2). The bacterial numbers used in the mixtures varied between 8.29 and  $8.55 \log_{10} \text{ CFU ml}^{-1}$ . Each bacterial combination was tested in five different ratios of the strains. In the first variant their level was comparable. In the other two variants, bifidobacteria outnumbered clostridia by 1 and 2 orders of magnitude. In the last two variants, clostridia outnumbered bifidobacteria in the same manner (Table S2). The mock samples were mixed, diluted, and cultivated as described above. Twenty bacterial strains were isolated from the selective agars, subcultured and identified by morphological examination using phase-contrast microscopy, where the members of the genus *Bifidobacterium* were preliminarily identified by the criterion that they were Gram-positive pleomorphic rods. The identification was next confirmed by detection of F6PPK activity as described by Orban and Patterson (2000). F6PPK-positive strains were considered as bifidobacteria. Isolated Gram-positive regular rods producing gas without F6PPK activity were identified as clostridia. In the third step, the selectivity of MWMQ was tested on

faecal samples. Total counts of anaerobic bacteria were determined on MW and bifidobacteria were enumerated using both selective media. Their selectivity was evaluated using the method described above.

#### Statistical evaluation

The experiments with pure strains and their mixtures were repeated thrice independently, each time in triplicate. Analyses of faecal samples were performed in triplicates. Bacterial counts are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. To compare the bacterial counts on the control and selective media, ANOVA statistical method and *post hoc* Tukey HSD for multiple comparisons were used, where  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

#### Acknowledgements

This study was supported by grant GACR 13-08803S of the Czech Science Foundation and by the project 20155012 of the Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague (IGA).

#### Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

#### References

- Apajalahti, J.H.A., Kettunen, A., Nurminen, P.H., Jutila, H. and Holben, W.E. (2003) Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5731–5735.
- Beerens, H. (1991) Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2418–2419.
- Bunesova, V., Vlkova, E., Rada, V., Killer, J. and Musilova, S. (2014) Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Benef Microbes* **5**, 377–388.
- Davis, C. (2014) Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods* **103**, 9–17.
- Edwards, C.A. and Parrett, A.M. (2002) Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr* **88**, S11–S18.
- Handl, S., Dowd, S.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Steiner, M.J. and Suchodolski, J.S. (2011) Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol* **76**, 301–310.
- Hill, J.E., Seipp, R.P., Betts, M., Hawkins, L., Van Kessel, A.G., Crosby, W.L. and Hemmingsen, S.M. (2002) Extensive

- profiling of a complex microbial community by high-throughput sequencing. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3055–3066.
- Lakshminarayanan, B., Harris, H.M.B., Coakley, M., O'Sullivan, Ó., Stanton, C., Pruteanu, M., Shanahan, F., O'Toole, P.W. et al. (2013) Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from the faecal microbiota of elderly Irish subjects. *J Med Microbiol* **62**, 457–466.
- Lamendella, R., Domingo, J.W.S., Ghosh, S., Martinson, J. and Oerther, D.B. (2011) Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiol* **11**, 103.
- Liu, D., Yu, J., Li, L., Ai, Q., Feng, J., Song, C. and Li, H. (2015) Bacterial community structure associated with elective cesarean section versus vaginal delivery in Chinese newborns. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **60**, 240–246.
- Lu, J., Santo Domingo, J. and Shanks, O.C. (2007) Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomic approach. *Water Res* **41**, 3561–3574.
- Mikkelsen, L., Bendixen, C., Jakobsen, M. and Jensen, B. (2003) Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Appl Environ Microbiol* **69**, 654–658.
- Novakova, J., Vlkova, E., Bonusova, B., Rada, V. and Kokoska, L. (2013) *In vitro* selective inhibitory effect of 8-hydroxyquinoline against bifidobacteria and clostridia. *Anaerobe* **22**, 134–136.
- Novakova, J., Džunková, M., Musilova, S., Vlkova, E., Kokoska, L., Moya, A. and D'Auria, G. (2014) Selective growth-inhibitory effect of 8-hydroxyquinoline towards *Clostridium difficile* and *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* in co-culture analysed by flow cytometry. *J Med Microbiol* **63**, 1663–1669.
- Orban, J.I. and Patterson, J.A. (2000) Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J Microbiol Methods* **40**, 221–224.
- Pajarillo, E.A.B., Chae, J.P., Balolong, M.P., Kim, H.B., Park, C.-S. and Kang, D.-K. (2015) Effects of probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 administration on swine fecal microbiota diversity and composition using barcoded pyrosequencing. *Anim Feed Sci Technol* **201**, 80–88.
- Rada, V. and Petr, J. (2000) A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J Microbiol Methods* **43**, 127–132.
- Sarkar, S. (2013) Potential of probiotics as pharmaceutical agent: a review. *Br Food J* **115**, 1658–1687.
- Sutherland, R., Boon, R.J., Griffin, K.E., Masters, P.J., Slocombe, B. and White, A.R. (1985) Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 493–498.
- Thitaram, S.N., Siragusa, G.R. and Hinton, A. Jr (2005) *Bifidobacterium*-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. *Let Appl Microbiol* **41**, 355–360.
- Vlkova, E., Nevoral, J., Jencikova, B., Kopecny, J., Godefrooij, J., Trojanova, I. and Rada, V. (2005) Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. *J Microbiol Methods* **60**, 365–373.
- Williams, M.D., Ha, C.Y. and Giorba, M.A. (2010) Probiotics as therapy in gastroenterology: a study of physician opinions and recommendations. *J Clin Gastroenterol* **44**, 631–636.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1** The growth of pure strains of bifidobacteria and clostridia on control (MW) and on selective medium (MWMQ).

**Table S2** The growth of mixtures of pure strains of bifidobacteria and clostridia in different ratios on control (MW) and on selective media (MWM, MWMQ).



**5.4 *Mupirocin-mucin agar for selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum****

**2014**

**Pechar R., Rada V., Parafati L., Musilova S., Bunesova V., Vlkova E., Killer J., Mrazek J., Kmet V., Svejstil R.**

***International Journal of Food Microbiology 191: 32-35***



## Short communication

Mupirocin-mucin agar for selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*Radko Pechar<sup>a</sup>, Vojtech Rada<sup>a,\*</sup>, Lucia Parafati<sup>b</sup>, Sarka Musilova<sup>a</sup>, Vera Bunesova<sup>a</sup>, Eva Vlkova<sup>a</sup>, Jiri Killer<sup>a,c</sup>, Jakub Mrazek<sup>c</sup>, Vladimir Kmet<sup>d</sup>, Roman Svejtil<sup>a</sup><sup>a</sup> Department of Microbiology, Nutrition and Diagnostics, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, Prague 6 165 21, Czech Republic<sup>b</sup> Department of Agri-food and Environmental Systems Management, University of Catania, Via S. Sofia 100, 95123 Catania, Italy<sup>c</sup> Institute of Animal Physiology and Genetics v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnská 1083, Prague 4 142 20, Czech Republic<sup>d</sup> Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Soltesovej 4–6, 040 01 Kosice, Slovakia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 April 2014

Received in revised form 29 July 2014

Accepted 23 August 2014

Available online 29 August 2014

## Keywords:

Probiotics

*Bifidobacterium bifidum*

Selective enumeration

Isolation

Feces

## ABSTRACT

*Bifidobacterium bifidum* is a bacterial species exclusively found in the human intestinal tract. This species is becoming increasingly popular as a probiotic organism added to lyophilized products. In this study, porcine mucin was used as the sole carbon source for the selective enumeration of *B. bifidum* in probiotic food additives. Thirty-six bifidobacterial strains were cultivated in broth with mucin. Only 13 strains of *B. bifidum* utilized the mucin to produce acids. *B. bifidum* was selectively enumerated in eight probiotic food supplements using agar (MM agar) containing mupirocin (100 mg/L) and mucin (20 g/L) as the sole carbon source. MM agar was fully selective if the *B. bifidum* species was presented together with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium breve*, and *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* species and with lactic acid bacteria (lactobacilli, streptococci). Isolated strains of *B. bifidum* were identified using biochemical, PCR, MALDI-TOF procedures and 16S rRNA gene sequencing. The novel selective medium was also suitable for the isolation of *B. bifidum* strains from human fecal samples.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Bifidobacterium bifidum* is a bacterial species found exclusively in the human intestinal tract (Biavati, 2012). Because this species has a relatively low number of genes encoding carbohydrate transport proteins, it is able to utilize a narrow spectrum of carbohydrates (Turroni et al., 2012). In contrast, this microorganism is the only bifidobacterial species that utilizes mucin (Killer and Marounek, 2011). Mucin is a glycoprotein, which together with water, antibodies, and nucleic acids, forms a protective mucus layer covering enterocytes in the gastrointestinal tract (Macfarlane et al., 2005). The saccharidic part of mucin has a similar monosaccharide composition to human milk oligosaccharides.

Today, *B. bifidum* species are becoming increasingly popular as probiotic organisms added to lyophilized preparations, and also to probiotic drops. Yamasaki et al. (2012) recommended the administration of *B. bifidum* strain OLB6378 to very low-weight infants as a preventive measure against necrotizing enterocolitis. Bayoumi and Griffiths (2012) reported the production of specific molecules secreted by *B. bifidum*, which may prevent the adhesion, attachment, and invasion by foodborne pathogens (e.g. *Salmonella* spp.). Immunomodulation effects mediated by the interaction of *B. bifidum* with dendritic and

epithelial cells have also been reported (Kim et al., 2012). Species *B. bifidum* is very effective at utilizing human milk oligosaccharides (Rockova et al., 2011) as well as well adapted to utilize mucin. The main enzymes that are included in mucin degradation to monomers are endo- $\beta$ -N-acetylgalactosaminidase, fucosidase, N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidases,  $\beta$ -galactosidases and sialidases and other enzymes like glycosyl hydrolases, glycosyl transferases and glycosyl esterases participated in carbohydrate metabolisms of *B. bifidum* strain PRL2010 (Turroni et al., 2011). Li et al. (2014) found that exopolysaccharides (EPS) produced by *B. bifidum* had a beneficial effect on microbial diversity in the mouse intestine. EPS enhanced the counts of lactobacilli, while the populations of enterobacteria, enterococci, and *Bacteroides fragilis* were decreased. The possible use of *B. bifidum* in kefir is also reported (Serafini et al., 2014). *B. bifidum* strain PRL2010 was able to grow together with kefir culture. Kefir and kefiran polymers were able to influence the transcriptome of bifidobacterial strain activating genes involved in the metabolism of dietary glycans.

Probiotics play an important role in human nutrition. Most commonly used probiotic bacteria belong to group of lactic acid bacteria (genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Enterococcus*) and to the genus *Bifidobacterium* (FAO/WHO, 2001; Holzapfel et al., 2001). However, for their selective determination there are only few available standards. Currently available ISO/IDF standards are only for genus *Bifidobacterium* (ISO Standard 29981/IDF 220:2010) and for *Lb. acidophilus*

\* Corresponding author. Tel.: +420 224382764; fax: +420 224382760.  
E-mail address: [rada@af.czu.cz](mailto:rada@af.czu.cz) (V. Rada).

(ISO Standard 20128/IDF 192:2006) in fermented milk products. A method for selective enumeration of other probiotic species (e.g. *B. bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* and *Lb. casei*) has to be developed. As already described, *B. bifidum* has unique features to utilize mucin (Killer and Marounek, 2011). So, the aim of the present work was to develop a selective medium for the enumeration of *B. bifidum* in probiotic food. Lyophilized capsules and lyophilized powders were tested. Porcine mucin was used as a selective factor. The selective medium was also tested for enumeration and/or isolation of *B. bifidum* from human fecal samples.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains

The list of bifidobacterial strains tested is shown in Table 1. Cultures were grown in Wilkins–Chalgren broth (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/L; Oxoid) using the roll-tube technique (Hungate, 1969). Bacteria were stored in glycerol (20% v/v). Strains originated from culture collections (ATCC, DSMZ, and CCM) or were isolated using TPY agar with mupirocin (100 mg/L) and acetic acid (1 mL/L) according to Rada and Petr (2000). Cultures isolated were identified to the species level according to Vlčková et al. (2005).

### 2.2. *B. bifidum* selective medium

Porcine mucin (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) was used as a selective factor. Firstly, utilization of mucin by bifidobacteria was tested using a broth containing 5 g/L tryptone, 5 g/L peptone, 2.5 g/L yeast extract, 1 mL/L tween 80, 0.25 g/L cysteine-hydrochloride, 20 g/L mucin,

and 0.01 g/L bromocresol purple (pH 7.4; mucin and bromocresol purple were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and the remaining components from Oxoid). Bifidobacterial cultures grown in Wilkins–Chalgren broth (Oxoid) were twice centrifuged (6000 g for 5 min), twice flushed with sterile saline, and resuspended in the saline. Then, cultures were inoculated (0.1%) into broth with mucin and incubated at 37 °C for 48 h. Mucin utilization was accompanied by a change of bromocresol purple from violet to yellow color. Cultivation was done under anaerobic conditions using roll-tube techniques.

Subsequently, a selective medium was developed. The medium contained: 5 g/L tryptone, 5 g/L peptone, 2.5 g/L yeast extract, 1 mL/L tween 80, 0.25 g/L cysteine-hydrochloride, 20 g/L mucin, 0.1 g/L mupirocin, and 15 g/L agar (pH 7.4; mucin was purchased from Sigma, and the other components from Oxoid). The medium was named MM (mupirocin–mucin) agar. MM agar was used for the enumeration and isolation of *B. bifidum* from probiotics. Human fecal samples were analyzed using MM agar with the addition of acetic acid (1 mL/L; pH 5.0).

### 2.3. Microbiological analyses of probiotic products

The list of products tested is shown in Table 2. All products were purchased from a market in the Czech Republic (Prague). Samples were serially diluted, inoculated into Petri dishes, and were poured in to the MM agar. The plates were incubated in anaerobic jars (Oxoid, HP11A) in CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (20/80) at 37 °C for 48 h. Subsequently, colonies were counted and the number of viable cells (in log CFU/g) was calculated. To confirm the presence of *B. bifidum* in MM agar, five colonies from MM plates belonging to each probiotic product were transferred to Wilkins–Chalgren broth, and were incubated at 37 °C for 48 h. Then, cultures were identified as described in Section 2.5.

### 2.4. Microbiological analyses of fecal samples

Fecal samples from eleven healthy volunteers (6 women and 5 men; age range, 22–51) were collected. Samples were serially diluted and the total bifidobacteria were enumerated using modified TPY agar (MTPY) with mupirocin (100 mg/L) and acetic acid (1 mL/L) according to Rada and Petr (2000). Samples were also cultivated in MM agar with acetic acid (1 mL/L) in order to isolate *B. bifidum*. All plates were incubated using the same method as described in Section 2.3. After incubation, five colonies from each individual were isolated and identified.

The quantification of *B. bifidum* was performed by quantitative PCR on an Mx3005P machine (Stratagene Products) with qPCR 2 × SYBR Master Mix (Top-Bio, CR). Fecal samples from six healthy volunteers (3 women and 3 men; age range, 27–50) were collected. *B. bifidum* was quantified with primers g-Bifid-F + g-Bifid-R and BiBIF-1 + BiBIF-2, in accordance with the methods of Matsuki et al. (2004). *B. bifidum* ATCC 29521 was used to construct a standard curve. Melting temperature analysis of PCR products was also performed to determine the specificity of each qPCR reaction. The melting curves were obtained by slow heating at 0.2 °C/s increments from 60 to 95 °C, with continuous fluorescence visualization.

### 2.5. Identification of bifidobacterial isolates

Isolated cultures were identified at the species level according to Vlčková et al. (2005). Biochemical tests (API 50 CHL, API ID 32A, Biomérieux, France) and species-specific PCR were used. In addition, the MALDI-TOF procedure (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany) and the 16S rRNA gene sequencing for identification of *B. bifidum* were used. The samples were prepared for the MALDI-TOF procedure using cells from a single colony according Kmet' and Drugdová (2012). Amplification of almost the entire 16S rRNA gene region was performed by means of 616V and 630R (Ehrmann et al., 2003). The length of amplicons was checked using the 1.5% agarose (Top-Bio,

**Table 1**  
Utilization of mucin by bifidobacterial species.

Strain	Source	Mucin utilization
<i>B. adolescentis</i> 1	CCM 4987	–
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> 1	CCM 4988	–
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> 2	ATCC 25527	–
<i>B. bifidum</i> 1	Infant faeces	+
<i>B. bifidum</i> 2	Infant faeces	+
<i>B. bifidum</i> 3	Infant faeces	+
<i>B. bifidum</i> 4	Infant faeces	+
<i>B. bifidum</i> 5	Infant faeces	+
<i>B. bifidum</i> 6	Infant faeces	+
<i>B. bifidum</i> 7	Infant faeces	+
<i>B. bifidum</i> 8	Adult faeces	+
<i>B. bifidum</i> 9	Adult faeces	+
<i>B. bifidum</i> 10	Probiotic capsules	+
<i>B. bifidum</i> 11	Probiotic capsules	+
<i>B. bifidum</i> 12	Probiotic capsules	+
<i>B. bifidum</i> 13	Probiotic capsules	+
<i>B. breve</i> 1	ATCC 15700	–
<i>B. boum</i> 2	DSMZ 20432	–
<i>B. catenulatum</i> 1	CCM 4989	–
<i>B. choerinum</i> 1	DSMZ 20434	–
<i>B. gallinarum</i> 1	DSMZ 20670	–
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> 1	ATCC 15707	–
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> 1	CCM 4990	–
<i>B. merycicum</i> 1	DSMZ 6482	–
<i>B. porcinum</i> 1	ATCC 17775	–
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>gfobosum</i> 1	DSMZ 20092	–
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> 1	DSMZ 20099	–
<i>B. pullorum</i> 1	DSMZ 20433	–
<i>B. ruminantium</i> 1	DSMZ 6489	–
<i>B. subtile</i> 1	DSMZ 20096	–
<i>B. suis</i> 1	DSMZ 20211	–
<i>B. thermacidophilum</i> 1	ATCC 15837	–
<i>B. thermophilum</i> 1	DSMZ 20210	–
<i>B. thermophilum</i> 1	DSMZ 20212	–

ATCC—American Type Culture Collection.

CCM—Czech Culture Collection.

DSMZ—Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

**Table 2**  
Counts of bacteria in probiotics products.

Product	Bacteria composition	Manufacturer's declaration per g	Type	Manufacturer	<i>B. bifidum</i> log CFU/g
Lepicol	<i>B. bifidum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i>	$2.00 \times 10^{14}$	Lyophilized powder	ASP Czech, Czech republic	$8.05 \pm 0.02$
Biopron Junior	<i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> <i>L. acidophilus</i>	$3.21 \times 10^{14}$	Sachets	Valosun, Czech Republic	$8.10 \pm 0.10$
Laktobacilky Baby	<i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i>	$3.57 \times 10^8$ $5.36 \times 10^8$ $5.36 \times 10^8$ $5.36 \times 10^8$ $1.61 \times 10^9$	Capsules	Swiss Herbal Remedies, Canada	$7.92 \pm 0.05$
Probioflora	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	$3.33 \times 10^{14}$	Capsules	Goldim, Czech Republic	$7.17 \pm 0.01$
AB Aktiv	<i>B. bifidum</i> <i>L. acidophilus</i>	$1.00 \times 10^{14}$	Capsules	Bioservis, Czech Republic	$7.21 \pm 0.11$

<sup>a</sup> Only total count for all strains were declared.

Czech Republic) gel electrophoresis. Correct DNA fragments were then sequenced, as described previously (Killer et al., 2010). Obtained 16S rRNA genes were compared with the same gene of the *B. bifidum* type strain using the jPHYDIT program (Jeon et al., 2005).

### 3. Results and discussion

Only *B. bifidum* species (13 strains) were able to grow in the presence of mucin as the sole carbon source (Table 1). No other bifidobacterial species (21 strains) grew in the broth with mucin. Therefore, mucin utilization can be used as a selective factor for the enumeration and isolation of *B. bifidum*.

All samples of commercial products contained viable cells of *B. bifidum*, reaching counts from 7.21 to 8.20 log CFU/g (Table 2). Overall, such values were in line with the claims labeled on the products. Most products claimed the presence of approximately 9 log CFU/g of total probiotic bacteria, and approximately 8 log CFU/g of *B. bifidum* species. All bacterial isolates originated from MM agar were identified as *B. bifidum*. There was an absolute (100%) agreement among results obtained from biochemical tests (API), species-specific PCR, MALDI-TOF procedures and 16S rRNA gene sequencing method. Isolates of *B. bifidum* had  $\geq 99.8\%$  16S rRNA gene sequence similarity with type strain.

The presence of *B. bifidum* species was detected in four out of the six samples tested by qPCR, and *B. bifidum* strains were isolated from three out of six samples (Table 3). Filteau et al. (2013) tested 50 adults for the presence of fecal bacteria using qPCR procedure. Counts of *B. bifidum* ranged from 7.7 to 9.6 log<sub>10</sub> bacteria per one gram. Unfortunately, there was no information on the numbers of positive and negative samples in this paper. In our experiment, all strains of *B. bifidum* originated from qPCR-positive samples, while no *B. bifidum* strain was found in

**Table 3**  
Counts of *B. bifidum* in fecal samples detected by qPCR and cultivation methods.

Sample	log CFU/g	Isolated <i>B. bifidum</i> /total isolates
1	7.13	1/2
2	<1	0/0
3	7.78	4/8
4	<1	0/7
5	6.91	0/0
6	8.40	3/8

qPCR-negative faeces (samples 2 and 4). However, the MM agar was not fully selective, since only 30.91% of isolates belonged to the *B. bifidum* species.

As seen in Table 4, a higher number of *B. bifidum* strains were isolated from the MM agar (30.91%) than from the MTPY medium (9.17%). Both MTPY and MM agars were semi-selective for *Bifidobacterium* spp., but MM agar was more conducive to the growth of *B. bifidum*.

The number of probiotic foods and food supplements available in the market is increasing. Therefore, there is a need for developing a reliable method to evaluate the microbiological quality of these products. Today, there is only one international ISO/IDF standard for the enumeration of total bifidobacteria in fermented milk products (ISO Standard 29981/IDF 220, 2010). However, lyophilized probiotics usually contain two or three different bifidobacterial species. We therefore recommend that the MM agar can be used to enhance our ability to evaluate probiotic products.

### 4. Conclusion

Agar containing mupirocin and mucin as selective factors is suitable for the selective enumeration of the probiotic *B. bifidum* in food and food supplements. This medium, with the addition of acetic acid, is also suitable for the isolation of *B. bifidum* from human fecal samples.

### Acknowledgements

The study was supported by the grant GACR 13-08803S and CIGA 20132023.

### References

Bayoumi, M.A., Griffiths, M.W., 2012. *In vitro* inhibition of expression of virulence genes responsible for colonization and systemic spread of enteric pathogens using *Bifidobacterium bifidum* secreted molecules. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 255–263.

**Table 4**  
Percentage of *B. bifidum* strain isolated from MTPY and MM agar.

Agar	Total isolates	<i>B. bifidum</i>	Percentage of <i>B. bifidum</i>
MTPY	120	11	9.17
MM	55	17	30.91

- Biavati, B., 2012. family I. *Bifidobacteriaceae* stackebrandt, rainey and Ward-rainey 1997, 487VP. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. 5 p. 171.
- Ehrmann, M.A., Müller, M.R., Vogel, R.F., 2003. Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus milderensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 7–13.
- FAO/WHO, 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. pp. 1–34.
- Filteau, M., Matamoros, S., Savard, P., Roy, D., 2013. Molecular monitoring of fecal microbiota in healthy adults following probiotic yogurt intake. PharmaNutrition 1, 123–129.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73, 365–373.
- Hungate, R.E., 1969. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris, R., Ribbons, D.W. (Eds.), Methods in Microbiology. 3B. Academic Press, London, pp. 117–132.
- ISO/IDF, 2010. Milk products-enumeration of presumptive bifidobacteria-colony count technique at 37 °C. ISO Standard 29981:IDF 220: 2010.
- Jeon, Y.S., Chung, H., Park, S., Hur, I., Lee, J.H., Chun, J., 2005. jPHYDIT: a JAVA-based integrated environment for molecular phylogeny of ribosomal RNA sequences. Bioinformatics 21, 3171–3173.
- Killer, J., Marounek, M., 2011. Fermentation of mucin by bifidobacteria from rectal samples of humans and rectal and intestinal samples of animals. Folia Microbiol. 56, 85–89.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, J., Havlík, J., Koppová, I., Benada, O., Rada, V., Kofroňová, O., 2010. *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of bumblebees. Syst. Appl. Microbiol. 33, 359–366.
- Kim, J.Y., Park, M.S., Ji, G.E., 2012. Probiotic modulation of dendritic cells co-cultured with intestinal epithelial cells. World J. Gastroenterol. 18, 1308.
- Kmet', V., Drugdová, Z., 2012. Antimicrobial susceptibility of microflora from ovine cheese. Folia Microbiol. 57, 291–293.
- Li, S., Chen, T., Xu, F., Dong, S., Xu, H., Xiong, Y., Wei, H., 2014. The beneficial effect of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 on microbial diversity in mouse intestine. J. Sci. Food Agric. 94, 256–264.
- Macfarlane, S., Woodmansey, E.J., Macfarlane, G.T., 2005. Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7483–7492.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Tanaka, R., 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70, 167–173.
- Rada, V., Petr, J., 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. J. Microbiol. Meth. 43, 127–132.
- Ročková, S., Nevořal, J., Rada, V., Marsik, P., Šklenar, J., Hinková, A., Vlková, E., Marounek, M., 2011. Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. Int. Dairy J. 21, 504–508.
- Serafini, F., Turroni, F., Ruas-Madiedo, P., Lugli, G.A., Milani, C., Duranti, S., Zamboni, N., Bottacini, F., Van Sinderen, D., Margolles, A., 2014. Kefir fermented milk and kefir promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. Int. J. Food Microbiol. 178, 50–59.
- Turroni, F., Milani, C., van Sinderen, D., Ventura, M., 2011. Genetic strategies for mucin metabolism in *Bifidobacterium bifidum* PRL2010: an example of possible human-microbe co-evolution. Gut Microbes 2, 183–189.
- Turroni, F., Strati, F., Foroni, E., Serafini, F., Duranti, S., van Sinderen, D., Ventura, M., 2012. Analysis of predicted carbohydrate transport systems encoded by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5002–5012.
- Vlková, E., Nevořal, J., Jenciková, B., Kopečný, J., Godefrooij, J., Trojanová, I., Rada, V., 2005. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. J. Microbiol. Meth. 60, 365–373.
- Yamasaki, C., Totsu, S., Uchiyama, A., Nakanishi, H., Masumoto, K., Washio, Y., Shuri, K., Ishida, S., Imai, K., Kusuda, S., 2012. Effect of *Bifidobacterium* administration on very-low-birthweight infants. Pediatr. Int. 54, 651–656.



## 6 SHRNUÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

V dílčích tématech disertační práce byl zhodnocen současný stav a tendence zájmu o probiotika a jejich selektivní stanovení v potravinách a potravních doplňcích obecně, přístupy k hodnocení probiotických produktů Společností pro probiotika a prebiotika, o. s. (SPP) a některá konkrétní zjištění Laboratoře anaerobní mikrobiologie KMVD ČZU v Praze. Pozornost byla dále zaměřena na probiotické bakteriální druhy rodu *Bifidobacterium*. Byla testována stávající selektivní média vhodná pro stanovení bifidobakterií v potravních doplňcích; a byly vyvinuty nové selektivní půdy: agar vhodný k eliminování klostridiálních kontaminací při stanovení bifidobakterií, tzv. *modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s 8-hydroxychinolinem* (MWMQ agar); a dále bylo vyvinuto selektivní médium, tzv. *mupirocin-mucin agar* (MM agar), využitelné pro stanovení humánního probiotického druhu *B. bifidum* v probiotických potravinách, potravních doplňcích i vzorcích z GIT.

S probiotiky se nejčastěji setkáváme v mléčných kysaných výrobcích, jsou přidávány také do umělých kojeneckých výživ a běžnou formou jejich aplikace jsou i potravní doplňky. Obecně používané taxony probiotik patří mezi BMK, s dominantním zastoupením zástupců rodu *Lactobacillus*, a také rody *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Nověji je intenzivně využíván rod *Bifidobacterium* (Holzapfel et al., 2001), případně (testovány) další obyvatelé GIT, jako např. *Faecalibacterium preusnitzii*, či *Akkermansia muciniphila*. Pro selektivní stanovení probiotik jsou však k dispozici pouze normy ISO/IDF pro stanovení druhu *Lbc. acidophilus* (ISO Standard 20128/ IDF 192: 2006) ve výrobcích z fermentovaného mléka, a pro stanovení rodu *Bifidobacterium* (ISO Standard 29981/ IDF 220: 2010). Pro další probiotické taxony obdobná ustanovení neexistují. I tam však existuje požadavek na počet živých buněk obsažených v produktu reflektující tzv. terapeutické minimum (TM), který činí  $10^6$  v 1 g či 1 ml výrobku (za TM je považováno  $10^8$ -  $10^9$  buněk (Shah, 2000): to reprezentuje denní konzumaci 100 g kvalitního probiotického produktu). V České republice jsou stanoveny mikrobiologické požadavky pro mléko a mléčné výrobky dle ust. § 18 zákona č. 110/1997 Sb., v platném znění, vyhláškou č. 397/2016 Sb. (*původně 77/2003*). U monokultur, směsných kultur BMK, *Lbc. acidophilus*, dalších mezo- a termofilních BMK a také pro rod *Bifidobacterium*, vyhláška předepisuje (ve shodě s TM)  $10^6$  buněk v 1 g produktu, pouze v případě kultury jogurtové je to o řád více, tedy  $10^7$  buněk. Jogurtová kultura je zde označována jako protosymbiotická směs. Důraz je kladen na schopnost zachování životaschopnosti aplikovaných probiotik během procesu výroby produktu, i jejich přežívání

po kryokonzervaci anebo lyofilizaci (Carvalho et al., 2004), důležitá je také dostatečná koncentrace živých buněk v probiotickém produktu do konce expirační doby (Klaenhamer a Kullen, 1999; Kaur et al., 2002). Nezbytná je současně kontrola probiotik v gastrointestinálních vzorcích. Zvláště pro tyto náročné analýzy je stále nezbytné využití sofistikovaných postupů, závislých na přístrojovém vybavení (viz oddíl 2.2.2 *Metody stanovení a identifikace probiotik nezávislé na kultivaci*). Podstatné jsou zde i nároky na personální orientovanost. Probiotické potraviny (kysané mléčné produkty), analyzované v Laboratoři anaerobní mikrobiologie KMVD ČZU v Praze obecně splňovaly existující požadavek, vycházející z TM. U potravních doplňků (lyofilizovaných preparátů) však byly v některých případech zjištěny počty živých buněk nižší, než udávaly hodnoty deklarované na obalu, TM ale i tyto produkty splňovaly. Pokud jde o druhy probiotik v testovaných produktech, nejčastěji byly přítomny laktobacily a bifidobakterie. U mléčných kysaných výrobků byla detailně studována přítomnost druhů *Lactobacillus casei* a *Lbc. paracasei*. V produktech byly životaschopné buňky nacházeny v řádech od  $10^6$  do  $10^8$  KTJ/g výrobku. Bifidobakterie byly v mléčných kysaných výrobcích zastoupeny prakticky výhradně druhem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, zatímco v lyofilizovaných výrobcích to byly nejčastěji *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum*.

Dále byla testována selektivní média vhodná pro kvantifikaci nejčastěji používaných bifidobakteriálních druhů v probiotických potravních doplncích. Z různých navržených kultivačních pūd (viz oddíly 2.3.1 *Selektivní média pro stanovení bifidobakterií (bez mupirocinu)* a 2.3.2 *Selektivní média s mupirocinem*) byla zvolena efektivní varianta používající mupirocin jako selektivní faktor. Byly testovány modifikace dané využitím různých, komerčně dostupných médií, vhodných ke kultivaci bifidobakterií, vždy doplněných mupirocinem (Oxoid, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) v koncentraci 100 mg/l. Existující norma (ISO/IDF, 2010) používá transgalaktosylovaný oligosacharido-propionátový agar (TOS, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan), doplněný mupirocinem (*médium dále: TOS Mup*), ovšem v poloviční koncentraci, tedy pouze 50 mg/l. Metoda je použitelná pro mléčné výrobky, jako je fermentované a nefermentované mléko, mléčné prášky, kojenecká výživa a startovací kultury. TOS Mup agar je pro stanovení bifidobakterií efektivní i v přítomnosti BMK. Základní médium TOS je již mnoho let komerčně vyráběné a dodávané na trh výhradně společností Yakult-Japan. TOS s mupirocinem je ale licencován, vyráběn i dodáván na trh společností VWR (Raeisi et al., 2013). Použití mupirocinu jako selektivního faktoru pro izolaci a kvantifikaci bifidobakterií u fermentovaných mléčných

výrobků bylo poprvé popsáno Radou a Kocem v roce 2000 (viz oddíl 2.3.2 *Selektivní média s mupirocinem*). Autoři doporučili použití Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), doplněného mupirocinem (100 mg/l). Toto základní médium bylo později modifikováno a testováno v experimentu, který je součástí této disertační práce (viz podkapitola 5.2 *Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements*). Agar zde byl ještě doplněn sójovým peptonem (5 g/l; pro obsah galaktooligosacharidů (GOS) podporujících růst bifidobakterií), L-cysteinem (0,5 g/l) a Tweenem 80 (1 ml/l); (*dále: WSP Mup*). Další testovanou, komerčně dostupnou půdou, byl agar pro stanovení bifidobakterií, z nabídky Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); (*dále: BSM Mup*). Pro ověření selektivních vlastností těchto agarů bylo použito celkem 13 různých probiotických doplňků (lyofilizovaných kapslí, sáčků a kapek; u všech byla potvrzena přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium*), komerčně dostupných na evropském trhu. Současně byly na jednotlivých testovaných selektivních půdách kultivovány typové kmeny (TS, type strain) bifidobakterií (z *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Leibniz, Německo*). Všechny čisté kultury bifidobakteriálních kmenů byly schopné růst na všech testovaných médiích v počtech od 5,78 do 10,25 log<sub>10</sub> KTJ/ml, v závislosti na primárním růstu jednotlivých kmenů. Všechny testované kmeny bifidobakterií, s výjimkou kmene *B. bifidum* DSM 20456<sup>T</sup>, vykazovaly podobné výsledky u všech testovaných kultivačních půd, pouze TS *B. bifidum* DSM 20456<sup>T</sup> vykazoval statisticky významně nižší růst v médiu TOS Mup ve srovnání s médii WSP Mup a BSM Mup. Získané výsledky byly ověřeny užitím dalších tří kmenů *B. bifidum* (DSM 20082, DSM 20215 a DSM 20239): dva z těchto kmenů (DSM 20082 a DSM 20215) vykazovaly stejný růst na všech testovaných médiích, kmen *B. bifidum* DSM 20239 však shodně s kmenem DSM 20456<sup>T</sup>, vykazoval statisticky významně nižší růst v TOS Mup médiu v porovnání s médii WSP Mup a BSM Mup. To by mohlo být způsobeno omezenou schopností některých kmenů využívat transgalaktosylované oligosacharidy, získané v TOS agaru transformací laktosy enzymem  $\beta$ -galaktosidasou (Raeisi et al., 2013). Galaktooligosacharidy (GOS) nejsou substrátem akceptovaným všemi bifidobakteriálními druhy, např. podle Miranda et al. (2014), kmen *B. animalis* ssp. *animalis* CIRMBIA 1335 nevykazoval v médiích s GOS žádný růst. Použité varianty mupirocinového média se ukázaly jako plně selektivní, mupirocin potlačuje růst laktobacilů, laktokoků, leukonostoků a streptokoků, bez výrazné inhibice bifidobakterií (Rada a Koc, 2000, Raeisi a kol., 2013), což odpovídá také našim výsledkům. Všechny kmeny kultivované na selektivních agarech doplněných mupirocinem (100 mg/ l) byly identifikovány jako bifidobakterie. Norma ISO/IDF (IDF, International Dairy Federation) uvádí, že



antibiotikum mupirocin (50 mg/ l) inhibuje růst většiny BMK, aplikovaných v mléčných výrobcích. Při našich testech však úplná selektivita dávky 50 mg/ l nebyla potvrzena. Vyhovující selektivity půd u všech analyzovaných probiotických produktů bylo dosaženo až při zvýšení dávky mupirocinu na 100 mg/ l. Počet bifidobakteriálních KTJ se u jednotlivých produktů zahrnutých v naší studii při aplikaci testovaných modifikací komerčně dostupných půd, doplněných mupirocinem (TOS Mup, BSM Mup, WSP Mup), významně nelišil: počty bifidobakterií se pohybovaly mezi  $10^7$  až  $10^{10}$  KTJ/g. Pouze v jednom případě testovaný produkt (Bifiform *drops*) obsahoval méně než  $10^6$  KTJ/ml bifidobakterií. Vzhledem k tomu, že výrobci probiotických doplňků obsahujících více bakteriálních taxonů neuváděli jejich jednotlivá procentuální zastoupení, bylo vyhodnocení bifidobakteriálních počtů obtížné. Stanovení komplikovala také skutečnost, že deklarované počty se vztahovaly k množství probiotik v jedné kapsli, avšak hmotnost obsahu této kapsle nebyla součástí informace na obalu výrobku. Pouze čtyři z hodnocených probiotických produktů (Super Dophilus, Infant Acidophilus, Apo-Baby Probio, Doggy Care) jasně deklarovaly počty životaschopných bifidobakterií. Realizované rozborů ve všech těchto případech potvrdily uváděné hodnoty. Také někteří další autoři poukazují na fakt, že počty a dokonce i zjištěné druhy probiotik použitých v produktech, nejsou vždy v souladu s údaji uvedenými na obalech (Coeuret et al., 2004; Temmerman et al., 2003). Lze tedy konstatovat, že informace poskytované výrobcem nejsou vždy dostatečné, a bylo by dobré se soustředit na vznik vyhovující formy regulace trhu s probiotickými produkty.

Při stanovení probiotických kmenů je důležitým faktorem přítomnost, resp. eliminace vlivu kontaminantů, či obecně jiných skupin mikroorganismů, v analyzovaném vzorku. Ve funkčních potravinářských výrobcích je rod *Bifidobacterium* intenzivně testován (Sarkar 2013), podobně, jako je studována funkce těchto bakterií v hostitelském organismu např. při probiotických terapiích gastrointestinálních onemocnění (Williams et al., 2010). Efektivita selektivních medií pro izolaci probiotických bifidobakterií zůstává stále problémem zejména v oblasti intestinální mikrobiologie, kde izolace bifidobakterií z lidských fekálních vzorků a z fekálních vzorků zvířat pomocí selektivních agarových půd může být často velmi problematická. Zejména, pokud se jedná o analýzy vzorků, ve kterých není přítomnost bifidobakterií výrazná, typicky např. při dominanci klostridií, a zvláště, jsou-li tyto přítomny ve vyšších počtech. Nejsou-li při kultivaci tyto kontaminující taxony v růstu omezeny, může být výrazně potlačen růst sledovaných bifidobakterií. Jejich počty jsou tak i několikrát *maskovány* a stanovení bifidobakterií potom výrazně neodpovídají reálnému stavu. Bylo proto

modifikováno stávající selektivní médium Wilkins Chalgren agar s mupirocinem (MWM) 8-hydroxychinolinem (8HQ), u kterého byly v nedávné době prokázány nejenom obecně antimikrobiální účinky (Inderjit et al., 2010), ale také selektivní antiklostridiální účinky. 8HQ negativně ovlivňuje růst poměrně širokého mikrobiálního spektra: Houdkova et al. (2017) referují o výrazné inhibici *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae* při nízkých koncentracích 8HQ; MIC mezi 2 - 128 µg/ml. Chung et al. (2015) zmiňují inhibici růstu gramnegativních *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*, a grampozitivních *Staphylococcus aureus* a *S. epidermidis*, další autoři deklarují antibakteriální působení 8HQ vůči *Yersinia pseudotuberculosis* a intracelulární *Chlamydia trachomatis* (Enquist et al., 2012), *Mycobacterium tuberculosis* (Darby a Nathan, 2010; Shah et al., 2016) i jiným (patogenním) bakteriálním druhům (Yang et al., 2013). Jeon et al. (2009) srovnali antibakteriální vliv 8HQ na několik lidských intestinálních bakteriálních druhů a doložili výraznou inhibici (již při koncentraci 0,02 mg/disk; disková difúzní metoda) u druhů *E. coli* a klostridií *Clostridium difficile* a *Cl. perfringens*. Naproti tomu, druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lbc. casei* a *Bifidobacterium bifidum* zde nebyly inhibovány vůbec. Růst dalšího poddruhu *B. longum* subsp. *longum* byl pouze mírně negativně ovlivněn. A to až při vysokých koncentracích 8HQ, jednalo se řádově o deseti až stonásobku funkčním pro *E. coli* a klostridie, tj 1 - 2 mg/disk. Skrivanova et al. (2016) uvádějí obdobně MIC pro *Cl. perfringens* 16 - 32 násobně nižší než pro bifidobakterie (*B. animalis*, *B. gallinarum*, *B. longum*). *B. longum* subsp. *longum* (kmen CCMDMND BL1) testovali s použitím průtokové cytometrie Novakova et al. (2014) ve společné kultuře s *Cl. difficile* (kmen CECT 531), a zaznamenali velmi dobrý inhibiční efekt 8HQ na klostridiální kmen, přičemž růst testovaného bifidobakteriálního kmene negativně ovlivněn nebyl. Pokud jde o citlivost k 8HQ u bifidobakterií, lze tedy s určitou mírou pravděpodobnosti očekávat její druhovou a jistou kmenově závislou míru. Nově komponovaný *modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s 8HQ* (MWMQ) byl v první řadě testován na čistých kmenech bifidobakterií a klostridií, poté na směsných kulturách obou bakteriálních skupin (přípravených v různých vzájemných poměrech), a také při analýze fekálních vzorků. Výsledky ukázaly, že přítomnost 8HQ v médiu prokazatelně inhibovala růst nebifidobakteriálních kmenů na MWMQ ve srovnání s MWM, zatímco počty bifidoabakterií zůstaly na uspokojivých úrovních. Lze tedy konstatovat, že MWMQ je možné použít nejenom pro běžná stanovení čistých kultur bifidobakterií, ale i pro jejich izolaci z fekálních vzorků člověka a savců, kde nejsou bifidobakterie početně dominantní, a jsou-li současně ve vzorku přítomny klostridie ve vysokých počtech. Testováno bylo celkem 17 bifidobakteriálních a 20 klostridiálních čistých

kmenů. Provedené testy prokázala jako nejvhodnější koncentraci účinné látky 8HQ 90 mg l<sup>-1</sup>. Současně bylo zjištěno, že koncentrace 8HQ vyšší nebo rovnající se 100 mg l<sup>-1</sup> 8HQ již vedla ke snížení počtů některých bifidobakteriálních kmenů (snížení růstu o 2 log<sub>10</sub> KTJ ml l<sup>-1</sup> nebo více), zatímco koncentrace nižší než 70 mg l<sup>-1</sup> 8HQ naopak zcela neinhibovaly všechny testované klostridiální kmeny. V MWMQ médiu vykazovaly pouze dva kmeny bifidobakterií (*B. adolescentis* H1 a *B. longum* J2) významně (P < 0,05) nižší růst (Příloha 1 - Table S1). Takovou situaci však lze očekávat, je-li při skladbě selektivního média použito více současně působících selektivních faktorů (Apajalahti et al., 2003; Davis, 2014). Dále byla testována selektivita MWMQ agarů a původního MWM agarů pomocí směsí čistých kmenů bifidobakterií a klostridií v různých poměrech, ve srovnání s kontrolním MW agarem (neobsahujícím žádné selektivní doplňky). Ve většině případů se průměrné počty bakterií stanovených na MW agaru významně nelišily od počtů zjištěných na MWM médiu a odpovídaly celkovému počtu inokulovaných bakterií. Skutečnost, že MWM agar není plně selektivní a umožňuje růst klostridií, byla potvrzena rodovou identifikací izolátů. Vlкова et al. (2005) se touto problematikou detailně zabývali a zjistili, že ve směsných kulturách bifidobakterií a klostridií, kde oba bakteriální rody byly zastoupeny ve stejném poměru, tvořily bifidobakterie pouze 55 z celkového počtu 120 izolátů. Na MWMQ agaru byly detekovány signifikantně nižší počty bakterií ve srovnání s MWM agarem a kontrolním, neselektivním MW médiem. Počty na MWMQ také v tomto případě odpovídaly počtům inokulovaných bifidobakterií. U MWMQ agarů byla v jednom případě zaznamenána snížená citlivost, konkrétně kmene *Cl. clostridioforme* MAM, který nepravidelně a ve velmi nízkých počtech vytvářel výrazně malé kolonie. Naopak, kmen *Cl. difficile* KK4 nebyl detekován na žádném použitém selektivním médiu, což lze vysvětlit také zjištěním Sutherlanda et al. (1985), kteří zmiňují citlivost *Cl. difficile* k mupirocinu (MIC = 32 mg l<sup>-1</sup>). Mupirocin byl přítomen v obou námi testovaných selektivních půdách. I zde ale byla prokázána velmi dobrá selektivita vyvinutého média obsahujícího 8HQ, neboť všechny kultivované izoláty byly identifikovány jako bifidobakterie. Při rozbořích gastrointestinálních vzorků dospělých lidí byly testované MWM a MWMQ agary pro bifidobakterie vysoce selektivní. Byly zde detekovány ve všech testovaných vzorcích, u fekálních vzorků kojenců ale nebyly v některých případech v rozbořích vůbec zachyceny. Vzorky byly proto rozděleny do dvou skupin v závislosti na přítomnosti (B+), či nepřítomnosti (B-) bifidobakterií, každá skupina zahrnovala 5 vzorků. U všech B+ vzorků kojenců byly všechny kmeny izolované oběma testovanými selektivními médii identifikovány jako bifidobakterie. Růst bifidobakterií nebyl vlivem selektivních médií ovlivněn, protože mezi jejich počty na MW, MWM a MWMQ agarech

nebyl signifikantní rozdíl ( $P > 0,05$ ). U *B*- vzorků kojenců byly celkové počty bakterií na MWM agaru ( $8,30 \pm 0,78 \log_{10}$  KTJ  $g^{-1}$ ) významně vyšší, než počty na MWMQ agaru ( $3,82 \pm 1,46 \log_{10}$  KTJ  $g^{-1}$ ). Mezi kmeny izolovanými užitím selektivních MWM a MWMQ agarů převažovaly v obou případech klostridie, ale jejich počty na MWMQ agaru byly velmi nízké a na plotnách realizované pouze jako mikrokolonie. U 5 z celkového počtu 10 testovaných gastrointestinálních vzorků kojenců porozených císařským řezem bifidobakterie chyběly - v souladu s výsledky, které popisují Vlkova et al. (2005) a Liu et al. (2015). Selektivita MWMQ média byla také testována prostřednictvím rozborů fekálních vzorků psů. Byly identifikovány tři *B*+ a tři *B*- vzorky. U *B*+ vzorků existovaly signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi průměrnými celkovými počty anaerobů (CPA) na MW, MWM a MWMQ. Na MWM byly bifidobakterie stanoveny pouze v jednom ze tří testovaných vzorků, zatímco z ostatních dvou vzorků nebyly izolovány žádné bifidobakterie. Naopak u těchto dvou vzorků byly izolovány bifidobakterie prostřednictvím MWMQ agaru v počtech cca  $3 \log_{10}$  KTJ  $g^{-1}$ . Pokud by pro stanovení bifidobakterií zde byla použita kultivace na MWM agaru, oba tyto vzorky by byly vyhodnoceny jako *B*-, právě díky realizovanému růstu klostridií. Médium MWMQ také zde vykazovalo podstatně vyšší selektivitu ve srovnání s MWM agarem, vzhledem k tomu, že 24 izolátů z celkového počtu 29 získaných kultivací na MWMQ agaru bylo identifikováno jako *Bifidobacterium* sp. U zbývajících 5 vzorků se, spolu s klostridiemi, objevily také Gram-pozitivní pleomorfní, fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa negativní tyčinky, které byly preidentifikovány jako propionové bakterie. U *B*- psích vzorků byly zaznamenány signifikantně vyšší ( $P < 0,05$ ) počty u MWM agaru, ve srovnání s MWMQ agarem. Průměrné počty anaerobních bakterií na MWMQ se pohybovaly v rozmezí  $2,96 \pm 1,51 \log_{10}$  KTJ  $g^{-1}$ , a byly identifikovány jako klostridie. MWMQ agar se zdá ovšem být vhodný i pro stanovení bifidobakterií ve fekálních vzorcích psů, vzhledem k tomu, že bifidobakterie byly tímto médiem úspěšně stanoveny i ve vzorcích, které se pro dominantní výskyt klostridií zdály být při užití selektivního MWM agaru *B*-. Také ve fekálních vzorcích prasat umožňovaly obě testované selektivní půdy stanovení vysokých počtů bifidobakterií. Nicméně, mezi kmeny izolovanými MWM agarem bylo v tomto případě identifikováno také 7 klostridiálních kmenů, z celkového počtu 36 izolátů. Užitím MWMQ agaru byl však izolován pouze jediný kmen, identifikovaný jako bakterie rodu *Clostridium*. To svědčí o přesnějším stanovení bifidobakterií prostřednictvím MWMQ agaru také pro tyto aplikace. Lze konstatovat, že selektivní faktor 8HQ výrazně zlepšil bifidobakteriální selektivitu a specifitu MWM agaru. Agar MWMQ se ukázal být vhodný pro selektivní stanovení bifidobakterií, je však zřejmé, že také jejich růst je mírně negativně ovlivněn (*Příloha 2 - Table S2*).



**Obr. 6** Porovnání fermentačních profilů kmenů *B. bifidum* a *B. animalis* subsp. *lactis*: a/ *B. bifidum* DSM 20082, b/ *B. bifidum* JKM, c/ *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140<sup>T</sup>, d/ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, soupravami biochemických testů API 50 CH (Biomérieux, France). Žlutá barva značí pozitivní reakci, u pozice 25 (cca uprostřed sestavy) černá (foto: autor, 2015). Testované substráty viz Příloha 3 - Tab. S3.

Srovnání MWM a MWMQ naznačuje, že obě selektivní půdy mohou být úspěšně použity pro stanovení bifidobakterií, jsou-li tyto dominantní bakteriální skupinou ve vzorku. MWMQ agar přináší ovšem výhodu při analýze vzorků s nízkým zastoupením bifidobakterií, kdy

účinně snižuje počet nebifidobakteriálních buněk ve srovnání s původním MWM agarem, a proto nově vyvinuté MWMQ médium může být, zdá se, úspěšně použitelné pro náročné stanovení bifidobakterií v gastrointestinálních vzorcích lidského i živočišného původu.

Zajímavé se zdá být selektivní stanovení probiotického druhu *B. bifidum*. Tento indigenní komensál lidského GIT (Biavati, 2012), je ideálním probiotikem (Bayoumi a Griffiths, 2012; Li et al., 2014; Yamasaki et al., 2012), obecně využívaným zvláště v lyofilizovaných potravních doplňcích. Jedná se o jediný bifidobakteriální druh schopný



**Obr. 7 Testování utilizace mucinu: pozitivní reakce (vpravo) je doprovázena změnou barvy indikátoru v médiu z hnědé na žlutou; foto: autor, 2015.**

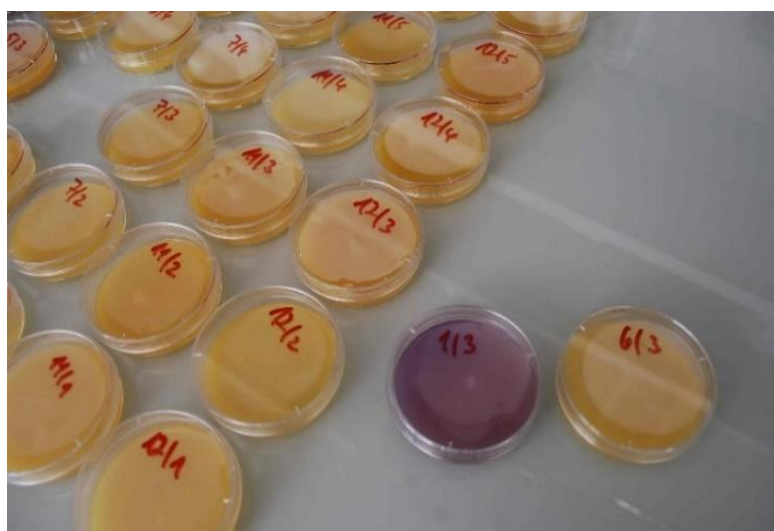
v čisté kultuře využívat intestinální mucin (Killer a Marounek, 2011). Mucin byl proto použit jako potencionální selektivní faktor. Degradaci mucinu bakteriemi je ovšem možné obecně považovat za patogenní aktivitu cílenou na ochranné slizniční povrchy (Turroni et al., 2011), u rezidentů GIT se ale jedná o logickou adaptaci a druh *B. bifidum* lze i z tohoto úhlu pohledu jistě považovat za prospěšný. *B. bifidum* je relativně velkým *potravním specialistou*, a dokáže využít pouze úzké spektrum sacharidů (Turroni et al., 2012; *Obr. 6 a Příloha 3 - Tab. S3*). Jako selektivní faktor pro stavbu média byl použit prasečí mucin (Mucin from porcine stomach type II, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Využití mucinu bifidobakteriemi bylo testováno jednak za použití půdy obsahující trypton (5 g/l), pepton (5 g/l), yeast extract (2,5 g/l), Tween 80 (1 ml/l), L cystein-hydrochlorid (0,25 g/l), mucin (20 g/l), a bromkresolovou červen (0,01 g/l); mucin



a bromkresolová červeň (Sigma-Aldrich, USA, ostatní komponenty Oxoid), při pH média 7,4; a současně s použitím Wilkins-Chalgren média (Oxoid, UK), při stejném pH. Kultury byly kultivovány za anaerobních podmínek realizovaných pomocí roll-tube techniky (Hungate, 1969), při 37°C po dobu 48 hodin. Utilizace mucinu byla doprovázena změnou barvy indikátoru v médiu (z fialové na žlutou; Obr. 7).

Následně bylo vyvinuto selektivní médium mupirocin-mucin agar, tzv. MM agar, složené z tryptonu (5 g/l), peptonu (5 g/l), yeast extractu (2,5 g/l), Tweenu 80 (1 ml/l), L cystein-hydrochloridu (0,25 g/l), mucinu (20 g/l), mupirocinu (0,1 g/l) a agaru (15 g/l): (mucin Sigma-Aldrich, ostatní složky Oxoid), při pH 7,4. MM agar byl použit pro stanovení a izolaci *B. bifidum* z probiotických potravních doplňků (Obr. 8).



**Obr. 8 Kultivace kmenů bifidobakterií v MM agaru. Využití mucinu jako substrátu je doprovázeno změnou barvy indikátoru v médiu z fialové na žlutou (pozitivní reakce), ta ukazuje na přítomnost kmenů *B. bifidum*; foto: autor, 2015.**

Všechny vzorky komerčních produktů obsahovaly životaschopné buňky *B. bifidum* v počtech od 7,21 do 8,20 log KTJ/g. Zjištěné hodnoty byly v souladu s nároky kladenými na probiotické produkty, většina testovaných produktů deklarovala přítomnost přibližně 9 log KTJ/g probiotických bakterií, příp. cca 8 log KTJ/g konkrétně druhu *B. bifidum*. Všechny izoláty získané prostřednictvím kultivace na MM agaru byly identifikovány jako *B. bifidum*. Byla zde absolutní (100%) shoda s výsledky na základě biochemických testů (API), druhově

specifické PCR, MALDI-TOF analýzy a komparativní analýzou genu pro 16S rRNA (min. 99,8% shody s referenčním, typovým kmenem).

Dále byla testována modifikace MM agaru pro stanovení *B. bifidum* ve fekálních vzorcích. Přítomnost druhu byla zjištěna ve 4 ze 6 vzorků testovaných qPCR, kmeny *B. bifidum* byly ale izolovány pouze ze 3 z 6 vzorků. Filteau at al. (2013) testovali u 50 dospělých lidí přítomnost fekálních bakterií užitím qPCR: počty *B. bifidum* se pohybovaly mezi 7,7 a 9,6 log<sub>10</sub> bakteriálních buněk/g. Autoři bohužel neuvádějí žádné informace o počtech pozitivních a negativních vzorků. Podle našich zjištění patřily všechny kmeny identifikované pomocí qPCR v B+ pozitivních vzorcích druhu *B. bifidum*. Naopak, žádný kmen *B. bifidum* nebyl nalezen ve vzorcích B-. Nicméně, MM agar se zde neukázal být plně selektivním, pouze 30,91% izolátů patřilo druhu *B. bifidum*. Procentuálně větší množství kmenů *B. bifidum* však bylo izolováno prostřednictvím NM agaru (30,91%), než užitím MTPY agaru (9,17%). Obě půdy tedy sice vykazovaly pouze částečnou bifidobakteriální selektivitu, MM agar se ale ukázal být výrazně vhodnějším pro růst druhu *B. bifidum*. Lidské fekální vzorky byly následně analyzovány také pomocí MM agaru doplněného o ledovou kyselinu octovou (1 ml/l; pH 5,0). Bifidobakteriální kmeny, použité pro testování nového selektivního agaru, pocházely ze sbírek kultur (ATCC, DSMZ, a CCM), nebo byly izolovány pomocí TPY agaru s mupirocinem (100 mg/l) a ledovou kyselinou octovou (1 ml/l) podle Rada a Petr (2000). Izolované kmeny byly identifikovány na úroveň druhu podle Vlková et al. (2005). Testované probiotické produkty byly zakoupeny na trhu v České republice. Anaerobní prostředí pro kultivaci bylo vytvořeno anaerostaty (Oxoid, HP11A), misky byly kultivovány v CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (20/80) atmosféře, při teplotě 37°C po dobu 48 hodin. Pro potvrzení přítomnosti *B. bifidum* v MM agaru byly současně izolovány bakterie z kolonií, tyto byly očkované do Wilkins-Chalgren agaru a kultivovány při 37°C po dobu 48 hodin a poté identifikovány. Dále byly testovány gastrointestinální vzorky 11 zdravých dobrovolníků (6 žen a 5 mužů ve věku mezi 22 a 51 roky). Ve vzorcích byly pomocí modifikovaného TPY agaru (MTPY) s mupirocinem (100 mg/l) a ledovou kyselinou octovou (1 ml/l) stanoveny celkové počty bifidobakterií. Pro selektivní izolaci *B. bifidum* byly vzorky současně také kultivovány v MM agaru doplněném ledovou kyselinou octovou (1 ml/l). Kvantifikace *B. bifidum* byla provedena kvantitativní PCR. Byly analyzovány fekální vzorky 6 zdravých dobrovolníků (3 ženy a 3 muži ve věku mezi 27 a 50 roky). *B. bifidum* bylo kvantifikováno primery G-Bifid-F + G-Bifid-R a BiBIF-1 + BiBIF-2 (Matsuki et al., 2003). Pro konstrukci standardní křivky byl použit *B. bifidum* ATCC 29521<sup>T</sup>. Izoláty byly identifikovány na druhovou úroveň podle



Vlková et al. (2005). Byly použity biochemické testy (API 50 CHL a API ID 32A, Biomérieux, Francie), druhově specifická PCR, MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Německo) podle Kmet' a Drugdová (2012) a sekvenací genu pro 16S rRNA podle Ehrmann et al. (2003) a Killer et al. (2010). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu jPHYDIT (Jeon et al., 2005). V médiu obsahujícím mucin jako jediný zdroj uhlíku bylo kultivováno celkem 34 bifidobakteriálních kmenů, z nich však pouze 13 kmenů druhu *B. bifidum* bylo schopno mucin využívat. Žádný další z testovaných druhů bifidobakterií ovšem v tomto médiu nerostl. Je proto možné využít schopnost utilizace mucinu druhem *B. bifidum* jako selektivního faktoru pro jeho druhové stanovení a izolaci.

V Laboratoři anaerobní mikrobiologie KMVD byla testována také média pro selektivní stanovení druhů *B. longum* a *B. breve*. Byla užita stávající, modifikovaná média s různými zdroji uhlíku: pro stanovení *B. longum* turanosa, pro *B. breve* sorbitol a mannitol. Skladbu těchto médií bude ale nutné dále modifikovat. Odlišný růst *B. breve* (2 kmeny) a dalšího bifidobakteriálního druhu *B. animalis* (4 kmeny) v přítomnosti různých substrátů testovali také Trojanová et al. (2006) ze stejné laboratoře. Jako zdroj uhlíku v kultivačním médiu byla použita glukosa a rafinosa (a jejich směsi). Všechny kmeny *B. animalis* a jeden kmen *B. breve* rostly pomaleji v médiu s glukosou než s rafinosou nebo směsí obou sacharidů; jeden kmen *B. breve* rostl rychleji na směsi glukosy a rafinosy než na samotné rafinose, zatímco 2 kmeny *B. animalis* rostly naopak rychleji na rafinose než v přítomnosti obou sacharidů. Oba testované kmeny *B. breve* využívaly současně glukosu i rafinosu. Naproti tomu všechny kmeny *B. animalis* vykazovaly atypický růst rychlým využitím rafinosy, po němž následovalo pomalé využití glukosy. Morfologie buněk všech kmenů *B. animalis* byla ovlivněna substrátem použitým pro kultivaci. V půdách obsahujících glukosu byly pozorovány drobné a spíše sférické buňky, zatímco v médiích s rafinosou bakterie realizovaly buňky velké a druhově specifického tvaru (Trojanová et al., 2006). Zjištění autorů se v tomto případě zdá být využitelné pro vypracování postupu (příp. práci na stavbě selektivního média) pro odlišení studovaných bifidobakteriálních druhů. Obecnou platnost preferenčního využití sledovaných sacharidů těmito bifidobakteriálními druhy i takovou (specifickou) kultivací indukovanou odlišnou morfologií jejich buněk by bylo zajímavé ověřit na větším počtu kmenů, pocházejících z různých prostředí (zdrojů). Zdá se také realistické propojit zmiňované informace s daty získanými např. díky NGS analýzám a pracovat v tomto směru s atraktivními tématy *ekologické mikrobiologie*.

## 7 ZÁVĚRY A PERSPEKTIVY

Stanovení většiny probiotických bakterií v potravinách a potravních doplňcích je možné, a při kombinaci různých metodických přístupů spolehlivé. Metody nelze využívat univerzálně, postupy vhodné pro stanovení BMK v mléčných výrobcích nemusejí vyhovovat pro podobná (stejná) stanovení u jiných typů vzorků. Většina probiotických produktů, testovaných Společností pro probiotika a prebiotika, o. s. v Laboratoři anaerobní mikrobiologie KMVD FAPPZ na ČZU v Praze, obsahovala deklarované mikroorganismy, počty živých bakterií byly však v některých případech nižší. Je zřejmá potřeba kontroly probiotik (a její standardizace) či synbiotik v potravinách, potravních doplňcích, i ostatních komoditách, v nichž jsou tyto bakterie inkorporovány. Aktuální jsou analýzy intestinálních komensálů, např. bifidobakterií. Pro selektivní stanovení probiotických zástupců tohoto rodu využívaných v mléčných produktech existuje mezinárodní standard. Ten používá zmiňovaný transgalaktosylovaný oligosacharido-propionátový agar doplněný mupirocinem (označujeme jako *TOS Mup*). Norma pro obdobné analýzy probiotických potravních doplňků, kde je běžná přítomnost většího počtu různých bifidobakteriálních kmenů (druhů), však neexistuje. Byly tedy analyzovány probiotické potravní doplňky dostupné na trhu, a pro stanovení kvantity bifidobakterií v těchto produktech použity 3 vhodné kultivační půdy shodně doplněné mupirocinem. Všechna testovaná média se ukázala jako spolehlivá pro selektivní potvrzení přítomnosti bifidobakterií, všechny kmeny izolované těmito selektivními půdami byly identifikovány jako bifidobakterie. Půdy označované jako BSM Mup a WSP Mup (mupirocin v koncentraci 100 mg/l) se ukázaly být vhodné pro selektivní stanovení bifidobakterií v probiotických potravních doplňcích při využití plotnové metody a kultivace za anaerobních podmínek. Standardní médium *TOS Mup*, paradoxně, nepodporovalo ideálně růst všech bifidobakteriálních kmenů a nezdá se tedy pro tyto analýzy aktuální. Ukázalo se také, že údaje deklarované na obalech produktů nejsou, v mnoha případech, pro ověření počtů bifidobakterií dostatečné.

Stálým problémem při stanovení bifidobakterií v potravinách, potravních doplňcích i gastrointestinálních vzorcích, jsou jejich kontaminace anebo standardní přítomnost jiných bakteriálních skupin v analyzovaných vzorcích. Typicky obtížná bývá např. přítomnost klostridií. Bylo tedy vyvinuto selektivní médium vycházející ze standardní kultivační půdy s mupirocinem (*MWM agar*) a doplněné o 8-hydroxychinolin (*8HQ*), u kterého byla potvrzena antiklostridiální aktivita. Tato úprava výrazně zlepšila bifidobakteriální selektivitu

a specificitu MWM agaru. Agar s 8HQ, označený jako MWMQ agar, se ukázal být vhodný pro selektivní stanovení bifidobakterií, ačkoliv mírně omezuje v růstu i bakterie sledovaného rodu. MWMQ agar však ve srovnání s původním MWM agarem při analýze vzorků, kde bifidobakterie nejsou dominantní bakteriální skupinou, výrazně snižuje právě počty jiných skupin bakterií, a zdá se být proto při obtížných rozborech účinným nástrojem (úspěšně použitelným i pro náročné stanovení bifidobakterií ve vzorcích z lidského a živočišného trávicího traktu).

Bylo také vyvinuto selektivní médium s mupirocinem a mucinem, tzv. MM agar, pro stanovení důležitého probiotického druhu *Bifidobacterium bifidum*. Tato bifidobakterie, indigenní v lidském GIT, bývá dnes běžně aplikována v lyofilizovaných probiotických či symbiotických preparátech. Pro stanovení *B. bifidum* bylo využito specifické vlastnosti druhu využívat jako zdroj uhlíku mucin. Vyvinutý MM agar byl pro stanovení tohoto druhu plně selektivní (100%) v přítomnosti kmenů probiotik *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *longum* a typických bakterií mléčného kvašení (laktobacilů, streptokoků). Nicméně při analýzách gastrointestinálních vzorků patřilo pouze 30,91% izolátů druhu *B. bifidum*; MM agar doplněný o ledovou kyselinu octovou, se však ukázal být vhodným také pro izolaci *B. bifidum* ze vzorků lidského GIT.

Vývojem nových selektivních kultivačních půd a postupů vhodných pro stanovení probiotických bakterií, v první řadě bifidobakterií obývajících GIT člověka, hospodářských zvířat a dalších živočichů, s využitím jednoduchých postupů ideálních pro rutinní kontrolu probiotik v běžných laboratořích, byl realizován cíl práce. Obě vyvinuté selektivní půdy, MWMQ agar i MM médium, mají specifická omezení, jsou však funkční, a umožní exaktnější analýzy vzorků obsahujících probiotické bifidobakterie. Hypotéza, která předpokládala využití odlišných fyziologických vlastností různých taxonů probiotických bakterií, v první řadě jejich schopnosti využít odlišné zdroje organického uhlíku a jejich různé rezistence k antimikrobiálním látkám, pro vývoj nových kultivačních médií či postupů byla potvrzena. Získané informace umožní detailnější pochopení principu funkce sledovaných skupin bakterií a jejich využití v potravinářství a medicíně. Nově vyvinutá média mohou dále sloužit pro izolaci nových kmenů potencionálních probiotik (*Příloha 4 a 5*).

## 8 SEZNAM LITERATURY

- AAGAARD K., MA J., ANTONY K.M., GANU R., PETROSINO J. ET AL. 2014.** The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6(237): 237ra65.
- ABE F., ISHIBASHI N., SHIMAMURA S. 1995.** Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Dairy Sci* 78: 2838-2846.
- ANADON A., MARTINEZ-LARRANAGA, M.R., ARANZAZU, M.M. 2006.** Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 45: 91-95.
- APAJALAHTI J.H.A., KETTUNEN A., NURMINEN P.H., JATILA H., HOLBEN W.E. 2003.** Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. *Appl Environ Microbiol* 69: 5731-5735.
- ARROYO L., COTTON L.N., MARTIN J.H. 1994.** Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis*, and *B. longum* from pure culture. *Cult Dairy Prod* 29: 20-24.
- ARSKOLD E., LOHMEIER-VOGEL E., CAO R., ROOS S., RANDSTROM P. ET AL. 2007.** Phosphoketolase Pathway Dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 Containing Dual Pathways for Glycolysis. *Bacteriol* 190(1): 206-212.
- ARUMUGAM M., RAES J., PELLETIER E., LE PASLIER D., YAMADA T. ET AL. 2011.** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174-180.
- ASHRAF R., SMITH S.C. 2015.** Selective enumeration of dairy based strains of probiotic and lactic acid bacteria. *Int Food Research* 22(6): 2576-2586.
- BALLONGUE J. 2004.** Bifidobacteria and probiotic action. In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. Marcel Dekker, New York: 67-123.
- BANASZKIEWICZ A, SZAJEWSKA H. 2005.** Probiotics in the treatment of constipation: a systematic review of randomized controlled trials. *Pediatr Wspolczesna* 7: 9-14.
- BARNES E.M. 1956.** Tetrazolium reduction as a means of differentiating *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus faecium*. *Gen Microbiol* 14(1): 57-68.
- BARTOSCH S., FITE A., MACFARLANE G.T., MCMURDO M.E.T. 2004.** Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 70: 3575-3581.
- BASSETTI S., FREI R., ZIMMERLI W. 1998.** Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii*. *Am Med* 105: 71-72.
- BAYOUMI, M.A., GRIFFITHS, M.W. 2012.** In vitro inhibition of expression of virulence genes responsible for colonization and systemic spread of enteric pathogens using *Bifidobacterium bifidum* secreted molecules. *Int Food Microbiol* 156: 255-263.
- BELZER C., DE VOS W.M. 2012.** Microbes inside – from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *ISME* 6: 1449-1458.
- BENTLEY D.R., BALASUBRAMANIAN S., SWERDLOW H.P., SMITH G.P., MILTON J. ET AL. 2008.** Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456: 53-59.

- BERER K., KRISHNAMOORTHY G. 2012.** Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol* 123(5): 639-651.
- BERER K., MUES M., KOUTROLOS M., AL RASBI Z., BOZIKI M. ET AL. 2011.** Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479: 538-541.
- BERG J., LINDQVIST L., ANDERSSON G., NORD C. 1983.** Neuraminidase in *Bacteroides fragilis*. *Appl Environ Microbiol* 46: 75-80.
- BESSELINK M.G., SANTVOORT H.C., BUSKENS E., BOERMEESTER M.A., VAN GOOR H. ET AL. 2008.** Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo- controlled trial. *Lancet* 371(9613): 651-659.
- BEZIRTOGLOU E., TSIOTSIAS A., WELLING G.W. 2011.** Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* 17(6): 478-482.
- BHUTE S., PANDE P., SHETTY S.A., SHELAR R., MANE S. ET AL. 2016.** Molecular Characterization and Meta-Analysis of Gut Microbial Communities Illustrate Enrichment of Prevotella and Megaspheera in Indian Subjects. *Front Microbiol* 7(660): 1-14.
- BIAGI E., FRANCESCHI C., RAMPPELLI S., SEVERGNINI M., OSPAN R. ET AL. 2016.** Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol* 26: 1480-1485.
- BIAGI E., NYLUND L., CANDELA M., OSPAN R., BUCCI L. ET AL. 2010.** Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *Plos ONE* 5(5) e10667: 1-14.
- BIAVATI B. 2012.** Family I. *Bifidobacteriaceae* Stackebrandt, Rainey and Ward-Rainey 1997, 487<sup>VP</sup>. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria* 5, 171.
- BISWAS S., ROLAIN J.-M. 2013.** Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Microbiol Meth* 92: 14-24.
- BOLADO-MARTÍNEZ E., ACEDO-FÉLIX E., PEREGRINO-URIARTE A.B., YEPIZ-PLASCENCIA G. 2011.** Fructose 6-phosphoketolase Activity in Wild-Type Strains of *Lactobacillus*, Isolated from the Intestinal Tract of Pigs. *Appl Biochem Microbiol* 48(5): 444-451.
- BONAPARTE C., KLEIN G., KNEIFEL W., REUTER G. 2001.** Development of a selective culture medium for the enumeration of bifidobacteria in fermented milks. *Lait* 81: 227-235.
- BÖRNER R.A. 2016.** Isolation and Cultivation of Anaerobes. *Anaerob Biotechnol* - in *ABE* 156: 35-53.
- BOUREAU H., DECRE D., CARLIER J.P., GUICHET C., BOURLIOUX P. 1993.** Identification of a *Clostridium cocleatum* strain involved in an anti-*Clostridium difficile* barrier effect and determination of its mucin-degrading enzymes. *Res Microbiol* 144: 405.
- BOYLE R.J., ROBINS-BROWNE R.M., TANG M.L.K. 2006.** Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am Clin Nutr* 83: 1256-1264.
- BREED R.S., DOTERRER W.D. 1916.** The Number of Colonies Allowable on Satisfactory Agar Plates. *Bacteriol* 1(3): 321-331.

- BUNESOVA V., MUSILOVA S., GEIGEROVA M., PECHAR R., RADA V. 2015.** Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *Microbiol Meth* 109: 106-109.
- BUNEŠOVÁ V., VLKOVÁ E., RADA V., HOVORKOVÁ P., MUSILOVÁ Š. ET AL. 2014.** Direct Identification of Bifidobacteria from Probiotic Supplements. *Czech Food Sci* 32 (2): 132-136.
- CANANI R.B., CIRILLO P., TERRIN G., CESARANO L., SPAGNUOLO M.I. 2007.** Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. *BMJ* 335: 340.
- CANDLISH A.A.G. 1991.** Immunological methods in food mikrobiology. *Food Microbiol* 8(1): 1-14.
- CANZI E., CASIRAGHI M.C., ZANCHI R., GANDOLFI R., FERRARI A. ET AL. 2002.** Yogurt in the diet of the elderly: a preliminary investigation into its effect on the gut ecosystem and lipid metabolism. *Lait* 82: 713-723.
- CARBONNELLE E., MESQUITA C., BILLE E., DAY N., DAUPHIN H. ET AL. 2011.** MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinic Biochem* 44: 104-109.
- CARVALHO A.S., SILVA J., HO P., TEIXEIRA P., MALCATA F.X. ET AL. 2004.** Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy* 14 (10): 835-847.
- COEURET V., GUEGUEN M., VERNOUX J.P. 2004.** Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int Food Microbiol* 97: 147-156.
- COLAK A.T., COLAK F., YESILEL O.Z., BUYUKGUNGOR O. 2009.** Synthesis, spectroscopic, thermal, voltammetric studies and biological activity of crystalline complexes of pyridine-2,6-dicarboxylic acid and 8-hydroxyquinoline. *Mol Struct* 936: 67-74.
- COLE C.B., FULLER R. 1989.** Enumeration of intestinal bifidobacteria by growth on a semi-selective medium and GLC assay of acetic acid production. *Microbial Ecol Health Dis* 2: 227-230.
- CONWAY P.L. 1997.** Development of intestinal microbiota. In: Mackie R.I, White B.A, Isaacson R.E (ed) *Gastrointestinal microbiology*, Chapman and Hall, New York.
- COPPA G.V., BRUNI S., MORELLI L., SOLDI S., GABRIELLI O. 2004.** The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *Clin Gastroenterol* 38: 80-83.
- CORFIELD T. 1992.** Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* 2: 509-521.
- CRITTENDEN R.G. 1999.** Prebiotics. In: GW Tannock (ed) *Probiotics – A Critical Review*. Horizon Scientific Press, Norfolk, England: 141-156.
- CROCIANI J., GRILL J.P., HUPPERT M., BALLONGUE J. 1995.** Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study. *Lett Appl Microbiol* 21: 146-148.
- CRYAN J.F., DINAN T.G. 2012.** Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 13: 701-712.
- ČSN EN ISO. 2001.** Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů. ÚNMZ, Praha, ČSN EN ISO 7899-2: 2001.

- DARBY C.M., NATHAN C.F. 2010.** Killing of non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* by 8-hydroxyquinoline. *Antimicrob Chemother* 65: 1424-1427.
- DAVIS C.D. 2014.** Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Microbiol Methods* 103: 9-17.
- DAVIS C.D., MILNER J.A. 2009.** Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *Nutr Biochem* 20: 743-752.
- DE GROOTE M.A., FRANK D.N., DOWELL E., GLODE M.P., PACE N.R. 2005.** *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr Infect Dis* 24: 278-280.
- DE VRIES, W., GERBRANDY S.J., STOUTHAMER A.H. 1967.** Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim Biophys Acta* 136: 415-425.
- DERRIEN M. 2007.** Mucin utilisation and host interactions of the novel intestinal microbe *Akkermansia muciniphila*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University: Ph.D. Thesis.
- DERRIEN M., VAN PASSEL M.W.J., VAN DE BOVENKAMP J.H.B., SCHIPPER R.G., DE VOS W.M. ET AL. 2010.** Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1(4): 254-268.
- DERRIEN M., VAUGHAN E.E., PLUGGE C.M, DE VOS W.M. 2004.** *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int Syst Evol Microbiol* 54: 1469-1476.
- DERWA Y., GRACIE D.J., HAMLIN P.J., FORD A.C. 2017.** Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 46(4): 389-400.
- DONG, X., CHENG, G., JIAN, W. 2000.** Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Syst Appl Microbiol* 23: 386-390.
- DONKOR N.O., HENRIKSSON A., VASILJEVIC T., SHAH N. 2006.** Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int Dairy* 16: 1181-1189.
- DONNET-HUGHES A., PEREZ P.F., DORÉ J., LECLERC M., LEVENEZ F. AT AL. 2010.** Potential role of the microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc* 69: 407-415.
- DONOVAN S.M., WANG M., LI M., FRIEDBERG I., SCHWARTZ S.L. ET AL. 2012.** Host-Microbe Interaction in the Neonatal Intestine: Role of Human Milk Oligosaccharides. American Society for Nutrition. *Advances in Nutrition* 3: 450-455.
- EFSA. 2004.** European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Colloquium on Microorganisms in Food and Feed: Qualified Presumption of Safety.
- EHRMANN M.A., MÜLLER M.R., VOGEL R.F. 2003.** Molecular analysis of sourdough revers *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *Int Syst Evol Microbiol* 53: 7-13.
- ENQUIST P.-A., GYLFE A., HÄGGLUND U., LINDSTRÖM P., NORBERG-SCHERMAND H. ET AL. 2012.** Derivatives of 8-hydroxyquinoline-antibacterial agents that target intra- and extracellular Gram-negative pathogens. *Bioorg Med Chem* 22(10): 3550-3553.

- FAO/WHO. 2001.** Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report: 1-34.
- FAO/WHO. 2002.** Report of Joint Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada, April 30.4.-1.5.2002.
- FELIS G.E., DELLAGLIO F. 2007.** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Iss Intest Microbiol* 8: 44-61.
- FERNÁNDEZ L., LANGA S., MARTÍN V., JIMÉNEZ E., MARTÍN R. ET AL. 2013.** The microbiota of human milk in healthy women. *Cell Mol Biol* 59: 31-42.
- FILTEAU M., MATAMOROS S., SAVARD P., ROY D. 2013.** Molecular monitoring of fecal microbiota in healthy adults following probiotic yogurt intake. *Pharm Nutr* 1: 123-129.
- FORD M., PERRY J.D., GOULD F.K. 1994.** Use of cephalixin-aztreonam-arabinose agar for selective isolation of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 32(12): 2999-3001.
- FREITAS A.C., HILL J.E. 2018.** Bifidobacteria isolated from vaginal and gut microbiomes are indistinguishable by comparative genomics. *PLoS One* 13(4): e0196290.
- FUJITA K., OURA F., NAGAMINE N., KATAYAMA T., HIRATAKE J. ET AL. 2005.** Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *Biol Chem* 280: 34415-34422.
- FULLER A.T., MELLOWS G., WOOLFORD M., BANKS G.T., BARROW K.D. ET AL. 1971.** Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature* 234: 416-417.
- FULLER R. 1989.** Probiotics in man and animals. *Appl Bacteriol* 66: 365-378.
- FURRIE, E., MACFARLANE S., KENNEDY A., CUMMINGS J.H., WALSH S.V. ET AL. 2005.** Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 54: 242-249.
- GAGGÍA, F., MATTARELLI, P., BIAVATI, B. 2010.** Probiotic and prebiotic in animal feeding for safe food production. *Int Food Microbiol* 141: 15-28.
- GARRIGA M., PASCUAL M., MONFORT J.M., HUGAS M. 1998.** Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *Appl Microbiol* 84(1): 125-132.
- GAVINI F., POURCHER A-M., NEUT C., MONGET D., ROMOND C. ET AL. 1991.** Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. *Int Syst Bacteriol* 4: 548-557.
- GAVINI F., VAN ESBROECK M., TOUZEL J.P., FOURMENT A., GOOSSENS H. 1996.** Detection of Fructose-6-phosphate Phosphoketolase (F6PPK), a Key Enzyme of the Bifid-Shunt, in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe* 2: 191-193.
- GENG J., CHIRON C., COMBRISSE J. 2014.** Rapid and specific enumeration of viable Bifidobacteria in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study. *Int Dairy* 37: 1-4.
- GIBSON G.R., ROBERFROID M.B. 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. *Nutr* 125: 1401-1412.
- GIRAFFA G. 2002.** *FEMS Microbiol Rev* 26: 163-171.



- GONZÁLEZ-CABALEIRO R., OFİTERU I.D., LEMA J.M., RODRÍGUEZ J. 2015.** Microbial catabolic activities are naturally selected by metabolic energy harvest rate. *ISME* 9: 2630-2641.
- GOODWIN S., MCPHERSON J.D., MCCOMBIE W.R. 2016.** Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17: 333-351.
- GOSO Y., ISHIHARA K., SUGAWARA S., HOTTA K. 2001.** Purification and characterization of alpha-L-fucosidases from *Streptomyces* sp. OH11242. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 130(3): 375-383.
- GUARNER F., MALAGELADA J.R. 2003.** Gut flora in health and disease. *Lancet* 360: 512-519.
- GULYAS E., BALOGH G., ERDEI J., SERESS P. 2008.** pH Controlled Fermentation Process for Pseudomonic Acid Production. United States Patent: US 7,439,045 B2.
- GUPTA R.S., NANDA A., KHADKA B. 2017.** Novel molecular, structural and evolutionary characteristics of the phosphoketolases from bifidobacteria and *Coriobacteriales*. *PLoS ONE* 12(2): 1-20.
- GYLLENBERG, H., CARLBERG G. 1958.** The nutritional characteristics of the bifid bacteria (*Lactobacillus bifidus*) in infants. *Acta Pathol Microbiol Scand* 44: 287-292.
- HAN R., EBERT C., ZHAO Z., LI L., ZHANG H. ET AL. 2005.** Novel characteristics of *Bifidobacterium bifidum* in solid state fermentation system. *World Microbiol Biotechnol* 21: 1245-1248.
- HANSSON G.C., JOHANSSON M.E.V. 2010.** The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 1(1): 51-54.
- HARTEMINK R., DOMENECH V.R., ROMBOUITS F.M. 1997.** LAMVAB – A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Microbiol Methods* 29(2): 77-84.
- HARTEMINK R., KOK B.J., WEENK G.H., ROMBOUITS F.M. 1996.** Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *Microbiol Methods* 27: 33-43.
- HARTEMINK R., ROMBOUITS F.M. 1999.** Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *Microbiol Meth* 36: 181-192.
- HASSINEN J.B., DURBIN G.T., TOMARELLI R.M., BERNHART F.W. 1951.** The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *Bacteriol* 62: 771-777.
- HAVENAAR R., SPANHAAK S. 1994.** Probiotics from an immunological point of view. *Curr Opin Biotechnol* 5: 320-325.
- HERSCHLEB J., ANANIEV G., SCHWARTZ D.C. 2007.** Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols* 3: 677-684.
- HICKSON M., D'SOUZA A., MUTHU N., ROGERS T.R., WANT S., ET AL. 2007.** Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 335: 80-83.
- HOLDEMAN L.V., MOORE W.E. 1972.** Roll-tube techniques for anaerobic bacteria. *Am Clin Nutr* 25(12): 1314-1317.

- HOLKO I., HRABĚ J., ŠALAKOVÁ A., RADA V. 2013.** The substitution of a traditional starter culture in mutton fermented sausages by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*. *Meat Sc* 94(3): 275-279.
- HOLLERAN G., LOPETUSO L.R., IANIRO G., PECERE S., PIZZOFRERATO M., ET AL. 2017.** Gut microbiota and inflammatory bowel disease: so far so gut! *Minerva Gastroenterol Dietol* 63(4): 373-384.
- HOLZAPFEL W.H., P. HABERER R., GEISEN J., BJÖRKROTH U., SCHILLINGER. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition 1-4. *Am Clin Nutr* 73: 365-373.
- HOLZER P., FARZI A. 2014.** Neuropeptides and the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Adv Exp Med Biol* 817: 195-219.
- HONG P., NINONUEVO M.R., LEE B., LEBRILLA C., BODE L. 2009.** Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *Br Nutr* 101: 482-486.
- HOPKINS M. J., MACFARLANE G.T. 2003.** Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro. *Appl Environ Microbiol* 69: 1920-1927.
- HOESKINS L.C., BOULDING E.T., LARSON G. 1997.** Purification and characterization of blood group A-degrading isoforms of alpha-N-acetylgalactosaminidase from *Ruminococcus torques* strain IX-70. *Biol Chem* 272: 7932-7939.
- HOUDKOVA M., RONDEVALDOVA J., DOSKOCIL I., KOKOSKA L. 2017.** Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia* 118: 56-62.
- HUNGATE R.E., 1969.** A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris, R., Ribbons, D.W. (Eds.), Chapter IV. *Methods Microbiol* 3B. Academic Press, London: 117-132.
- HUNGIN A.P.S., MULLIGAN C., POT B., WHORWELL P., AGRÉUS L. ET AL. 2013.** Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice - an evidence-based international guide. *Aliment Pharmacol Ther* 38: 864-886.
- CHAMPAGNE C.P., GARDNER N., ROY D. 2005.** Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(1): 61-84.
- CHAUCHEYRAS-DURAND F., DURAND H. 2010.** Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes* 1: 3-9.
- CHERIFI S., ROBBERECHT J., MIENDJE Y. 2004.** *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an elderly patient with *Clostridium difficile* colitis. *Acta Clinica Belgica* 59: 223-224.
- CHUNG P.-Y., GAMBARI R., CHEN Y.-X., CHENG C.-H., BIAN Z.-X. ET AL. 2015.** Development of 8-benzyloxy-substituted quinoline ethers and evaluation of their antimicrobial activities. *Med Chem Res* 24: 1568-1577.
- INDERJIT, BAJPAI D., RAJESWARI M.S. 2010.** Interaction of 8-Hydroxyquinoline with Soil Environment Mediates Its Ecological Function. *PLoS ONE* 5(9): 1-7.
- ISO/IDF. 2006.** Milk products - Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium - colony count technique at 37 °C. *ISO Standard 20128/IDF 192: 2006.*

- ISO/IDF. 2010.** Milk products - Enumeration of presumptive bifidobacteria - colony count technique at 37 °C. ISO Standard 29981/IDF 220: 2010.
- JEON J.-H., LEE C.-H., LEE H.-S. 2009.** Antimicrobial Activities of 2 Methyl-8-Hydroxyquinoline and Its Derivatives against Human Intestinal Bacteria. *Korean Soc Appl Biol Chem* 52(2): 202-205.
- JEON Y.-S., CHUNG H., PARK S., HUR I., LEE J.-H. ET AL. 2005.** jPHYDIT: a JAVA-based integrated environment for molecular phylogeny of ribosomal RNA sequences. *Bioinformatics* 21: 3171-3173.
- JOHNSON O.W., RABINOVICH P.R., UTTER. F.M. 1984.** Comparison of the reliability of a Coulter Counter with a flow cytometer in determining ploidy levels in Pacific salmon. *Aquaculture* 43(1-3): 99-103.
- JURINKE CH., OETH P., VAN DEN BOOM D. 2004.** MALDI-TOF Mass Spectrometry. A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis. *Molecular Biotechnology* 26: 147-163.
- KATAYAMA T., FUJITA K., YAMAMOTO K. 2005.** Novel bifidobacterial glycosidases acting on sugar chains of mucin glycoproteins. *Biosci Bioeng* 99: 457-465.
- KAUR I.P., CHOPRA K., SAINI A. 2002.** Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Europ Pharmaceut Sci* 15: 1-9.
- KIESSLING, G., SCHNEIDER J., JAHREIS G.. 2002.** Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur Clin Nutr* 56: 843-849.
- KILLER J., HAVLÍK J., BUNEŠOVÁ V., VLKOVÁ E., BENADA O. 2014.** *Pseudoscardovia radai* sp. nov., a representative of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of a wild pig (*Sus scrofa scrofa*). *Int Syst Evol Microbiol* 64(9): 2932-2938.
- KILLER J., KOPEČNÝ J., MRÁZEK J., HAVLÍK J., KOPPOVÁ I. ET AL. 2010.** *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of bumblebees. *Syst Appl Microbiol* 33(7): 359-366.
- KILLER J., MAROUNEK M. 2011.** Fermentation of mucin by bifidobacteria from rectal samples of humans and rectal and intestinal samples of animals. *Folia Microbiol* 56: 85-89.
- KIYOHARA M., NAKATOMI T., KURIHARA S., FUSHINOBU S., SUZUKI H., ET AL. 2012.**  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase from Infant-associated *Bifidobacteria* Belonging to Novel Glycoside Hydrolase Family 129 Is Implicated in Alternative Mucin Degradation Pathway. *Biol Chem* 287(1): 693-700.
- KLAENHAMMER T.R., KULLEN M.J. 1999.** Selection and design of probiotics. *Int Food Microbiol* 50: 45-57.
- KMEŤ V., DRUGDOVÁ Z. 2012.** Antimicrobial susceptibility of microflora from ovine cheese. *Folia Microbiol* 57: 291-293.
- KOHOUT P. 2010.** Možnosti ovlivnění imunitního systému nutraceutiky. *Klin Farmakol Farm* 24(1): 47-50.
- KUKKONEN K., SAVILAHTI E., HAAHTELA T., JUNTUNEN-BACKMAN K., KORPELA R. ET AL. 2008.** Long-term safety and impact on infection rates of postnatal

probiotic and prebiotic (synbiotic) treatment: randomized, doubl-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics* 122(3): 8-12.

**KUNZ C., RUDLOFF S., BAIER W., KLEIN N., STROBEL S. 2000.** Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Ann Rev Nutr* 20: 699-722.

**LACMANOVÁ I., DRÁB V., VOLNÁ L. 2010.** Aplikace probiotických kultur laktobacilů v mléčných výrobcích typu kefiru. *Mlékařské listy* 123: XVIII-XXI.

**LAND M.H., ROUSTER-STEVENSONS K., WOODS C.R., CANNON M.L., CNOTA J. ET AL. 2005.** *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 115: 178-81.

**LANGENDIJK P.S., SCHUT F., JANSEN G.J., RAANGS G.C., KANPHUIS G.F. ET AL. 1995.** Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fial samples. *Appl Environ Microbiol* 61: 3069-3075.

**LAPARRA J.M. A SANZ Y. 2009.** Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol* 49: 695-701.

**LAPIERRE L., UNDELAND P., COX L.J. 1992.** Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Dairy Sci* 75: 1192-1196.

**LAROIA S., MARTIN J.H. 1991.** Methods for enumerating and propagating bifidobacteria. *Cultured Dairy Prod* 26: 32-33.

**LARSON G., FALK P., HOSKINS L.C. 1988.** Degradation of human intestinal glycosphingolipids by extracellular glycosidases from mucin-degrading bacteria of the human fecal flora. *Biol Chem* 263: 10790-10798.

**LE T.K.C., HOSAKA T., NGUYEN T.T., KASSU A., DANG T.O. ET AL. 2015.** *Bifidobacterium* species lower serum glucose, increase expressions of insulin signaling proteins, and improve adipokine profile in diabetic mice. *Biomed Res* 36(1): 63-70.

**LEE J.-H., O'SULLIVAN D.J. 2010.** Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiol Molecul Biol Rev* 74 (3): 378-416.

**LEY R.E., HAMADY M., LOZUPONE C., TURNBAUGH P.J., RAMEY R.R. ET AL. 2008.** Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science* 320: 1647-1651.

**LI S., CHEN T., XU F., DONG S., XU H. ET AL. 2014.** The beneficial effect of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 on microbial diversity in mouse intestine. *Sci Food Agric* 94: 256-264.

**LILLY D.M., STILLWELL R.H. 1965.** Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.

**LIM K.S., HUH C.S., BAEK Y.J., KIM H.U. 1995.** A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy-products. *Dairy Sci* 78: 2108-2112.

**LIN A., BIK E.M., COSTELLO E.K., DETHLEFSEN L., HAQUE R. ET AL. 2013.** Distinct Distal Gut Microbiome Diversity and Composition in Healthy Children from Bangladesh and the United States. *PLoS ONE* 8: e53838.

**LIU D., YU J., LI L., AI Q., FENG J. ET AL. 2015.** Bacterial community structure associated with elective cesarean section versus vaginal delivery in Chinese newborns. *Pediatr Gastroenterol Nutr* 60: 240-246.

**LIU L., LI Y., LI S., HU N., HE Y. ET AL. 2012.** Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Biomed Biotechnol* 2012: 1-11.

- LODINOVÁ-ŽÁDNÍKOVÁ R., CUKROWSKÁ B., TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ H. 2003.** Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int Arch Allergy Immunol* 131(3): 209-211.
- LPSN - LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. (2017).** Spons. Bergey's Manual Trust and John Wiley & Sons, Inc.; <http://www.bacterio.net/index.html>.
- LUGLI G.A., MILANI C., TURRONI F., DURANTI S., MANCABELLI L. ET AL. 2017.** Comparative genomic and phylogenomic analyses of the *Bifidobacteriaceae* family. *BMC Genomics* 18(1): 568.
- MACFARLANE G., GIBSON G. 1991.** Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett* 61: 289-293.
- MACFARLANE G., GIBSON G., CUMMINGS J.H. 1992.** Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Appl Bacteriol* 72: 57-64.
- MACFARLANE S., HOPKINS M., MACFARLANE G.T. 2001.** Toxin synthesis and mucin breakdown are related to swarming phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infect Immun* 69: 1120-1126.
- MACK D.R. 2004.** D(-)-lactic acid-producing probiotics, D(-)-lactic acidosis and infants. *Can Gastroenterol* 18(11): 671-675.
- MACKAY A.D., TAYLOR M.B., KIBBLER C.C., HAMILTON-MILLER J.M. 1999.** *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 5(5): 290-292.
- MACPHERSON A.J., UHR T. 2004.** Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303: 1662-1665.
- MANNING T.S., GIBSON G.R. 2004.** Prebiotics. *Best Pract and Research Clinic Gastroenterol* 18: 287-298.
- MARGULIES M., EGHOLM M., ALTMAN W.E., ATTIYA S., BADER J.S. ET AL. 2005.** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
- MARIAT D., FIRMESE O., LEVENEZ F., GUIMARAES V.D., SOKOL H. ET AL. 2009.** The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9: 123.
- MARTÍN R., JIMÉNEZ E., HEILIG H., FERNÁNDEZ L., MARÍN M.L., ET AL. 2009.** Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 75: 965-969.
- MARTÍN R., LANGA S., RIVIRIEGO C., JIMÉNEZ E., MARÍN M.L. ET AL. 2003.** Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Pediatr* 143: 754-758.
- MATHIPA M.G., THANTSHA M.S. 2015.** Cocktails of probiotics pre-adapted to multiple stress factors are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts and exhibit enhanced antagonistic capabilities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Gut Pathogens* 7(5): 1-14.
- MATHUR S., SINGH R. 2005.** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int Food Microbiol* 105(3): 281-295.

- MATSUKI T., WATANABE K., TANAKA R. 2003.** Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Curr Iss Intest Microbiol* 4: 61-69.
- McCARTY S.C., ATLAS R.M. 1993.** Effect of Amplicon Size on PCR Detection of Bacteria Exposed to Chlorine. *Cold Spring Harbor Lab Press* 3: 181-185.
- MEILE L., LUDWIG W., RUEGER U., GUT C., KAUFMANN P. ET AL. 1997.** *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a Moderately Oxygen Tolerant Species Isolated from Fermented Milk. *Syst Appl Microbiol* 20: 57-64.
- MELICHERČÍKOVÁ V. 2015.** Sterilizace a dezinfekce. *Galén*, 2. vyd., Praha: 47-53.
- MIKAMI K., KIMURA M., TAKAHASHI H. 2012.** Influence of maternal bifidobacteria on the development of gut bifidobacteria in infants. *Pharmaceuticals* 5: 629-642.
- MILANI C., MANGIFESTA M., MANCABELLI L., LUGLI G.A., JAMES K. ET AL. 2017.** Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. *Int Syst Evol Microbiol* 11(12): 2834-2847.
- MIRANDA R.O., DE CARVALHO A.F., NERO L.A. 2014.** Development of a selective culture medium for bifidobacteria, Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin (RP-MUP) and assessment of its usage with Petrifilm™ Aerobic Count plates. *Food Microbiol* 39: 96-102.
- MIRANDA R.O., NETO G.G., DE FREITAS R., DE CARVALHO A.F., NERO L.A. 2011.** Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm (TM) AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol* 28: 1509-1513.
- MITSUOKA T. 1982.** Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria and Microflora* 1(3): 24.
- MITSUOKA T. 1996.** Intestinal flora and human health. *Asia Pacific Clinic Nutr* 5: 2-9.
- MITTAL R., DEBS L.H., PATEL A.P., NGUYEN D., PATEL K. ET AL. 2017.** Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. *Cell Physiol* 232(9): 2359-2372.
- MOORE W.E., MOORE L.H. 1995.** Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 61: 3202-3207.
- MUEGGE B.D., KUCZYNSKI J., KNIGHTS D., CLEMENTE J.C., GONZÁLEZ A. ET AL. 2011.** Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 332: 970-974.
- MUELLER S., SAUNIER K., HANISCH C., NORIN E., ALM L. ET AL. 2006.** Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 72: 1027-1033.
- MUNOZ P., BOUZA E., CUENCA-ESTRELLA M., EIROS J.M., PÉREZ M.J. ET AL. 2005.** *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* 40(11): 1625-1634.
- NAM Y.-D., JUNG M.-J., ROH S.W., KIM M.-S., BAE J.-W. 2011.** Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* 6: e22109.
- NISHIMOTO M., KITAOKA M. 2007.** Identification of *N*-Acetylhexosamine 1-Kinase in the Complete Lacto-*N*-BioseI/Galacto-*N*-Biose Metabolic Pathway in *Bifidobacterium longum*. *Appl Environ Microbiol* 73: 6444-6449.

- NOUAILLE S., RIBEIRO L.A., MIYOSHI A., PONTES D., LE LOIR Y. ET AL. 2003.** Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2: 102-111.
- NOVAKOVA J., DŽUNKOVÁ M., MUSILOVA S., VLKOVA E., KOKOSKA L. ET AL. 2014.** Selective growth-inhibitory effect of 8-hydroxyquinoline towards *Clostridium difficile* and *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* in co-culture analysed by flow cytometry. *Med Microbiol* 63: 1663-1669.
- OHISHI A., TAKAHASHI S., ITO Y., OHISHI Y., TSUKAMOTO K. ET AL. 2010.** *Bifidobacterium* septicemia associated with postoperative probiotic therapy in a neonate with omphalocele. *Pediatr* 156: 679-681.
- OKAMOTO M., BENNO Y., LEUNG K.P., MAEDA N. 2008.** *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque. *Int Syst Evol Microbiol* 58: 144-148.
- OLIVER J.D. 2010.** Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34: 415-425.
- OUWEHAND A., SALMINEN S., ISOLAURI E. 2002.** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279-289.
- OUWERKERK J.P., AALVINK S., BELZER C., DE VOS W.M. 2016.** *Akkermansia glycaniphila* sp. nov., an anaerobic mucin-degrading bacterium isolated from reticulated python faeces. *Int Syst Evol Microbiol* 66: 4614-4620.
- PACHER B., KNEIFEL W. 1996.** Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Int Dairy* 6: 43-64.
- PATEL C., VAJPAYEE P., SINGH G., UPADHYAY R., SHANKER R. 2011.** Contamination of potable water by enterotoxigenic *Escherichia coli*: qPCR based culture-free detection and quantification. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 2292-2298.
- PAYNE J.F., MORRIS A.E.J., BEERS P. 1999.** Note: evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk. *Appl Microbiol* 86: 353-358.
- PEREZ P.E., DORÉ J., LECLERC M., LEVENEZ F., BENYACOUB J. ET AL. 2007.** Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119(3): 724-732.
- PERIS-BONDIA F., LATORRE A., ARTACHO A., MOYA A., D'AURIA G. 2011.** The active human gut microbiota differs from the total microbiota. *PLoS ONE* 6: e22448.
- PETUELY F. 1956.** Ein einfacher vollsynthetischer Selectiv Nährboden für den *Lactobacillus bifidus*. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig* 166: 86-90.
- POKUSAeva K., FITZGERALD G.F., VAN SINDEREN D. 2011.** Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Natur* 6(3): 285-306.
- PRESTERL E., KNEIFEL W., MAYER H.K., ZEHETGRUBER M., MAKRISTATHIS A. ET AL. 2001.** Endocarditis by *Lactobacillus rhamnosus* due to yogurt ingestion? *Scand Infect Dis* 33(9): 710-714.
- PRINCE A.L., ANTONY K.M., CHU D.M., AAGAARD K.M. 2014.** The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers. *Reproduct Immun* 104/105: 12-19.

**RADA V., KOC J. 2000.** The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft* 55: 65-67.

**RADA V., MAROUNEK M. 2005.** Probiotika a prebiotika ve výživě zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, Vědecký výbor výživy zvířat, studie: 4-42.

**RADA V., NEVORAL J., FLAJŠMANOVÁ K., ROČKOVÁ Š., KRČMÁŘOVÁ I. ET AL. 2011.** Occurrence of bifidobacteria in human milk. *Milchwissenschaft – Milk Science International* 66 (2): 123-126.

**RADA V., PETR J. 2000.** A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Microbiol Method* 43: 127-132.

**RADA V., PETR J. 2002.** Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Vet-Med Czech* 47: 1-4.

**RADA V., VLKOVÁ E., NEVORAL J., TROJANOVÁ I. 2006.** Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. *FEMS Microbiol Lett* 258: 25-28.

**RAEISI S.N., OUOBA L.I.I., FARAHMAND N., SUTHERLAND J., GHODDUSI H.B. 2013.** Variation, viability and validity of bifidobacteria in fermented milk products. *Food Control* 34: 691-697.

**RAFTER J., BENNET M., CADERNI G., CLINE Y., HUGHES R. ET. AL. 2007.** Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am Clin Nutr* 85: 488-496.

**RAJILIĆ-STOJANOVIĆ M., DE VOS W.M. 2014.** The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 38: 996-1047.

**RAJILIĆ-STOJANOVIĆ M., HEILIG H.G.H.J., MOLENAAR D., KAJANDER K., SURAKKA A. ET AL. 2009.** Development an application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* 11(7): 1736-1751.

**RASIC J. L., KURMANN J.A. 1983.** Bifidobacteria and their role: microbiological, nutritional-physiological, medical, and technological aspects and bibliography. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

**RASIC J.L., SAD N. 1990.** Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *IDF Bull* 252: 24-34.

**RAUTIO M., JOUSIMIES-SOMER H., KAUMA H., PIETARINEN I., SAXELIN M. ET AL. 1999.** Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 28(5): 1159-1160.

**REDONDO-LOPEZ V., COOK R.L., SOBEL J.D. 1990.** Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* 12: 856-872.

**RHO J.H., WRIGHT D.P., CHRISTIE D.L., CLINCH K., FURNEAUX R.H. ET AL. 2005.** A novel mechanism for desulfation of mucin: identification and cloning of a mucin-desulfating glycosidase (sulfoglycosidase) from *Prevotella* strain RS2. *Bacteriol* 187: 1543-1551.

**ROBERFROID M. 2007.** Prebiotics: The Concept Revisited. *Nutr* 137: 830-837.

**ROBERFROID M.B., VAN LOO J.A., GIBSON G.R. 1998.** The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Nutr* 128: 11-19.



- ROGOSA M., MITCHELL J.A., WISEMAN R.F. 1951.** A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *Bacteriol* 62(1): 132-133.
- ROMERO R., HASSAN S.S., GAJER P., TARCA A.L., FADROSH D.W. ET AL. 2014.** The composition and stability of vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome* 2(4): 1-19.
- ROUND J.L., MAZMANIAN S.K. 2009.** The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 313-323.
- ROWLAND I.R., TANAKA R. 1993.** The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *Appl Bacteriol* 74: 667-674.
- ROY D. 2001.** Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int Food Microbiol* 69: 167-182.
- ROY D., MAINVILLE I., MONDOU F. 1997.** Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *Int Dairy* 7: 785-793.
- RUSELER-VAN EMBDEN J.G.H., VAN DER HELM R., VAN LIESHOUT L.M.C. 1989.** Degradation of intestinal glycoproteins by *Bacteroides vulgatus*. *FEMS Microbiol Lett* 58: 37-42.
- RUSSELL D.A., ROSS R.P., FITZGERALD G.F., STANTON C. 2011.** Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int Food Microbiol* 149: 88-105.
- SAAD N., DELATTRE C., URDACI M., SCHMITTER J.M., BRESSOLLIER P. 2013.** An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Sci Technol LEB* 50: 1-16.
- SAARELA M., MOGENSEN G., FONDÉN R., MÄTTÖ J., MATTILA-SANDHOLM T. 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Biotechnol* 84: 197-215.
- SAAVEDRA J.M., BAUMAN N.A., OUNG I., PERMAN J.A., YOLKEN R.H. 1994.** Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in-hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344: 1046-1049.
- SALMINEN S., BOULEY C., BOUTON-RUAULT M.C., ET AL. 1998.** Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br Nutr* 80: 147-71.
- SAMONA A., ROBINSON R.K. 1991.** Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Soc Dairy Technol* 44: 64-66.
- SANSONETTI P.J., DI SANTO J.P. 2007.** Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity* 26: 149-161.
- SARKAR S. 2013.** Potential of probiotics as pharmaceutical agent: a review. *Br Food* 115: 1658-1687.
- SATOKARI R.M., VAUGHAN E.E., AKKERMANS A.D.L., SAARELA M., DE VOS V.M. 2001.** Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67: 504-513.
- SAVARD P., LAMARCHE B., PARADIS M.-E., THIBOUTOT H., LAURIN É. ET AL. 2011.** Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int Food Microbiol* 149: 50-57.

- SCARDOVI V. 1986.** Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472<sup>al</sup>. In: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., eds, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, MD, Baltimore, USA: 1418-1434.
- SCARDOVI V., TROVATELLI L.D. 1965.** The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol Enzimol* 15: 19-29.
- SCARDOVI V., TROVATELLI L.D. 1969.** New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg* 123: 64-88.
- SERAFINI F., BOTTACINI F., VIAPPIANI A., BARUFFINI E., TURRONI F. ET AL. 2011.** Insight into Physiological and Genetic Mupirocin Susceptibility in Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 77(9): 3141-3146.
- SERAFINI F., TURRONI F., RUAS-MADIEDO P., LUGLI G.A., MILANI C. ET AL. 2014.** Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. *Int Food Microbiol* 178: 50-59.
- SGORBATI B., BIAVATI B., PALENZONA D. 1995.** The genus *Bifidobacterium*. In: *The Lactic Acid Bacteria* (Vol. 2), Wood B.J.B., Holzappel W.H. (ed), Chapman & Hall: 279-306.
- SHAH N.P. 2000.** Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Dairy Sci* 83(4): 894-907.
- SHAH S., DALECKI A.G., MALALASEKERA A.P., CRAWFORD C.L., MICHALEK S.M. ET AL. 2016.** 8-Hydroxyquinolines Are Boosting Agents of Copper-Related Toxicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 60(10): 5765-5776.
- SHELL M.A., KARMIRANTZOU M., SNEL B., VILANOVA D., BERGER B. ET AL. 2002.** The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14422-14427.
- SHIGWEDHA N., JIA L. 2013.** *Bifidobacterium* in Human GI Tract: Screening, Isolation, Survival and Growth Kinetics in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Lactic Acid Bacteria – R a D for Food, Health and Livestock Purposes*, InTech 2013, Chapter 12: 281-308.
- SCHNORR S.L., CANDELA M., RAMPELLI S., CENTANNI M., CONSOLANDI C. ET AL. 2014.** Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *NATURE COMMUNICATIONS* 5/3654: 1-12.
- SCHUTZ E. 1989.** The treatment of intestinal diseases with Mutaflor. A multicenter retrospective study. *Fortschr Med* 107: 599-602.
- SILVI S., VERDENELLI M.C., ORPIANESI C., CRESCI A. 2003.** EU project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing. Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. *Food Engineering* 56: 195-200.
- SILVIAN L.F., WANG J., STEITZ T.A. 1999.** Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA<sup>ile</sup> and mupirocin. *Science* 285: 1074-1077.
- SIMON G.L., GORBACH S.L. 1984.** Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterol* 86: 174-193.
- SIMPSON P. J., STANTON C., FITZGERALD G.F., ROSS R.P. 2003.** Genomic Diversity and Relatedness of Bifidobacteria Isolated from a Porcine Cecum. *Bacteriol* 185(8): 2571-2581.

- SIMPSON P.J., FITZGERALD G.F., STANTON C., ROSS R.P. 2004.** The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Microbiol Meth* 57: 9-16.
- SKRIVANOVA E., IMMERSEEL F.V., HOVORKOVA P., KOKOSKA L. 2016.** *In Vitro* Selective Growth-Inhibitory Effect of 8-Hydroxyquinoline on *Clostridium perfringens* versus Bifidobacteria in a Medium Containing Chicken Ileal Digesta. *PLoS ONE* 11(12): 1-11.
- SLOMIANY B.L., MURTY V.L., PIOTROWSKI J., LIAU Y.H., SUNDARAM P. ET AL. 1992.** Glycosulfatase activity of *Helicobacter pylori* toward gastric mucin. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 506-513.
- SOKOL H., PIGNEUR B., WATTERLOT L., LAKHDARI O., BERMUDEZ-HUMARAN L.G. ET AL. 2008.** *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn's disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16731-16736.
- SOKOL H., SEKSIK P., FURET J.P., FIRMESE O., NION-LARMURIER I. ET AL. 2009.** Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm bowel Dis* 15: 1183-1189.
- SONNENBORN U., STOBERNACK H.P., PROPPERT Y. 1990.** The development of an aerobic intestinal microflora in newborn infants. *Fortschritte der Medizin* 108: 420-424.
- SOZZI T., BRIGIDI P., MIGNOT O., MATTEUZZI D. 1990.** Use of dicloxacillin for the isolation and counting of bifidobacteria from dairy-products. *Lait* 70: 357-361.
- SPERTI G.S. 1971.** Probiotics. Avi Publishing Co., West Point, CT.
- STIEGLMEIER M., WIRTH R., KMINEK G., MOISSEL-EICHINGER C. 2009.** Cultivation of Anaerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria from Spacecraft-Associated Clean Rooms. *Appl Environ Microbiol* 75(11): 3484-3491.
- SUTHERLAND R., BOON R.J., GRIFFIN K.E., MASTERS P.J., SLOCOMBE B. ET AL. 1985.** Antibacterial Activity of Mupirocin (Pseudomonic Acid), a New Antibiotic for Topical Use. *Antimicrob Agents Chemother* 27(4): 495-498.
- TAKADA T., MATSUMOTO K., NOMOTO K. 2004.** Development of multi-color FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *Microbiol Methods* 58: 413-421.
- TAMIME A.Y., MARSHALL V.M.E., ROBINSON R.K. 1995.** Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Dairy Res* 62: 151-187.
- TANAKA R., MUTAI M. 1980.** Improved medium for selective isolation and enumeration of *Bifidobacterium*. *Appl Environ Microbiol* 40: 866-869.
- TANAKA Y., BENNO Y. 2015.** Application of a single-colony coculture technique to the isolation of hitherto unculturable gut bacteria. *Microbiol Immunol* 59: 63-70.
- TANNOCK G.W. 2003.** Probiotics: time for a dose of realism. *Curr Issue Intest Microbiol* 4: 33-42.
- TANNOCK G.W., FULLER R., SMITH S.L., HALL M.A. 1990.** Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *Clin Microbiol* 28: 1225-1228.

- TAP J., MONDOT S., LEVENEZ F., PELLETIER E., CARON C. ET AL. 2009.** Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* 11(10): 2574-2584.
- TAVERNITI V., GUGLIELMETTI S. 2011.** The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* 6: 261-274.
- TEMMERMAN R., SCHEIRLINCK I., HUYS G., SWINGS J. 2003.** Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69: 220-226.
- TERAGUCHI S., UEHARA M., OGASA K., MITSUOKA T. 1978.** Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Nippon Saikingaku Zasshi* 33: 753-761.
- THIERRY A., MADEC M.N. 1995.** Enumeration of propionibacteria in raw milk using a new selective medium. *Lait* 75(4/5): 315-323.
- THITARAM S.N., SIRAGUSA G.R., HINTON A.JR. 2005.** *Bifidobacterium*-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. *Lett Appl Microbiol* 41: 355-360.
- TICINESI A., LAURETANI F., MILANI C., NOUVENNE A., TANA C. ET AL. 2017.** Aging Gut Microbiota at the Cross-Road between Nutrition, Physical Frailty, and Sarcopenia: Is There a Gut–Muscle Axis? *Nutrients* 9: 1-20.
- TORRES-FUENTES C., SCHELLEKENS H., DINAN T.G., CRYAN J.F. 2017.** The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet, Gastroenterol Hepatol* 2(10): 747-756.
- TRACY B.P., GAIDA S.M., PAPOUTSAKIS E.T. 2010.** Flowcytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Curr Opin Biotechnol* 21: 85-99.
- TRIPATHI M., GIRI S. 2014.** Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Funct Foods* 9: 225-241.
- TROJANOVÁ I., VLKOVÁ E., RADA V., MAROUNEK M. 2006.** Different utilization of glucose and raffinose in *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium animalis*. *Folia Microbiologica* 51(4): 320-324.
- TSAI H., SUNDERLAND D., GIBSON G., HART C., RHODES J. 1992.** A novel mucin sulphatase from human faeces: its identification, purification and characterization. *Clin Sci* 82: 447-454.
- TUBELIUS P., STAN V., ZACHRISSON A. 2005.** Increasing work-place healthiness with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: a randomised, double-blind placebo controlled study. *Environ Health* 4: 25.
- TURRONI F., MILANI C., VAN SINDEREN D., VENTURA M. 2011.** Genetic strategies for mucin metabolism in *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. An example of possible human-microbe co-evolution. *Gut Microbes* 2(3): 183-189.
- TURRONI F., STRATI F., FORONI E., SERAFINI F., DURANTI S. ET AL. 2012.** Analysis of predicted carbohydrate transport systems encoded by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Appl Environ Microbiol* 78(14): 5002-5012.
- TURRONI S., RAMPELLI S., CENTANNI M., SCHNORR S.L., CONSOLANDI C. ET AL. 2016.** Enterocyte-Associated Microbiome of the Hadza Hunter-Gatherers. *Front Microbiol* 7/865: 1-12.

- UHLIG H.H., POWRIE F. 2003.** Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *Clin Invest* 112: 648-651.
- URBANIAK C., CUMMINS J., BRACKSTONE M., MACKLAIM J.M., GLOOR G.B. ET AL. 2014.** Microbiota of human breast tissue. *Appl Envi Microbiol* 80: 3007-3014.
- VAHABNEZHAD E., MOCHON A.B., WOZNIAK L.J., ZIRING D.A. 2013.** *Lactobacillus* bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol* 47: 437-439.
- VANHOUTTE T., HUYS G., DE BRANDT E., SWINGS J. 2004.** Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 437-446.
- VANKERCKHOVEN V., HUYS G., VANCANNEYT M., VAEL C., KLARE I. ET AL. 2008.** Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends Food Sci Technol* 19: 102-114.
- VARTOUKIAN S.R., PALMER R.M., WADE W.G. 2010.** Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 309: 1-7.
- VAUGHAN E.E., SCHUT F., HEILIG H.G., ZOETENDAL E.G., DE VOS W.M., AKKERMANS A.D. 2000.** A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol* 1: 1-12.
- VEERKAMP J.H. 1971.** The structure of the cell wall peptidoglycan of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Arch Biochem Biophys* 143: 204-211.
- VENTURA M., CANCHAYA C., DEL CASALE A., DELLAGLIO F., NEVIANI E. ET AL. 2006.** Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int Syst Evol Microbiol* 56: 2783-2792.
- VENTURA M., CANCHAYA C., FITZGERALD G.F., GUPTA R.S., VAN SINDEREN D. 2007.** Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 91: 351-372.
- VENTURA M., VAN SINDEREN D., FITZGERALD G.F., ZINK R. 2004.** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86: 205-223.
- VERNA E.C., LUCAK S. 2010.** Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Ther Adv Gastroenterol* 3: 307-319.
- VINDEROLA C.G., REINHEIMER J.A. 1999.** Culture media enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *Int Dairy* 9(8): 497-505.
- VLKOVÁ E., NEVORAL J., JENCIKOVA B., KOPEČNÝ J., GODEFROOIJ ET AL. 2005.** Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. *Microbiol Meth* 60: 365-373.
- VLKOVÁ E., RADA V., BUJNÁKOVÁ D, KMET V. 2004.** Enumeration, isolation, and identification of bifidobacteria from infant feces. *Folia Microbiol* 49(2): 209-212.
- VLKOVÁ E., SALMONOVÁ H., BUNEŠOVÁ V., GEIGEROVÁ M., RADA V. ET AL. 2015.** A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* 34: 27-33.

- VLKOVÁ E., TROJANOVÁ I., RADA V. 2006.** Distribution of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol* 51: 325-328.
- WANG C., SHOJI H., SATO H., NAGATA S., OHTSUKA Y. ET AL. 2007.** Effects of oral administration of *Bifidobacterium breve* on fecal lactic acid and short-chain fatty acids in low birth weight infants. *Pediatr Gastroenterol Nutr* 44: 252-257.
- WANG X., BUHIMSCHI C.S., TEMOIN S., BHANDARI V., HAN Y.W. ET AL. 2013.** Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. *PLoS ONE* 8: e56131.
- WARD A., CAMPOLI-RICHARDS D.M. 1986.** Mupirocin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 32(5): 425-44.
- WARD P., ROY D. 2005.** Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *INRA, EDP Science* 85: 23-32.
- WASSENAAR T.M., PANIGRAHI P. 2014.** Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol* 59: 572-579.
- WILKINS T.D., CHALGREN S. 1976.** Medium for Use in Antibiotic Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 10: 926-928.
- WILLIAMS, M.D., HA, C.Y., CIORBA, M.A. 2010.** Probiotics as therapy in gastroenterology: a study of physician opinions and recommendations. *Clin Gastroenterol* 44: 631-636.
- WOODSMANSEY E.J., MCMURDO M.E.T., MACFARLANE C.T., MACFARLANE S. 2004.** Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* 70: 6113-6122.
- WRIGHT D., ROSENDALE D., ROBERTSON A. 2000.** *Prevotella* enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS Microbiol Lett* 190: 73-79.
- XU J., BJURSELL M.K., HIMROD J., DENG S., CARMICHAEL L.K. ET AL. 2003.** A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 299: 2074-2076.
- YAMASAKI, C., TOTSU, S., UCHIYAMA, A., NAKANISHI, H., MASUMOTO, K. ET AL. 2012.** Effect of *Bifidobacterium* administration on very-low-birthweight infants. *Pediatr Int* 54: 651-656.
- YANG J.-Y., PARK J.-H., LEE H.-S. 2013.** Isolation of 8-hydroxyquinoline from *Sebastiania corniculata* and Antimicrobial Activity against Food-borne Bacteria. *Korean Soc Appl Biol Chem* 56: 763-766.
- ZARATE G., DE MORATA A.V., PEREZ C.A., GONZALES S. 2002.** Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells. *Can Microbiol* 48: 449-457.
- ZHU L., LI W., DONG X. 2003.** Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *Int Syst Evol Microbiol* 53: 1619-1623.

## 9 SEZNAM ZKRATEK

- 8HQ - *8-hydroxychinolin*
- AMC - *Arroyo-Martin-Cotton (medium)*
- API 50 CH - *konkrétní typ soupravy biochemických testů*
- ARDRA - *amplified rDNA restriction analysis*
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- BIF (medium) - *bifidobacterium (medium)*
- BL - *blood-liver (medium)*
- BL-OG - *blood-liver ox gall (medium)*
- BMK - *bakterie mléčného kvašení*
- CCM - *Czech Collection of Microorganisms*
- CFU - *colony forming units*
- CLB - *Columbia (medium)*
- CNS - *centrální nervový systém*
- CPA - *celkové počty anaerobů*
- DGGE - *denaturing gradient gel electrophoresis*
- DP - *dicloxacilin-propionic acid (medium)*
- DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*
- EFSA - *European Food Safety Authority*
- EMP - *Emden-Meyerhof-Parnas (pathway)*
- EPS - *exopolysacharidy*
- F6PPK - *fruktosa-6-fosfát fosfoketolasa*
- FAO - *Food and Agriculture Organization*
- FC - *flow cytometry*
- FISH - *fluorescence in situ hybridization*
- GBA - *gut-brain axis*
- GIT - *gastrointestinální trakt*
- GLIM - *glycerol - lithium laktát - síran manganatý (medium)*
- GOS - *galaktooligosacharidy*
- HITChip - *human intestinal tract chip*



IBD - *inflammatory bowel disease*  
IDF - *International Dairy Federation*  
ISO - *International Organization for Standardization*  
KTJ - *kolonie tvořící jednotky*  
LAMVAB - *vancomycin selective medium*  
LCL - *liver cystine lactose (medium)*  
LOD - *limit of detection*  
LPSN - *List of Prokaryotic names*  
MALDI-TOF MS - *matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry*  
MFV - *mlékárenské fermentované výrobky*  
MGLP - *modified Garche's lithium chloride-penicilin (medium)*  
MIC - *minimum inhibitory concentration*  
MM - *mucin-mupirocin (medium)*  
MO - *mikroorganismus*  
MRS - *De Man-Rogosa-Sharpe (medium)*  
MTPY - *modified tryptone-phytone yeast extrakt (medium)*  
MUC - *mucin*  
MW - *modifikované Wilkins-Chalgren (medium)*  
MWM - *Wilkins-Chalgren (medium) s mupirocinem*  
MWMQ - *modifikované Wilkins-Chalgren (medium) s 8-hydroxychinolinem*  
NGS - *next generation sequencing*  
NPNL - *neomycin-paromomycin-nalidixic acid-lithium chloride (medium)*  
OMM - *oligosacharidy mateřského mléka*  
ORP - *oxidačně-redukční potenciál*  
PCR - *polymerase chain reaction*  
PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*  
RB - *raffinose-bifidobacterium (medium)*  
RCM - *reinforced clostridia medium*  
RMS - *modified Rogosa's (medium)*  
RP-MUP - *raffinose-propionate lithium mupirocin (medium)*  
SCFA - *short-chain fatty acid*

SPP - *Společnost pro probiotika a prebiotika*  
T<sup>T</sup> - *typový kmen*  
TGGE - *temperature gradient gel electrophoresis*  
TM - *terapeutické minimum*  
TOS - *transgalactosylated oligo saccharide (medium)*  
TPY - *tryptone-phytone yeast extrakt (medium)*  
TS - *type strain*  
TTC - *trifenyltetrazoliumchlorid*  
VBNC - *viable but nonculturable*  
WHO - *World Health Organization*  
WCH - *Wilkins-Chalgren (medium)*

## 10 SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tab. 1 Přehled nejčastěji používaných probiotických bakterií (upraveno: Holzapfel et al. 2001; Rada a Marounek, 2005).

Tab. 2 Přehled nejčastěji komerčně používaných kmenů probiotických bifidobakterií v MKV (upraveno: Pokusaeva et al., 2011).

Tab. 3 Základní a elektivní média, obecně užívaná pro kultivaci bifidobakterií (upraveno: Roy, 2001; cit.: Roy 2001).

Tab. 4 Bakteriální mucin-degradující enzymy, identifikované v lidském GIT (upraveno: Derrien et al., 2010).

---

Obr. 1 *Bifidobacterium bifidum* DSM 29521<sup>T</sup>; foto: Nikon Eclipse E 200, kamera Nikon DS-Fi2, zvětšení 15 x 40, Pechar, 2017.

Obr. 2 Anaerobní kultivace humánních kmenů bifidobakterií v anaerostatu; foto: autor, 2017.

Obr. 3 Mupirocin; Gulyas et al., 2008.

Obr. 4 *Akkermansia muciniphila* DSM 22959, typový kmen kultivovaný v médiu s mucinem, jako jediným zdrojem uhlíku; foto: Nikon Eclipse E 200, kamera Nikon DS-Fi2, zvětšení 15 x 40, Pechar, 2017.

Obr. 5 Růst *Bifidobacterium bifidum* JKM v médiu s mucinem, jako jediným zdrojem uhlíku; foto: Nikon Eclipse E 200, kamera Nikon DS-Fi2, zvětšení 15 x 40, Pechar, 2015.

Obr. 6 Porovnání fermentačních profilů kmenů *B. bifidum* a *B. animalis* subsp. *lactis*: a/ *B. bifidum* DSM 20082, b/ *B. bifidum* JKM, c/ *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140<sup>T</sup>, d/ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, soupravami biochemických testů API 50 CH (Biomérieux, France). Žlutá barva značí pozitivní reakci, u pozice 25 (cca uprostřed sestavy) černá (foto: autor, 2015). Testované substráty viz Příloha 3 - Tab. S3.

Obr. 7 Testování utilizace mucinu: pozitivní reakce (vpravo) je doprovázena změnou barvy indikátoru v médiu; foto: autor, 2015.

Obr. 8 Kultivace kmenů bifidobakterií v MM agaru. Využití mucinu jako substrátu je doprovázeno změnou barvy indikátoru v médiu z fialové na žlutou (pozitivní reakce), ta ukazuje na přítomnost kmenů *B. bifidum*; foto: autor, 2015.

## 11 PŘÍLOHY

### Příloha 1

#### Supporting Information

**Table S1** The growth of pure strains of bifidobacteria and clostridia on control (MW) and on selective medium (MWMQ).

Strain	MW	MWMQ
<i>B. adolescentis</i> H1	9.05±0.15 <sup>a</sup>	8.42±0.15 <sup>b</sup>
<i>B. longum</i> J2	8.64±0.06 <sup>a</sup>	8.53±0.08 <sup>b</sup>
<i>B. longum</i> DS2	8.70±0.01 <sup>a</sup>	8.76±0.08 <sup>a</sup>
<i>B. breve</i> MV1	8.50±0.36 <sup>a</sup>	8.70±0.10 <sup>a</sup>
<i>B. infantis</i> LB3	7.08±0.98 <sup>a</sup>	7.30±0.69 <sup>a</sup>
average	8.39±0.68 <sup>a</sup>	8.34±0.53 <sup>a</sup>
<i>C. tertium</i> LAIII	8.92±0.06	NG
<i>C. clostridioforme</i> MAM	8.03±1.46	NG
<i>C. difficile</i> KK4	6.80±0.06	NG
<i>C. ramosum</i> HH3	5.57±0.01	NG
<i>C. perfringens</i> VOK	7.58±0.03	NG
<i>C. butyricum</i> CM14	8.36±0.25	NG
<i>C. acetobutylicum</i> L4	8.65±0.15	NG
<i>C. butyricum</i> T1	5.72±0.16	NG
average	7.45±1.29	NG

The values are expressed as  $\log_{10}$  cfu ml<sup>-1</sup> (mean of 3 replicates  $\pm$  SD). MW–modified Wilkins-Chalgren agar consisting of Wilkins-Chalgren agar, soya peptone (5 g l<sup>-1</sup>), L-cysteine (0.5 g l<sup>-1</sup>) and Tween 80 (1 ml l<sup>-1</sup>). MWMQ–modified Wilkins-Chalgren agar supplemented with glacial acetic acid (1 ml l<sup>-1</sup>), mupirocin (100 mg l<sup>-1</sup>) and 8-hydroxyquinoline (90 mg l<sup>-1</sup>). NG – no growth. Values in lines with different letter superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

[lam12552-sup-0001-TableS1.doc](#)

## Příloha 2

### Supporting Information

**Table S2** The growth of mixtures of pure strains of bifidobacteria and clostridia in different ratios on control (MW) and on selective media (MWM, MWMQ).

Mixtures		1	2	3	4	5	6						
Strains		<i>B. breve</i> MV1	<i>C. perfringens</i> VOK	<i>B. longum</i> DS2	<i>C. clostridio-</i> <i>forme</i> MAM	<i>B. infantis</i> LB3	<i>C. butyricum</i> T1	<i>B. adolescentis</i> H1	<i>C. butyricum</i> T1	<i>B. adolescentis</i> H1	<i>C. tertium</i> LAIH	<i>B. longum</i> J2	<i>C. difficile</i> KK4
Bacterial counts in mock samples		8.32	8.41	8.31	8.47	8.49	8.44	8.45	8.49	8.29	8.43	8.55	8.46
Volume (ml) of bacterial suspensions (bifidobacteria + clostridia) in mock samples	1+1	Bact. counts	MW	8.63±0.03 <sup>a</sup>	8.68±0.03 <sup>a</sup>	8.80±0.03 <sup>a</sup>	8.82±0.02 <sup>a</sup>	8.61±0.03 <sup>a</sup>	8.81±0.02 <sup>a</sup>				
		MWM	8.68±0.02 <sup>a</sup>	8.64±0.02 <sup>a</sup>	8.76±0.03 <sup>a</sup>	8.82±0.04 <sup>a</sup>	8.63±0.02 <sup>a</sup>	8.71±0.09 <sup>a</sup>					
		MWMQ	8.43±0.03 <sup>b</sup>	8.35±0.03 <sup>b</sup>	8.43±0.02 <sup>b</sup>	8.56±0.04 <sup>b</sup>	8.35±0.05 <sup>b</sup>	8.57±0.02 <sup>b</sup>					
	N. of isolates/ n. of bifidobacteria	MWM	20/8	20/7	20/11	20/8	20/7	20/14					
		MWMQ	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20					
		MW	8.40±0.04 <sup>a</sup>	8.28±0.07 <sup>a</sup>	8.49±0.03 <sup>a</sup>	8.57±0.04 <sup>a</sup>	8.38±0.05 <sup>a</sup>	8.58±0.01 <sup>a</sup>					
	1+0.1	Bact. counts	MWM	8.39±0.06 <sup>a</sup>	8.33±0.03 <sup>a</sup>	8.39±0.02 <sup>b</sup>	8.44±0.09 <sup>a</sup>	8.36±0.04 <sup>a</sup>	8.55±0.04 <sup>a</sup>				
		MWMQ	8.34±0.04 <sup>a</sup>	8.26±0.05 <sup>a</sup>	8.42±0.02 <sup>b</sup>	8.40±0.09 <sup>a</sup>	8.22±0.04 <sup>b</sup>	8.55±0.03 <sup>a</sup>					
		MWM	20/19	20/18	20/20	20/20	20/12	20/20					
	N. of isolates/ n. of bifidobacteria	MWMQ	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20					
		MW	8.37±0.04 <sup>a</sup>	8.35±0.04 <sup>a</sup>	8.51±0.03 <sup>a</sup>	8.48±0.02 <sup>a</sup>	8.36±0.06 <sup>ab</sup>	8.58±0.02 <sup>a</sup>					
		MWM	8.38±0.05 <sup>a</sup>	8.30±0.05 <sup>a</sup>	8.45±0.05 <sup>a</sup>	8.50±0.08 <sup>a</sup>	8.40±0.07 <sup>a</sup>	8.56±0.04 <sup>a</sup>					
	1+0.01	Bact. counts	MWMQ	8.34±0.02 <sup>a</sup>	8.25±0.06 <sup>a</sup>	8.42±0.02 <sup>a</sup>	8.41±0.03 <sup>a</sup>	8.25±0.04 <sup>b</sup>	8.57±0.05 <sup>a</sup>				
		MWM	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20					
		MWMQ	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20					
	N. of isolates/ n. of bifidobacteria	MW	8.39±0.02 <sup>a</sup>	8.46±0.07 <sup>a</sup>	8.47±0.08 <sup>a</sup>	8.52±0.07 <sup>a</sup>	8.37±0.06 <sup>a</sup>	8.50±0.01 <sup>a</sup>					
		MWM	8.39±0.04 <sup>a</sup>	8.23±0.06 <sup>b</sup>	8.48±0.02 <sup>a</sup>	8.53±0.03 <sup>a</sup>	8.34±0.01 <sup>a</sup>	8.54±0.03 <sup>a</sup>					
		MWMQ	7.32±0.06 <sup>b</sup>	7.21±0.03 <sup>c</sup>	7.48±0.07 <sup>b</sup>	7.43±0.10 <sup>b</sup>	7.23±0.03 <sup>b</sup>	7.53±0.02 <sup>b</sup>					
	0.1+1	Bact. counts	MWM	20/3	20/0	20/4	20/6	20/0	20/1				
		MWMQ	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20					
		MW	8.39±0.03 <sup>a</sup>	8.43±0.03 <sup>a</sup>	8.50±0.04 <sup>a</sup>	8.50±0.05 <sup>a</sup>	8.50±0.06 <sup>a</sup>	8.50±0.07 <sup>a</sup>					
	0.01+1	Bact. counts	MWM	8.42±0.02 <sup>a</sup>	8.41±0.06 <sup>a</sup>	8.42±0.03 <sup>a</sup>	8.51±0.02 <sup>a</sup>	8.36±0.07 <sup>a</sup>	8.51±0.03 <sup>a</sup>				
		MWMQ	6.36±0.07 <sup>b</sup>	6.35±0.06 <sup>b</sup>	6.50±0.02 <sup>b</sup>	6.51±0.04 <sup>b</sup>	6.21±0.05 <sup>b</sup>	6.53±0.01 <sup>b</sup>					
		MWM	20/0	20/0	20/0	20/0	20/0	20/0					
N. of isolates/ n. of bifidobacteria	MWMQ	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20						



The values are expressed as  $\log_{10}$  cfu ml<sup>-1</sup> (mean of 3 replicates  $\pm$  SD). MW–modified Wilkins-Chalgren agar consisting of Wilkins-Chalgren agar, soya peptone (5 g l<sup>-1</sup>), L-cysteine (0.5 g l<sup>-1</sup>) and Tween 80 (1 ml l<sup>-1</sup>). MWM – modified Wilkins-Chalgren agar with mupirocin – consisting of MW supplemented with glacial acetic acid (1 ml l<sup>-1</sup>) and mupirocin (100 mg l<sup>-1</sup>). MWMQ–modified Wilkins-Chalgren agar with 8-hydroxyquinoline – consisting of MWM supplemented with 8-hydroxyquinoline (90 mg l<sup>-1</sup>). Mean values in columns for each variant of the mock sample with different letter superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

lam12552-sup-0002-TableS2.doc

### Příloha 3

**Tab. S3 Různá fermentační spektra konkrétních bifidobakteriálních kmenů, testovaných soupravou biochemických testů API 50 CH (Biomérieux, France); pozitivní reakce (+ + / + / (+)) vyznačena barevně.**

Substrát	Kmen			
	<i>B. bifidum</i> DSM 20082	<i>B. bifidum</i> JKM	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140 <sup>T</sup>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12
1	Glycerol	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-
3	D-Arabinosa	-	-	-
4	L-Arabinosa	-	-	+
5	D-Ribosa	-	-	-
6	D-Xylosa	-	-	-
7	L-Xylosa	-	-	-
8	D-Adonitol	-	-	-
9	Methyl-βD-Xylopyranosid	++	+	-
10	D-Galaktosa	++	++	++
11	D-Glukosa	++	++	-
12	D-Fruktosa	-	-	-
13	D-Mannosa	-	-	-
14	L-Sorbosa	-	-	-
15	L-Rhamnosa	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-
17	Inositol	-	-	-
18	D-Mannitol	-	-	-
19	D-Sorbitol	-	-	-
20	Methyl-αD-Mannopyranosid	-	-	-
21	Methyl-αD-Glukopyranosid	-	-	-
22	N-Acetylglucosamin	-	-	++
23	Amygdalin	-	-	-
24	Arbutin	-	-	++
25	Eskulin	-	-	+
26	Salicin	-	-	+
27	D-Cellobiosa	-	-	++
28	D-Maltosa	+	++	++
29	D-Laktosa	-	-	++
30	D-Melibiosa	-	-	++
31	D-Sacharosa	-	-	-
32	D-Trehalosa	-	-	-
33	Inulin	-	-	-
34	D-Melecitosa	-	-	++
35	D-Raffinosa	-	-	-
36	Starch (AmiDon)	-	-	-
37	Glykogen	-	-	-
38	Xylitol	++	+	+
39	Gentiobiosa	-	-	-
40	D-Turanosa	-	-	-
41	D-Lyxosa	-	-	-
42	D-Tagatosa	-	-	-
43	D-Fukosa	-	-	-
44	L-Fukosa	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-
47	Potassium Glukonát	-	-	-
48	Potassium 2-KetoGlukonát	-	-	-
49	Potassium 5-KetoGlukonát	-	-	-

***Bifidobacterium apri* sp. nov., a thermophilic actinobacterium isolated from the digestive tract of wild pigs (*Sus scrofa*).**INTERNATIONAL  
JOURNAL OF SYSTEMATIC  
AND EVOLUTIONARY  
MICROBIOLOGYTAXONOMIC DESCRIPTION  
Pechar et al., *Int J Syst Evol Microbiol*  
DOI 10.1099/ijsem.0.001956***Bifidobacterium apri* sp. nov., a thermophilic actinobacterium isolated from the digestive tract of wild pigs (*Sus scrofa*)**R. Pechar,<sup>1</sup> J. Killer,<sup>1,2,\*</sup> H. Salmonová,<sup>1</sup> M. Geigerová,<sup>1</sup> R. Švejtil,<sup>1</sup> P. Švec,<sup>3</sup> I. Sedláček,<sup>3</sup> V. Rada<sup>1</sup> and O. Benada<sup>4,5</sup>**Abstract**

Fresh samples of intestinal contents of three wild pigs originating from the Central Bohemia region were examined for the presence of bifidobacterial strains. During the study, we isolated many fructose-6-phosphate phosphoketolase-positive, strictly anaerobic, irregular rod-shaped bacterial isolates. Three of them were preliminarily identified as representing a novel species of the genus *Bifidobacterium* because their 16S rRNA gene sequence similarity with the closest relatives of thermophilic bifidobacteria (*Bifidobacterium boum* DSM 20432<sup>T</sup>, *Bifidobacterium thermophilum* DSM 20210<sup>T</sup>, *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* LMG 21689<sup>T</sup>, *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* DSM 15837<sup>T</sup>) was in the range of 97.9 – 98.4 %. All three bacterial isolates had identical 16S rRNA, *dnaJ1*, *fusA*, *gyrB* and *rplB* gene sequences. Isolate RP115<sup>T</sup> was chosen as a representative of the bacterial group and DNA G+C content (mol%) determination, biochemical tests and analyses of physiological and morphological characteristics, habitat and chemotaxonomic traits (peptidoglycan structure, cellular fatty acids and polar lipids profile) were performed. The DNA-DNA hybridization analyses of RP115<sup>T</sup> and species representing the group of thermophilic bifidobacteria revealed values in the range from 33 to 53 %. This fact, together with relatively low sequence similarities of particular phylogenetic markers among examined bacterial strains and the phenotyping and chemotaxonomy results obtained, indicated that the evaluated bacterial isolate should be classified as representing a separate taxon within the specific group of thermophilic bifidobacteria. The name *Bifidobacterium apri* (of boar) sp. nov. has been proposed for the representative strain RP115<sup>T</sup> (=CCM 8605<sup>T</sup>=DSM 100238<sup>T</sup>=LMG 28779<sup>T</sup>).

Digestive tract of domesticated pigs represents, along with humans and primates [1–3], the largest reservoir of bifidobacterial diversity [4, 5]. *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *suus*, *Bifidobacterium longum* subsp. *suillum*, *Bifidobacterium psychraerophilum* and *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* are exclusively found in domesticated pigs [6–9]. Other species, such as *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium minimum*, *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium boum* are often present in the digestive tract of domesticated pigs [4, 10–13]. In addition, other representatives of the family *Bifidobacteriaceae* (genera *Aeriscardovia* and *Pseudocardovia*) occurring in the digestive tract of domestic and wild pigs have been recently described [11, 14, 15]. Some researchers even

believe that many species of bifidobacteria inhabiting the intestinal tract of pigs have not been described yet [11, 16].

Despite the high diversity, the number of bifidobacteria in pigs appears to be lower compared with other bacterial groups and reaches about 10<sup>8</sup> g<sup>-1</sup> of intestinal faecal samples [4, 17, 18]. However, it should be noted that these studies were based on culture-dependent methods using media that are not fully selective and that the real number could be higher. Unfortunately, desirable culture-independent studies aimed at determining the real number of bifidobacteria in different parts of pig's digestive tracts have not yet been performed. The probiotic effect of bifidobacteria in pigs was studied mainly in connection with immunoregulation [19, 20], improved feed conversion and reduced mortality [21].

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Department of Microbiology, Nutrition and Diagnostics, Czech University of Life Sciences, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Kamýcká 129, Prague 6 – Suchbát, 165 21, Czech Republic; <sup>2</sup>Institute of Animal Physiology and Genetics v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Videňská 1083, Prague 4 – Krč, 142 20, Czech Republic; <sup>3</sup>Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Faculty of Science, Kamenice 5, building A25, 625 00, Brno, Czech Republic; <sup>4</sup>Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., Videňská 1083, 142 20, Prague 4, Czech Republic; <sup>5</sup>Department of Biology, Faculty of Science, J. E. Purkyně University in Ústí nad Labem, Za Válcovnou 1000/8, 400 96 Ústí nad Labem, Czech Republic.

\*Correspondence: J. Killer, killer.jiri@seznam.cz or killer@iapg.cas.cz

**Keywords:** *Bifidobacterium*; wild pigs; thermophilic bifidobacteria; MLSA.

**Abbreviations:** DDH, DNA-DNA hybridization; FAMES, Fatty acid methyl esters; MLSA, multilocus sequence analysis.

The GenBank/EMBL/DBJ accession numbers for the 16S rRNA, *dnaJ1*, *fusA*, *gyrB*, *rplB* gene sequences and 16S rRNA-23S rRNA intergenic spacer region of strain RP115<sup>T</sup> are KT343145, KT343155, KT343133, KT343148, KT343130 and KT343137, respectively.

***Galliscardovia ingluviei* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the crop of a laying hen (*Gallus gallus* f. *domestica*).**

INTERNATIONAL  
JOURNAL OF SYSTEMATIC  
AND EVOLUTIONARY  
MICROBIOLOGY

TAXONOMIC DESCRIPTION  
Pechar et al., *Int J Syst Evol Microbiol*  
DOI 10.1099/ijsem.0.001972



***Galliscardovia ingluviei* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the crop of a laying hen (*Gallus gallus* f. *domestica*)**

R. Pechar,<sup>1</sup> J. Killer,<sup>1,2,\*</sup> R. Švejstlil,<sup>1</sup> H. Salmonová,<sup>1</sup> M. Geigerová,<sup>1</sup> V. Bunešová,<sup>1</sup> V. Rada<sup>1</sup> and O. Benada<sup>3,4</sup>

**Abstract**

Bacteria with potential probiotic applications are not yet sufficiently explored, even for animals with economic importance. Therefore, we decided to isolate and identify representatives of the family *Bifidobacteriaceae*, which inhabit the crop of laying hens. During the study, a fructose-6-phosphate phosphoketolase-positive strain, RP51<sup>T</sup>, with a regular/slightly irregular and sometimes an S-shaped slightly curved rod-like shape, was isolated from the crop of a 13-month-old Hisex Brown hybrid laying hen. The best growth of the Gram-stain-positive bacterium, which was isolated using *Bifidobacterium*-selective mTPY agar, was found out to be under strictly anaerobic conditions, however an ability to grow under microaerophilic and aerobic conditions was also observed. Sequencing of the almost complete 16S rRNA gene (1444 bp) showed *Alloscardovia omnicoles* CCUG 31649<sup>T</sup> and *Bombiscardovia coagulans* BLAPIII/AGV<sup>T</sup> to be the most closely related species with similarities of 93.4 and 93.1%, respectively. Lower sequence similarities were determined with other scardovial genera and other representatives of the genus *Bifidobacterium*. Taxonomic relationships with *A. omnicoles* and other members of the family *Bifidobacteriaceae* were also demonstrated, based on the sequences of *dnaK*, *fusA*, *hsp60* and *rplB* gene fragments. Low sequence similarities of phylogenetic markers to related scardovial genera and bifidobacteria along with unique features of the bacterial strain investigated within the family *Bifidobacteriaceae* (including the lowest DNA G+C value (44.3 mol%), a unique spectrum of cellular fatty acids and polar lipids, cellular morphology, the wide temperature range for growth (15–49 °C) and habitat) clearly indicate that strain RP51<sup>T</sup> is a representative of a novel genus within the family *Bifidobacteriaceae* for which the name *Galliscardovia ingluviei* gen. nov., sp. nov. (RP51<sup>T</sup>=DSM 100235<sup>T</sup>=LMG 28778<sup>T</sup>=CCM 8606<sup>T</sup>) is proposed.

The number of bacteria on Earth is estimated to be  $5 \times 10^{30}$ , representing the most abundant component of biomass [1]. Most microorganisms (prokaryotes, fungi and protists) [2], have not been identified yet (more than 99%). Ocean and soil environments appear to be the largest source of uncharacterized prokaryotes. However, the digestive tract of farm animals represents a significant ecological niche of, as yet, unexplored microorganisms with economic implications for humans [3–5]. Many studies have focused on intestinal bacterial diversity and the role of intestinal microorganisms in the health and physiology of mammalian livestock. Uncovering the particular diversity and the role of bacteria inhabiting the digestive tract of poultry, especially the crop, is on the periphery of scientific interest, even though this could

serve as a source of novel bacterial taxa [6] with potential applications in the veterinary pharmaceutical industry. So, research is now directed particularly into the probiotic bacteria, represented mainly by lactobacilli, as well as other lactic acid bacteria and bifidobacteria [7–10]. Probiotics are well known to have many beneficial impacts on host physiology and immunology. In connection with poultry, they have been evaluated to be real or potential inhibitors of pathogens, immunomodulators and contributors to improved feed conversion [11].

The digestive tract of most birds consists of the oesophagus, crop, proventriculus and gizzard, intestines (duodenum, jejunum, ileum and ceca), colon and cloaca. The bacteria present in the digestive tract of birds, as in other warm-

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýčská 129, Prague 6 – Suchbát, 165 00, Czech Republic; <sup>2</sup>Institute of Animal Physiology and Genetics v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Videňská 1083, Prague 4 – Krč, 142 20, Czech Republic; <sup>3</sup>Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., Videňská 1083, 142 20, Prague 4, Czech Republic; <sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Science, J. E. Purkyně University in Ústí nad Labem, Za Válcovnou 1000/8, 400 96 Ústí nad Labem, Czech Republic.

**\*Correspondence:** J. Killer, killer.jiri@seznam.cz or killer@iapg.cas.cz

**Keywords:** *Bifidobacteriaceae*; scardovia; crop; laying hen.

**Abbreviations:** DPG, Diphosphatidylglycerol; GL, Glycolipid; L, Lipid; PG, Phosphatidylglycerol; PGL, phosphoglycolipid; PL, Phospholipid. The following GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers were provided for the 16S rRNA, *dnaK*, *fusA*, *hsp60*, *rplB* gene sequences and 16S rRNA-23S rRNA intergenic spacer region of strain RP51<sup>T</sup>: KT343146, KT343152, KT343134, KT343154, KT343131 and KT343138, respectively.