

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Vliv pesticidů na střevní mikrobiotu zvířat

Bakalářská práce

Autor práce: Michal Stehlík

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

Konzultant práce: Ing. Roman Švejtil

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv pesticidů na střevní mikrobiotu zvířat" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2016

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za odborné vedení bakalářské práce, vstřícnost, užitečné rady i materiály. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Romanu Švejstilovi za ochotu a množství konzultací, které mi poskytl.

Souhrn

Pesticidy jsou látky, používané k hubení rostlinných a živočišných škůdců v zemědělství. Jsou velice významným a důležitým faktorem jak v produkci, tak ve výnosech. V dnešní době je pro zemědělce téměř nemožné se bez takových látek obejít, avšak jejich působnost v půdě nepřináší vždy jen užitek. O pesticidech je všeobecně známo, že mohou působit nepříznivě jak na ekosystém, ve kterém se vyskytují, tak na lidský či zvířecí organismus. V důsledku toho bylo již mnoho takových látek během své působnosti zakázáno a vyřazeno z trhu. Pesticidy a jejich rezidua podléhají mnoha kontrolám a laboratorním rozborům ve snaze předejít jejich negativnímu působení.

Cílem bakalářské práce bylo testovat vliv pesticidu (Roundup) na střevní mikroorganismy. Experiment zahrnoval jednoduchý pokus na čerstvém výkalu skotu a dále pak komplexní posouzení vlivu Roundupu na kultury, izolované z výkalů různých hospodářských zvířat. U čistých kultur bakterií byly stanoveny specifické růstové rychlosti ve třech různých koncentracích Roundupu. U kravských výkalů byly stanoveny počty laktobacilů, enterokoků, *E. coli* a koliformních bakterií po kultivaci v šesti různých koncentracích Roundupu.

V prvním pokusu nebyla prokázána žádná korelace koncentrace Roundupu a počtu kravských střevních bakterií. U druhého pokusu byl vliv Roundupu na růst střevních bakterií zjevný u nejvyšší koncentrace. Při koncentraci účinné látky glyfosátu ve vzorku 17 g/L dosahovaly specifické růstové rychlosti značně nižších hodnot než u nižších koncentrací. Kontrolní vzorek a vzorky o koncentraci glyfosátu 1,7 g/L a 0,17 g/L narostly ve většině případů podobně. Z toho vyplývá, že v těchto koncentracích nebyl růst bakterií glyfosátem příliš inhibován. Nejméně citlivé byly na přítomnost glyfosátu byly celkově laktobacily. U zvířat byla zjištěna nejvyšší citlivost na glyfosát u střevních bakterií skotu a nejnižší u střevních bakterií kura.

Klíčová slova: pesticidy, Roundup, glyfosát, střevní mikrobiota

Impact of pesticides on the gut microbiota of animals

Summary

Pesticides are substances used to control plant and animal pest in agriculture. They are very significant and important factor in both production and revenues. Nowadays it is almost impossible for farmers to dispense without these substances but their presence in the soil does not bring only benefits. About pesticides it is generally known that they may adversely affect either on the ecosystem or the human or animal body. As the result many substances had been banned from market. Pesticides and their residues are subject to many controls and laboratory analysis in order to prevent their negative effects.

The aim of the thesis was to test the effect of pesticide (Roundup) on gut microorganisms. For the experiments we used bovine fecal samples and pure bacterial cultures isolated from various domestic animals for the testing of susceptibility to Roundup. We have determined specific growth rates of pure cultures cultivated on three different concentrations of Roundup and total counts lactobacilli, enterococci, *E. coli* and coliform bacteria of bovine feces cultivated on six different concentrations of Roundup

In the first experiment, no correlation has been found between the concentration of glyphosate (active substance of Roundup) and counts of bovine intestinal bacteria. The effect of glyphosate on the growth of intestinal bacteria was visible at the second attempt. At the highest concentration of glyphosate 17 g/L. Growth curves reached considerably lower levels here than at lower concentrations of glyphosate. Control samples and the samples on the concentration of glyphosate 1.7 mg/L and 0, 17mg/L increased similarly in most cases. This implies that in these concentrations there was no inhibition of bacteria whatsoever. The least susceptible genera to glyphosate were lactobacilli. The highest susceptibility to glyphosate was detected in bovine bacteria and the lowest in chicken bacteria.

Key words: pesticides, Roundup, glyphosate, gut microbiota

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl Bakalářské práce	9
2.1 Hypotéza	9
3. Literární rešerše	10
3.1 Pesticidy	10
3.1.1 Historie pesticidů.....	10
3.1.2 Klasifikace pesticidů.....	11
3.1.3 Herbicidy.....	13
3.1.4 Glyphosát.....	14
3.1.5 Insekticidy.....	17
3.1.6 Fungicidy.....	17
3.1.7 Hrozba pesticidů	18
3.2 Střevní mikrobiota zvířat.....	20
3.2.1 Funkce střevní mikrobioty	20
3.2.2 Střevní mikrobiota drůbeže.....	21
3.2.3 Bachorová mikrobiota skotu	21
3.3 Mikroorganismy osídlující trávicí trakt	23
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	23
3.3.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	24
3.3.3 Rod <i>Bifidobacterium</i>	25
3.3.4 Rod <i>Enterococcus</i>	26
3.3.5 Rod <i>Clostridium</i>	26
4 Materiál a metody	28
4.1 Pokus č. 1 – Mikrobiologický rozbor stolice krávy.....	28
4.1.1 Odběr vzorků a kultivace	28
4.1.2 Mikrobiologický rozbor	29
4.1.3 Příprava ředící řady a ředění vzorků	31
4.1.4 Inokulace živné půdy a kultivace	32
4.1.5 Vyhodnocení počtu kolonií	33
4.1.6 Statistické vyhodnocení.....	33
4.2 Pokus č. 2 – Růstové křivky.....	34
4.2.1 Příprava a složení kultivačních médií.....	35
4.2.2 Postup měření.....	35
4.2.3 Výpočty	36
5. Výsledky	37

5.1 Účinek glyfosátu na bakterie kravského výkalu.....	37
5.1.1 Statistické vyhodnocení.....	38
5.2 Účinek glyfosátu na čisté izoláty z trávících traktů hospodářských zvířat	39
5.2.1 Výsledky růstu jednotlivých kmenů bakterií	39
5.2.2 Výsledky růstu bakterií u jednotlivých zvířat.....	43
5.2.3 Statistické vyhodnocení růstových křivek.....	45
5.2.3.1 Vyhodnocení pro jednotlivé rody	46
6. Diskuze	50
7. Závěr	53
8. Seznam použité literatury.....	54
9. Samostatné přílohy	61

1. Úvod

V dnešní době je k ochraně rostlin v zemědělství používáno široké spektrum látek, bez kterých se rostlinná výroba již neobejde. Každá chemicky syntetizovaná látka má své specifické složení a metodu aplikace na rostlinu. Také její účinek na organismus ať už lidský či zvířecí je u každého postřiku jiný. Prostředky na ochranu rostlin procházejí přísnými kontrolami a laboratorními testy než se vůbec dostanou na trh, avšak i po té velká spousta laboratorních studií naznačuje nepříznivé účinky na organismus.

Kvůli negativním vlastnostem byla celá řada pesticidů v minulosti zakázána, z nichž nejznámějším zakázaným prostředkem na ochranu rostlin je DDT. Negativní vlastnost DDT spočívala ve vysoké toxicitě pro zvířata a akumulaci v jejich orgánech, která způsobovala další zdravotní potíže.

V posledních letech je velice řešeným světovým tématem v oblasti zemědělství Roundup s účinnou látkou glyfosát, který je momentálně nejprodávanější pesticidní prostředek na světě. Jedná se o totální herbicid, poprvé vyrobený firmou Monsanto company. Roundup má velice nízkou akutní toxicitu a při běžné konzumaci by neměl představovat zdravotní riziko. I přes to však probíhá mnoho výzkumů, které se této látce podrobně věnují a zkoumají jeho účinky na lidský a zvířecí organismus.

2. Cíl Bakalářské práce

Cílem práce bylo testovat vliv glyfosátu v různých koncentracích na střevní bakterie živočichů izolovaných z jejich výkalů a na čerstvé vzorky kravských výkalů.

2.1 Hypotéza

Různé mikroorganismy se budou lišit v citlivosti na jednotlivé koncentrace glyfosátu ve vzorku.

3. Literární rešerše

3.1 Pesticidy

Jsou látky nebo směsi látek převážně chemického charakteru užívané proti škodlivým živočichům, parazitickým houbám a plevelům, které ohrožují pěstování polních, zahradních a lesních rostlin, dále zásoby potravin a zemědělských produktů, průmyslové materiály, hospodářská zvířata nebo i člověka samotného (Zvára, 1998). V dnešní době jsou pesticidy v zemědělství velice důležitým prvkem. Podílejí se na snižování výnosových ztrát, udržují vysokou kvalitu produktů a někdy i zlepšují nutriční hodnotu potravin a jejich bezpečnost. Z tohoto pohledu jsou pesticidy výborným ekonomickým prvkem usnadňující práci a zároveň efektivní nástroj proti škůdcům (Baligar, 2001). Navzdory mnoha výhodám, které nám pesticidy nabízí je tu i celá řada škodlivých účinků, které mohou způsobit ať už na lidské zdraví nebo na životní prostředí. Rozsah těchto nepříznivých účinků na zdraví zahrnuje akutní a trvalé poškození nervového systému, poškození plic, poranění pohlavních orgánů, dysfunkce imunitního a endokrinního systému, vrozené vady a rakovinu (Mansour, 2004).

Pesticidy mohou být anorganické či organické povahy, převládají však organické. (Prousek, 20010) a převážná většina se používá v zemědělství a lesnictví jako přípravky na ochranu rostlin (Cremllyn, 1985).

3.1.1 Historie pesticidů

Od počátku civilizace se člověk neustále snažil zlepšovat své životní podmínky. Jeho úsilí opatřit si například dostatečné zásoby potravy se však stavějí do cesty různí škůdci a choroby napadající úrodu (Cremllyn, 1945). Pesticidy byly používány již po tisíce let. Na začátku 20. století byly primárně používány dvě hlavní třídy pesticidů. Prvními byly botanické, přírodní chemikálie, získané z rostlinného materiálu a následně upravené na anorganické soli. Tyto látky byly široce používány jako fungicidy, herbicidy a insekticidy. Druhou skupinou látek byly syntetické pesticidy, jejichž éra počala roku 1934 s objevem DDT (dichlordifenyiltrichlorethan), který disponoval insekticidními vlastnostmi (Gupta, 2004).

Hlavní rozmach výroby pesticidů nastal po roce 1945. Přispěly k tomu výsledky intenzivního výzkumu v letech Druhé světové války a především objev a využití

insekticidních vlastností DDT (Cremlyn, 1985). Hartley (1969) ve své knize tvrdí, že na počátku vývojové cesty stojí organičtí chemikové, kteří nejprve vyberou skupinu nových látek, o nichž tuší, že by mohly mít pesticidní účinky, a pak hledají vhodný způsob syntézy několika jejích představitelů. Tyto chemikálie po vyčištění a charakterizaci analytickými údaji jsou pak podány biologům, aby zjistili jejich potenciální pesticidní aktivitu.

3.1.2 Klasifikace pesticidů

Slovo „pesticidy“ je zastřešující pojem pro všechny insekticidy, herbicidy, fungicidy, rodenticidy, prostředky na ochranu dřeva, zahradní chemikálie a dezinfekční prostředky pro domácnost, používané k usmrcení škůdců. Klasifikace syntetických pesticidů je založena na mnoha různých způsobech, z nichž jsou 3 nejčastěji používané. Prvním je klasifikace založená na způsobu působení, druhá je klasifikace dle cílených škůdců a třetí je klasifikace na základě chemického složení pesticidu (Drum, 1980).

3.1.2.1 Klasifikace pesticidů založená na způsobu působení

Tímto způsobem jsou pesticidy klasifikovány jako kontaktní (nesystémové) a systémové. Nesystémové pesticidy jsou ty, které nepronikají do rostlinných tkání, a tudíž nejsou přepravovány uvnitř cévního systému rostlin. Přináší účinek pouze tehdy, pokud se dostanou do přímého kontaktu s cíleným škůdcem. Naopak systémové pesticidy do rostlinných tkání účinně pronikají a pohybují se v cévních svazcích rostlin, aby dosáhly požadovaného efektu (Buchel, 1983).

3.1.2.2 Klasifikace pesticidů dle cílených škůdců

V tomto typu klasifikace jsou pesticidy pojmenovány po názvech odpovídajících cílových škůdců (Buchel, 1983).

Tabulka č. 1 Rozdělení skupin pesticidů

Typ pesticidu	Cílový organismus
Insekticidy	Hmyz
Herbicidy	Plevele
Rodenticidy	Hlodavci
Fungicidy	Houby
Akaricidy (miticidy)	Klíšťata, roztoči
Moluskocidy	Měkkýši
Baktericidy	Bakterie
Avicidy	Ptáci
Algicidy	Řasy

Zdroj: (Buchel, 1983)

3.1.2.3 Klasifikace založená na chemické struktuře

Podle chemické klasifikace jsou pesticidy kategorizovány podle účinné složky. Tato klasifikace je zdaleka nejúčinnější pro výzkumné pracovníky v oblasti pesticidů a prostředí, protože jim vykládá podrobnosti a detaily o dané látce. Dává v ponětí jejich účinnost, fyzikální a chemické vlastnosti, což je důležité v režimu jejich aplikace a bezpečnostních opatření, které je třeba při aplikaci dodržovat. Na základě chemické klasifikace jsou čtyři hlavní skupiny pesticidů a to organochlorové, organofosforové, karbamáty a pyrethriny s pyrethroidy (Buchel, 1983)

3.1.2.3.1 Organochlorové pesticidy

Jsou to perzistentní organické polutanty, které představují hrozbu pro lidské zdraví a životní prostředí. Mezi tyto insekticidní látky řadíme DDT (dichlordifenyltrichloreten), heptachlor, aldrin, dialdrin, hexachlorcyklohexan a benzen hexachlorid. Tyto látky jsou charakteristické malou rozpustností ve vodě, perzistencí vůči prostředí, toxicitou a schopností bioakumulace. Díky těmito vlastnostem jsou označeny jako prostředí nebezpečné látky (Gray, 2008). V důsledku toho byly vyškrtuty z registru a zakázány (Ware, 1983).

3.1.2.3.2 Organofosforové pesticidy

Organofosforové pesticidy jsou nejpoužívanější třídou pesticidů na světě. Nejčastějšími zástupci této třídy jsou palathion a melathion (Proskocil, 2010). Tyto pesticidy tvoří obrovskou skupinu chemických látek pro ochranu plodin, hospodářských zvířat a lidského zdraví. Na základě konstrukčních charakteristik jsou rozděleny do nejméně třinácti typů zahrnující skupinu fosfátů, fosfonátů, fosfonthioátů a dalších (Gupta, 2006). První organofosfát byl syntetizován v 19. století, ale používány začaly být až ve 30. letech 20. století. Německý chemik Gerhard Schrader syntetizoval mnoho organofosfátových sloučenin jako například parathion, který se stále používá jako běžný pesticid (Costa, 2006). Toxicita organofosfátových pesticidů závisí na jejich chemické struktuře, cílovém organismu, koncentraci, způsobu aplikace a stupni rozkladu (Grlić, 1988).

3.1.2.3.3 Karbamáty

Karbamáty představují jednu z hlavních kategorií syntetických organických pesticidů již od jejich zavedení na agrochemický trh v roce 1950 (Tomlin, 1997). Důležitou skupinou karbamátových látek používanou pro své pesticidní vlastnosti jsou karbamátové insekticidy. Tyto insekticidy obsahují esterovou funkční skupinu a zabíjejí hmyz na základě reverzibilní inaktivace enzymu acetylcholinesterázy (Robert, 2002). Mechanismus otravy karbamátů (s výjimkou herbicidních karbamátů) spočívá v karbamylaci aktivní polohy acetylcholinesterázy vedoucí k inaktivaci tohoto nezbytného enzymu, který hraje důležitou roli v nervovém systému lidí a zvířat (Ecobichon, 2001). Hlavními zástupci této skupiny jsou aldikarb (Temik), karbofuran (Furadan), karbaryl (Sevin), ethienokarb, fenobukarb, oxaryl a methomyl (Robert, 2002).

3.1.3 Herbicidy

Herbicidy jsou nejčastěji klasifikovány podle chemické struktury, dále podle použití a také podle efektu či dopadu na rostliny. Mohou být klasifikovány také podle toxicity či stupně nebezpečnosti (Zimdhal, 1993). Prvním významným přípravkem pro selektivní hubení plevelů byl 2,4-dinitro-o-kresol (DNOK), zavedený ve Francii roku 1993. DNOK je kontaktní herbicid, který se aplikuje jako postřik na porosty obilovin, ve kterých hubí většinu jednoletých plevelů, aniž významně poškozuje kulturní plodinu. Víceleté rostliny bohužel zásah přežívají, ačkoliv jejich nadzemní vegetace zasychá. DNOK totiž není rostlinou rozváděn a rozšířený kořenový systém proto ošetření přežívá a za určitý čas vyraží nové

výhonky (Green et al., 1979). Herbicidní účinnost dinitrofenolů spočívá v jejich schopnosti přerušit oxidační fosforylaci a inhibovat tak syntézu ATP (Martin, 1973).

Vážným nedostatkem těchto látek je jejich velká toxicita pro savce (Stapley et al., 1969). Hodnoty LD₅₀ herbicidů 2,4-D a 2,4,5-T pro různá pokusná zvířata jsou uvedeny v tabulce (Bajgar et al., 1991).

Tabulka č. 2 Hodnoty LD₅₀ herbicidů 2,4-D a 2,4,5-T

Pokusné zvíře	LD50 per os v mg.kg ⁻¹	
	2,4-D	2,4,5-T
Myš	360-710	390-550
Potkan	900-1500	500
Morče	400-800	400-700
Králík	420	700
Pes	100	50-250
Opice	214	100

Zdroj: (Bajgar et al., 1991)

3.1.4 Glyfosát

Glyfosát, aneb aktivní část Round-upu je širokospektrý, neselektivní, postemergentní herbicid s účinností na všechny jednoleté i víceleté rostliny. Tento herbicid je rychle přenášen z listů do kořenů, oddenků a do apikálních tkání ošetřovaných rostlin (Franz et al., 1997). Jeho herbicidní účinnost spočívá v interferenci glyfosátu s biosyntézou fenylalaninu (Eto, 1974). Jakmile se dostane do rostliny, glyfosát potlačuje klíčový enzym známý jako EPSPS syntáza. Potlačení tohoto důležitého enzymu zabraňuje rostlině v syntéze určitých aromatických aminokyselin, které jsou základní pro růst rostliny. Vyšší formy života (savci, ptáci, plazi, obojživelníci a hmyz) tento enzym nemají (Franz et al. 1997). Glyfosát se také používá k zabránění růstu plevelů v polích s geneticky modifikovanými (GM) plodinami rezistentními na glyfosát, jako je sója, řepka, kukuřice atd. Od roku 1996 se počet geneticky modifikovaných plodin dramaticky zvýšil po celém světě. Odhaduje se, že 90 % z transgenních plodin pěstovaných po světě jsou rezistentní na glyfosát (Duke, 2008).

3.1.4.1 Vznik glyfosátu

Glyfosát byl zavedený firmou Monsanto Chemical v roce 1971 a připravuje se z glycinu a chlormethylfosfonové kyseliny (Eto, 1974). První molekula N-(fosfonomethyl) glycinu byla syntetizována v roce 1950 vědeckým pracovníkem Henrym Martinem, zaměstnancem malé Švýcarské firmy Cilag (Franz et al., 1997). Přesto, že nebyla tímto objevem předložena žádná farmaceutická perspektiva, látka byla zkoumána i nadále. O deset let později, prostřednictvím akvizice společnosti, byl laboratorní výzkum převeden pod společnost Aldrich Chemical Co., spolu s výzkumnými vzorky firmy Cilag. Výzkumu si všimla firma Monsanto (St. Louis, MO), která později rozšířila studii těchto sloučenin na testování herbicidní činnosti a jejich potenciálu proti vytrvalým plevelům (Dill et al., 2010).

3.1.4.2 Chemie a biochemie glyfosátu

Chemický název glyfosátu je 2-(fosfonomethyl) aminooctová kyselina. Název glyfosát vznikl odvozením gly(cin) a fos(fon)át. Molekula glyfosátu obsahuje několik hydrolyzovatelných vodíků, obzvláště vodík na prvním místě fosfátové skupiny. Molekula má tendenci působit ve formě zwitterionu, neboli obojetného ionu, kde disociuje fosfátový vodík a připojí se k aminoskupině. Zabíjení mnoha druhů rostlin a bakterií je způsobeno interferencí se syntézou aromatických aminokyselin, jako jsou fenylalanin, tyrosin a tryptofan. Glyfosát je specifickým inhibitorem enzymu EPSPS (5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza), který je nezbytnou součástí biosyntézy daných aromatických aminokyselin a jeho zablokování vede k narušení tvorby bílkovin (Schuette, 1998).

3.1.4.3 Glyfosát u nás a ve světě

V České republice bylo za rok 2013 oficiálně spotřebováno více než 935 tun glyfosátu, což je více než 1/6 celkové spotřeby pesticidů u nás. Glyfosát byl v posledních letech vůbec nejvíce používaným pesticidem v Česku, přičemž téměř polovina jeho spotřeby v roce 2013 byla použita na obiloviny (451,6 t) a třetina (312 t) na olejniny, zejména řepku (Šuta, 2015).

V roce 2011 se celosvětově aplikovalo kolem 650 000 tun glyfosátových přípravků a odhaduje se, že jejich používání se do roku 2017 zdvojnásobí. Pokud by EU schválila více geneticky modifikovaných plodin, mohlo by množství používaného glyfosátu narůst až o 800

procent (Benbrook, 2012). Na konci roku 2012 se stala Čína největším celosvětovým producentem glyfosátu, s produkcí o kapacitě 600 000 tun v daném roce (Wood, 2013).

3.1.4.4 Toxicita glyfosátu

O toxicitě glyfosátu se vede ve světě mnoho sporů. Vzniklo již mnoho studií, které se tímto tématem zabývaly, protože se jedná o velice významnou a celosvětově žádanou látku.

(Cox, 1995) ve své studii uvedl, že US EPA řadí glyfosát do „skupiny E“ – nekarcinogenní látky pro lidi. Rozhodnutí je založeno na třech celoživotních studiích provedených mezi roky 1979 a 1990, týkajících se laboratorních zvířat krměných různou dávkou glyfosátu.

V roce 2002 dostal glyfosát souhlas Evropskou unií a zároveň evropská komise uvedla, že „glyfosát v potravinách nebo v prostředí nemá žádné škodlivé účinky na zdraví lidí a zvířat“ (DG SANCO, 2002). Dále společnost Monsanto (2005) uvedla, že herbicid Roundup má „velmi nízkou akutní toxicitu“. Avšak informace o lidských otravách ukazují, že požití více než 85 ml glyfosátu obsaženého v herbicidu, může způsobit závažné reakce v organismu (Bradberry et al, 2004).

(Marschall, 2009) ve své studii uvedl, že přítomnost glyfosátu byla zjištěna v moči zemědělských pracovníků. Půdní mikroby rozkládají glyfosát na aminomethylfosfonickou kyselinu (AMPA). Glyfosát, glyfosátové formulace a AMPA indukují oxidativní stres u hlodavců a in vitro. Dále mohou indukovat DNA a způsobit chromozomální poškození u savců, člověka a živočišných buněk in vitro. Jedna studie poukazuje na nárůst krevních markerů poškozených chromozomů u obyvatel určitých oblastí, kde byl glyfosát aplikován.

3.1.4.5 Glyfosát jako původce chorob

Glyfosát inhibuje enzym cytochrom P 450 (CYP). Jedná se o enzym, který hraje klíčovou roli v detoxikaci xenobiotik z organismu. Omezuje tedy likvidaci škodlivých látek a má negativní dopad pro tělo. Následky se projevují pomalu v průběhu času zánětlivým poškozením buněčných membrán po celém těle. Následkem jsou běžné onemocnění

spojované se západním způsobem stravy, jako jsou obezita, deprese, poruchy zažívacího traktu, autismus, rakovina, cukrovka a Alzheimerova choroba (Samsel a Seneff, 2013).

3.1.5 Insekticidy

Insekticidy jsou látky, které chemicky regulují výskyt hmyzu (dezinsekce). Patří pod skupinu pesticidů, které se dělí dále podle cílových organismů. Nicméně některé insekticidní účinné látky se mohou využívat i jako akaricidy (látky určené k hubení roztočů), například permethrin (Junquera, 2014).

3.1.5.1 DDT

Prvním a nejrozšířenějším organochlorovým insekticidem bylo DDT, které bylo zavedeno v roce 1943. Během války se zdálo, že je to vůbec nejlepší insekticid, který spojuje široké spektrum insekticidní účinnosti s poměrně malou akutní toxicitou a má užitečné vlastnosti srovnatelné s vlastnostmi aspirinu. Tyto insekticidní látky se zdály neškodné do roku 1950, když byla jejich přítomnost prokázána v mléce krav, které konzumovali rostlinnou potravu, jež přišla s organochlorovými insekticidy do styku (Mellanby, 1970). Navzdory mnoha škodlivým účinkům bylo DDT ve většině světových zemí zakázáno (Gupta, 2004).

DDT a další organochlorové sloučeniny jsou velice stabilní látky, které se jen velice pomalu biologicky odbourávají (Moriarty, 1975). V důsledku toho byla celá zeměkoule zamořena DDT a jeho metabolity. Nacházíme je v dešťové vodě, antarktickém sněhu, ve vzduchu, rybách a tukových tkáních savců, člověka nevylučuje. Tuková tkáň lidí obsahuje kolem 10 ppm DDT (Ehrlich, 1972).

3.1.6 Fungicidy

Významnou skupinou pesticidních látek jsou fungicidy, tj. prostředky používané proti cizopasným houbám apod. Proti dříve hojně uplatňovaným fungicidům anorganickým nebo s anorganickou složkou přítomnou v molekule, se dnes aplikují různé fungicidy ftalimidové, dithiokarbamátové apod. (Davídek a kol., 1983).

(Brooks, 1999) tvrdí, že velké množství fungicidních reziduí obsažených v potravinách pro lidskou potřebu je způsobeno posklizňovým ošetřením.

3.1.7 Hrozba pesticidů

Většina používaných pesticidů jsou uměle syntetizované chemické sloučeniny, které jsou pro organismy cizorodými látkami a jsou proto v prostředí často rozkládány jen pomalu. Z toho vyplývá nebezpečí akumulace jejich reziduí.

Na hrozbu pesticidů poprvé upozornila svět kniha *Silent spring* (Mlčící jaro) od Rachel Carsonové v roce 1962. (Carsonová, 1962) ve své knize popsala proces známý jako biozesilování (biomagnification), v důsledku něhož se látky jako dichlordifenilchlorethan (DDT) a jiné uhlovodíky, které se v přírodě nerozkládají, koncentrují v potravních řetězcích. Kromě toho opakovaná aplikace pesticidů se stejným mechanismem vyvolává u škodlivých organismů vznik rezistence, což má zpětně za následek snížení nebo úplnou ztrátu účinnosti.

V poměrně raném stádiu vývoje je třeba určit toxikologické vlastnosti budoucího pesticidu, a to ne jen akutní toxicitu, ale i možné dlouhodobé účinky na životní prostředí. Toxicita se většinou udává hodnotou LD₅₀, což je dávka potřebná k usmrcení 50% populace testovaných zvířat a vyjadřovaná počtem miligramů připadajících na 1 kilogram tělesné hmotnosti zvířete. Čím je tedy hodnota LD₅₀ menší, tím je chemikálie jedovatější (Cremlyn, 1974). Toxicitu chemikálií lze tedy podle hodnot LD₅₀ odstupňovat takto:

Tabulka č. 3 Srovnání hodnot toxicity chemikálií

Chemikálie	LD50 (mg.kg)
1. Extrémně toxické	1
2. Vysoce toxické	1 až 50
3. Středně toxické	50 až 500
4. Nepatrně toxické	500 až 5000
5. Prakticky netoxické	5000 až 15000
6. Relativně neškodné	Větší než 15000

Zdroj: Cremlyn, 1974

Tabulka č. 4 Potenciální vystavení organismů vůči přípravku Roundup v různých prostředích

Druh prostředí	Potenciální cílové skupiny	Hlavní cesta kontaktu
Vodní	Mikroorganismy (př. Řasy)	Voda
	Makrofyta (př. Okřehkovité)	Voda
	Bezobratlí (př. Hrotnatka)	Voda
	Ryby (př. Pstruh, slunečnice)	Voda
	Obojživelníci	Voda
Půdní	Půdní mikroorganismy (př. Bakterie, houby)	Půda
	Půdní bezobratlí (př. Žížala)	Půda
Pozemní	Užiteční členovci (Včela medonosná, zlatoočka)	Přímý kontakt
	Necílové rostliny	Naneseno větrem
	Ptáci (př. Křepelka)	Výživa (semena ovoce, hmyz, tkáně)
	Savci (př. Myš)	Výživa (semena ovoce, hmyz, tkáně)

Zdroj: Giesy a kol.,2000

3.2 Střevní mikrobiota zvířat

Střevní mikrobiota tvoří společenství mikroorganismů, které žijí v zažívacím traktu zvířat (Cummings, 1997). Mikrobiální osídlení trávicího traktu patří ontogenicky a fyziologicky k tzv. zevnímu prostředí organismu. Tento mikrobiální systém představuje specificky vyváženou soustavu, kterou lze vhodně označit jako mikrobiální ekosystém, neboť rovnováha je jednou z jejích základních vlastností (Zbořil, 2005). Střevní mikrobiota je také vůbec největší zásobárnou mutualistických mikroorganismů spojených se zvířaty (Cummings, 1997). Prostor gastrointestinálního traktu poskytuje prostředí bohaté na živiny pro mikroorganismy, které jsou velice důležité pro hostitele. Mikroorganismy poskytují savci jako hostiteli tvorbu imunologického prostředí, produkci vitamínů a trávení komplexních sacharidů (Hooper et al, 2002, Cummings, 1984)

Mikroorganismy osídlují trávicí trakt ihned po narození a jsou jeho nezbytnou součástí po celý život. Tvoří rovnovážný komplex mikrobiálního ekosystému tzv. střevní mikroflóru, která je zastoupena nejrůznějšími druhy eukaryot, bakterií, archeí, bakteriofágů, virů a v malém množství i houbami a prvky. Striktně anaerobní bakterie představují největší část tohoto dynamického systému. V zažívacím ústrojí bylo detekováno přes 500 rozdílných bakteriálních druhů (Lupp a Finlay, 2005)

3.2.1 Funkce střevní mikrobioty

Správné mikrobiální osídlení trávicího traktu je velice důležitým faktorem zdraví jak lidského, tak zvířecího. Není pravidlem, že zde nalézáme jen bakterie organismu přínosné. V tělech lidí a živočichů se nalézají také patogenní, neboli tělu škodlivé bakterie. Nyní se ale zaměříme na funkce mikrobioty, kterými bakterie správnému chodu organismu prospívají.

Střevo savců obsahuje obrovské množství bakteriálních buněk, které z daleka převyšují množství buněk hostitele. Dokonce i množství genů, zastoupené v mikrobiální komunitě střev se pohybuje mezi dvěma až čtyřmi miliony, tudíž asi stonásobně převyšuje množství genů u člověka (Backhed a Ley, 2005). Prostřednictvím exprese takto obrovského množství genů, mohou střevní bakterie provádět řadu enzymatických reakcí, které není savčí hostitel schopen katalyzovat. To je důvod proč je střevní mikrobiota považována za „orgán v rámci orgánu“, s vlastními funkcemi. Mezi funkce mikrobioty patří modulace exprese genu, podílejícího se

na opevnění slizniční bariéry, angiogeneze a postnatální střevní zrání. Má také rozhodující roli při podpoře trávení a ovlivňuje zisk a skladování energie přijaté z potravy v hostitelském organismu (Hooper, 2001). Střevní mikrobiota má imunomodulační kapacitu, která ovlivňuje celou řadu signálních drah a moduluje reakce imunitní, zánětlivé a alergické. Nerovnováha střevní mikrobioty nebo odpověď hostitele na její nerovnováhu jsou považovány za patogenezi a mohou být následkem střevních poruch či komplikací (Sharma et al., 2010). Zbořil a kol, (2005) ve své studii popisují střevní mikrobiotu jako receptorovou blokádu, kdy mikrobiota obsadí vazebná místa střevního epitelu, tudíž patogenní organismy se už nemohou k receptorům navázat. V místě osídleném normální slizniční mikrobiotou se může uplatnit jen výrazný patogen, kdežto v nekolonizovaných tkáních může adherovat a množit se i méně virulentní druh. Tento mechanismus samozřejmě nemá vliv na ty mikroorganismy, jež účinkují vlivem svých toxinů.

3.2.2 Střevní mikrobiota drůbeže

Trávicí trakt ptáků není plně osídlen mikroorganismy od samého začátku jeho existence. Barnes a kol., (1972) tvrdí, že během prvních dvou až čtyř dnů je osídleno tenké střevo streptokoky a enterobakteriemi. Po prvním týdnu života mají kuřata v tenkém střevě převahu laktobacilů a později je kolonizováno hlavně anaerobními organismy, mezi které řadíme například zástupce rodu *Bacteroides* a bifidobakterie, přičemž fakultativně anaerobní bakterie se už vyskytují v menším množství. U zdravých slepic je složení mikroflory také popsáno. Byly tam prokázány ve značných množstvích anaerobní i aerobní bakterie, enterokoky, *Escherichie*, plísně a kvasinky (Leittgeb, 1988). Celkové množství mikroorganismů v trávicím ústrojí ptáků kolísá podél celé délky trávicího traktu. Děje se tak díky změnám v kyselosti, množství živin nebo dostupnosti kyslíku, které není v každé části trávicího ústrojí stejné a výrazně se liší. Žaludek a dvanáctník obsahují $10^1 - 10^3$ bakterií /ml, v lačníku a kyčelníku jich najdeme $10^4 - 10^7$ /ml a v tračníku se nachází kolem $10^{11} - 10^{12}$ bakterií/ml (O'Hara a Shanahan, 2006).

3.2.3 Bachorová mikrobiota skotu

Uvnitř bachoru skotu žije přibližně $10^{10} - 10^{11}$ mikroorganismů připadajících na 1 ml bachorové tekutiny. Tyto mikroorganismy jsou především zodpovědné za zde probíhající fermentační procesy. Bachorové organismy hrají také důležitou roli v biotransformaci

komplexních sacharidů na jednodušší cukry (Dijkstra et al., 2005). Dalšími důležitými funkcemi probiotických bakterií u skotu jsou prevence a boj proti zažívacím poruchám (především průjem u hospodářských zvířat během laktace). Dále ovlivňují předžaludkový metabolismus živin a stimulují činnost předžaludkových mikroorganismů, které pomáhají udržovat zdraví, zlepšovat produktivitu a výkon (Phillips, 1985).

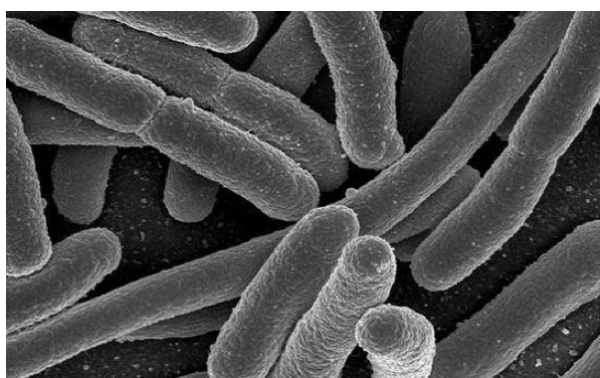
3.3 Mikroorganismy osídlující trávicí trakt

3.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je v současnosti pravděpodobně nejznámějším a nejvíce prozkoumaným mikrobem (Votava a kol. 2003). Patří do domény *Bacteria*, kmene *Proteobacteria*, třídy *Gamaproteobacteria*, řádu *Enterobacteriales*, čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Escherichia*. (Sedláček 2007). Jedná se o gramnegativní, nesporulující fakultativně anaerobní bakterii, která je obyvatelem střev a fekálií teplokrevných zvířat a plazů (Berg, 1996). Bakterie se nalézají ve střevní mikrobiotě, která se skládá z více než 500 druhů bakterií. Také je často používána jako indikátor fekálního znečištění vody (Savageau, 1983). Její buňky jsou tvaru tyčinek asi 2,0 µm dlouhé a 0,25 – 1 µm v průměru (Kubitschek, 1990).

Zpočátku byly tyto bakterie považovány za nepatogenní organismy. Avšak v roce 1940 byly kmeny této bakterie identifikovány ve spojení s průjmem u dětí (Bray, 1945). Patogenní druhy *E. coli* můžeme rozčlenit podle klinických příznaků do několika kategorií. *E. coli* je jedním z nejčastějších původců průjmů u dětí, ale také způsobuje infekce urogenitálního traktu, sepsí a meningitidy nebo střevních – průjmových onemocnění (Votava a kol., 2003).

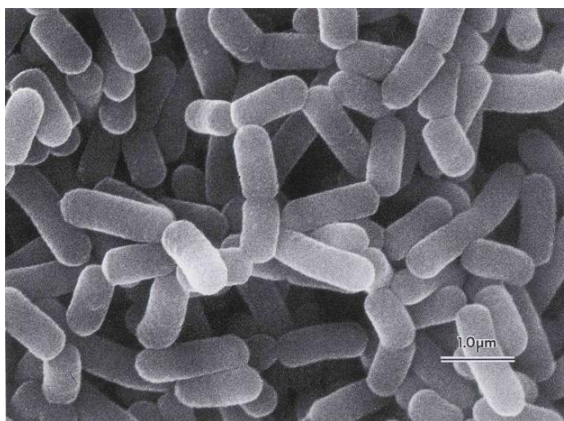
Ve střevech se *E. coli* vyskytuje nejčastěji jako symbiotický organismus, kde se účastní syntézy některých vitamínů (především vitamínu K). Tato bakterie inhibuje svou přítomností ostatní patogeny v adhezenci na povrch slizničního epitelu. Jejich růst zabraňuje syntézou mikrocinů a kolicinů (Madigan et al., 2012).



Obr. 1. *Escherichia coli*
www.columbiariverkeeper.org

3.3.2 Rod *Lactobacillus*

Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou grampozitivní bakterie, patřící mezi *Firmicutes* (Reiss, 2013), které se vyskytují běžně v prostředí souvisejícím s potravinami jako je víno, mléko, maso, ovoce, zelenina či obiloviny a jsou často využívány jako startovací kultury pro kvasné procesy (Zhang et al., 2011). V současné době tvoří největší skupinu bakterií mléčného kvašení. Tento rod čítá více než 120 druhů a 20 poddruhů (Kun Lee a Salminen, 2009). Navíc někteří zástupci rodu *Lactobacillus* jsou přirozeně spojovány s povrchem sliznice v trávicím traktu, vaginální a ústní dutině člověka a zvířat (Tannock, 2003). Krejsek a kol., (2007) tvrdí, že bakterie rodu *Lactobacillus* se kromě střevního traktu vyskytují i ve volné přírodě a v důsledku toho jsou i častou součástí potravy. U člověka jsou dominantní populací v proximální části tenkého střeva. Bylo popsáno celkem asi 128 druhů rodu *Lactobacillus*, ze kterých je pouze několik využíváno pro své probiotické vlastnosti. Opět jsou považovány za bezpečné s výjimkou *Lactobacillus rhamnosus*, jehož aplikace u imunokompromitovaných osob je některými autory označována za diskutabilní, na druhou stranu vykazuje oproti jiným probiotickým kulturám lepších výsledků terapii mnoha onemocnění.



Obr. 2. *Lactobacillus Casei*
www.buffalobeerbiochemist.com

3.3.3 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobacterium je rod anaerobních, gram-pozitivních nesporulujících bakterií, podílejících se na výrobě kyseliny mléčné. Bifidobakterie byly poprvé objeveny a izolovány z výkalů kojeného dítěte v roce 1899. Jedná se o běžné složky domorodého mikrobiální flóry ve střevním traktu člověka.



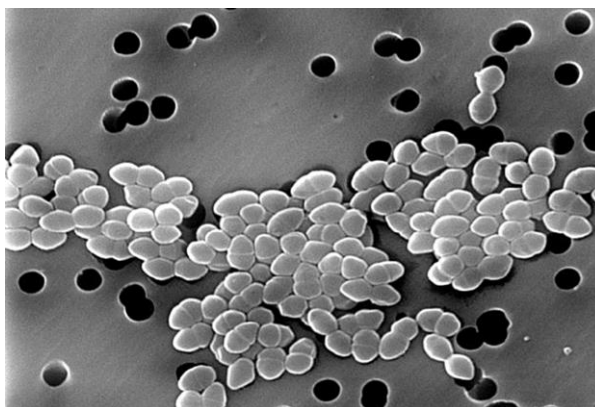
Obr. 3. Zástupce rodu *Bifidobacterium*
<http://www.probiotic-cn.com>

Co se týče struktury buňky, zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou tyčinky o velikosti 0,5 - 0,8 x 2,0 - 8,0 μm , velmi různorodých tvarů, obvykle mírně zakřiveného až kyjovitého tvaru, velmi často ztloustlé či větvené. Jsou uspořádány jednotlivě, do seskupení ve tvaru písmena „V“, občas v řetězcích, palisádách nebo růžicích. Místy tyto bakterie vykazují ztloustlé kokovité tvary (Ventura a kol., 2004)

Některé kmeny rodu *Bifidobacterium* jsou považovány za důležitá probiotika používaná v potravinářském průmyslu. Různé druhy a kmeny rodu *Bifidobacterium* mohou imponovat řadou prospěšných účinků na zdraví, včetně regulace střevní mikrobiální homeostázy, inhibice patogenů a škodlivých bakterií, které kolonizují, případně napadají střevní sliznici. Dále se mohou účastnit produkce vitamínů či konverze řady sloučenin do bioaktivních molekul (Mayo et. Sinderin, 2010). Další důležitou funkcí Bifidobakterií je produkce kyseliny octové a mléčné z fermentovaných sacharidů v poměru 2:3 (Görner a Valík, 2004).

3.3.4 Rod *Enterococcus*

Zástupci rodu *Enterococcus* jsou grampozitivní, nesporulující a fakultativně anaerobní bakterie nacházející se v intestinálním traktu lidí a zvířat (Burdychová, 2007). Těmto bakteriím se velice dobře daří v prostředí bohatém na živiny a malé množství kyslíku, jaký intestinální trakt poskytuje. Avšak při vyloučení ze střevních hostitelů jsou snadno k nalezení i v prostředí (Mundt, 1963).



Obr. 4. Bakterie rodu *Enterococcus*
www.upload.wikimedia.org

Rod *Enterococcus* se skládá z více než 40 ekologicky rozlišných druhů (Jett et al., 1994), vyskytují se jako saprofyty a kmenzálové trávicího ústrojí člověka a zvířat. Saprofyty jsou organismy využívající ke svému životu rozkládající se části jiného organismu, nebo jeho výměšků aniž by mu tím způsobil poškození. Kmenzálové jsou organismy žijící v blízkém vztahu k jinému organismu, aniž by mu působily škodu (Komprda, 2007).

3.3.5 Rod *Clostridium*

Clostridium, je rod tyčinkovitých, nejčastěji grampozitivních sporulujících bakterií, ať už pohyblivých či nepohyblivých. Obvykle se nacházejí v půdě, vodě a intestinálním traktu lidí a jiných živočichů. Většina druhů tohoto rodu má kulovité nebo oválné spory, které často roztahují buňku. Tyto spory jsou velice odolné vysokým teplotám, procesu vysušení, toxickým chemikáliím a detergentům (Jay et al., 2005). Pro člověka mají význam jako producenti hospodářsky využitelných metabolitů. Jen několik málo druhů je schopno vyvolat infekční onemocnění u lidí a zvířat prostřednictvím četných exotoxinů proteinové povahy (Bednář et. al, 1999)

Někteří zástupci rodu *Clostridium* se podílejí na máselném kvašení, tedy anaerobním rozkladu cukrů nebo kyseliny mléčné na kyselinu máselnou. Dále vzniká oxid uhličitý a

vodík. Mezi druhy klostridií účastnících se produkce kyseliny máselné řadíme *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* a *C. aurantibutyricum* (Jones a Woods, 1986).



Obr. 5. Zástupce rodu *Clostridium*
<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Clostridium>

4 Materiál a metody

4.1 Pokus č. 1 – Mikrobiologický rozbor stolice krávy

4.1.1 Odběr vzorků a kultivace

K našemu výzkumu byl použit vzorek odebraný z čerstvých výkalů krávy chované ve stájích na pozemku ČZU.

0,1 mg čerstvých výkalů bylo inokulováno do připravených zkumavek obsahující kompletní živný bujón (Wilkins-Chalgren) pro kultivaci anaerobních mikroorganismů a dávku Round-upu uvedenou v následující tabulce:

Tabulka č. 5 Koncentrace glyfosátu ve vzorku (mg/mL)

Vzorek	Glyphosate (mg/mL)
C	0
0	17
1	1,7
2	0,17
3	0,017
4	0,0017
5	0,00017

Následně byly zkumavky ponechány 24 h při 37 °C v inkubátoru a poté byl proveden rozbor.

4.1.2 Mikrobiologický rozbor

4.1.2.1 Příprava a složení kultivačních médií

Živné médium Wilkins - Chalgren bujón (Oxoid) s přidavkem sójového peptonu

Univerzální tekuté pěstební prostředí pro kultivaci celkových počtů anaerobních bakterií. Hodnota pH je $7,1 \pm 0,2$

Tabulka č. 6 Složení živného média Chalgren bujón (Oxoid)

Složení	Množství ve 100 ml
Trypton	10g
Pepton	10g
Kvasniční extrakt	5g
Pyruvát sodný	1g
Menadion	0,0005g
Hemin	0,005g

Tabulka č. 7 Přidání sójového peptonu, cysteinu a tweenu ke 33 g Wilkins – Chalgren bujónu

Složení	Množství ve 100 ml
Sójový pepton	0,5g
Cystein	0,05g
Tween	0,1ml

Wilkins-Chalgren anaerobe agar (Oxoid) s přidavkem sójového peptonu a mupirocinu (100 mg/L) a ledové kyseliny octové (1mL/L)

Živné médium pro stanovení rodu *Bifidobacterium* s přidáním antibiotika Mupirocinu a ledové kyseliny octové Rada podle Rady a Petra (2000)

Tabulka č. 8 Složení živného média Wilkins-Chalgren anaerobe agar (Oxoid) s přidavkem sójového peptonu a mupirocinu (100 mg/L) a ledové kyseliny octové (1 mL/L)

Složení	Množství ve 100 ml
Wilkins-Chalgren agar	4,3 g
Sójový pepton	0,5 g
Cystein	0,05 g
Tween	0,1 ml
Muciprocín	0,01 g
Ledová kyselina octová	0,1 ml

Rogosa agar s přidavkem ledové kyseliny octové (1,32ml/l)

Živné médium pro kultivaci rodu *Lactobacillus*

Tabulka č. 9 Složení živného média Rogosa agar s přidavkem ledové kyseliny octové (132 ml/l)

Složení	Množství ve 100 ml
Trypton	10 g
Glukóza	20 g
Kvasniční extrakt	5 g
Tween 80	1 ml
Octan sodný	17 g
Citran amonný	2 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	6 g
Síran hořečnatý	0,575 g
Síran manganatý	0,12 g
Síran železitý	0,034 g
Agar	20 g

Po rozvaření při 80-90°C upravuje pH agaru kyselinou octovou z pH 6,2 na pH 5,4.

Slanetz-Bartley agar

Živné médium pro kultivaci rodu *Enterococcus*. Hodnota pH je $7,2 \pm 0,2$

Tabulka č. 10 Složení živného média Slanetz-Bartley agar

Složení	Množství
Tryptóza	20 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukóza	2 g
Hydrogenfosforečnan sodný	4 g
Azid sodný	0,4 g
Tetrazoliumchlorid	0,1 g
Agar	10 g

Trypton Bile X-Glucuronide (TBX) agar

Živné médium pro detekci a stanovení *Escherichia Coli*

Tabulka č. 11 Složení živného média Trypton Bile X-Glucuronide (TBX) agar

Složení	Množství
Pepton z kaseinu	20 g
Žlučové soli	1,5 g
x-β-D glukuronidu	0,075 g
Agar	15 g

Do 100 ml destilované bylo přidáno 3,66g TBX agaru a následně sterilováno v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 15 minut. Následně bylo médium vytemperováno na 50°C a agar byl nalit na sterilní Petriho misky.

4.1.3 Příprava ředící řady a ředění vzorků

K dosažení potřebného naředění vzorku využíváme ředící řady.

Tabulka č. 12 Příprava ředící řady

Přísady	Množství
Trypton	4,5 g
Nutrient broth	4,5 g
Kvasniční extrakt	2,5 g
Tween	0,45 g
Cystein	0,225 g

Nakultivované vzorky byly ředěny decimálním ředěním až do hodnot 10^{-9} původního počtu bakterií.

4.1.4 Inokulace živné půdy a kultivace

Po zaočkování bylyisky zality živnou půdou, krouživým pohybem promíchány a dnem vzhůru uloženy do anaerostatu. Z anaerostatu byl odčerpán kyslík a jeho vnitřní prostředí nahrazeno jinými plyny. Vzduchotěsně uzavřené anaerostaty s řízenou atmosférou byly dále uloženy do termostatu, kde dochází ke kultivaci při 37°C po dobu 48 hodin. Petriho misky určené ke kultivaci rodu *Lactobacillus*, byly po zatuhnutí znovu přelity vrstvou živného média k vytvoření mikroaerofilního prostředí. Následně byly uloženy do termostatu ke kultivaci.

Tabulka č. 13 Podmínky kultivace jednotlivých rodů

Typ	Živné médium	Teplota kultivace	Čas kultivace	Prostředí kultivace
Celkové počty	Wilkins-Chalgren anaerobe agar	37 °C	48 hodin	Anaerobně
Rod <i>Bifidobakterium</i>	Wilkins-Chalgren anaerobe agar	37 °C	48 hodin	Anaerobně
Rod <i>Lactobacillus</i>	Rogosa agar	37 °C	48 hodin	Mikroaerofilně
Rod <i>Enterococcus</i>	Slanetz-Bartley agar	37 °C	48 hodin	Aerobně
<i>E. coli</i>	T.B.X. agar	37 °C	24 hodin	Aerobně
Koliformní bakterie	T.B.X. agar	37 °C	48 hodin	Aerobně

4.1.5 Vyhodnocení počtu kolonií

Pro vyhodnocení počtu kolonií bylo využito deskové metody, kdy byly vždy dva reprezentativní vzorky po sobě následujících ředění spočítány. Získaná data byla zapsána do tabulky a použita v následujícím vzorečku.

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

P1,P2 – Počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počítatelných plotnách. Pokud máme jen jedno ředění, tak nedělíme 11, ale 1.

F – Převrácená hodnota vyššího ředění ($10^5, \dots$)

KTJ – kolonie tvořící jednotka

Výsledné číslo zlogaritmujeme a získáme počet kolonií v 1 ml vzorku.

4.1.6 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu Statgraphics Centurion XV (StatPoint, Warrenton, VA, USA). Byla použita analýza rozptylu při jednoduchém třídění ANOVA a analýza lineární regrese a korelace.

4.2 Pokus č. 2 – Růstové křivky

Pro měření růstových křivek byl použit přístroj McFarland denzitometr (DEN-1B), schopný detekovat měnící se stupně zákalu (turbidity). Pro měření byly dodány bakteriální kmeny rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* a *Escherichia coli* ze sbírkových kultur Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, České zemědělské univerzity v Praze.

Tabulka č. 14 Použité bakteriální kmeny a jejich původ

Číslo	Kmen	Původ
1.	<i>Lactobacillus</i> sp.	Prase (tenské střevo)
2.	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Kuře
3.	<i>Lactobacillus</i> sp.	Kuře
4.	<i>Lactobacillus murinus</i>	Kuře
5.	<i>Clostridium</i> sp.	Tele
6.	<i>Clostridium</i> sp.	Tele
7.	<i>Lactobacillus</i> sp.	Tele
8.	<i>Lactobacillus</i> sp.	Tele
9.	<i>Lactobacillus</i> sp.	Tele
10.	<i>Escherichia coli</i>	Tele
11.	<i>Escherichia coli</i>	Tele
12.	<i>Clostridium</i> sp.	Kůzle
13.	<i>Clostridium</i> sp.	Kůzle
14.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Tele
15.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Tele
16.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Tele
17.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Tele
18.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Kůzle
19.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Koza
20.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Koza
21.	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Tele
22.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Tele
23.	<i>Bifidobacterium</i>	Tele

4.2.1 Příprava a složení kultivačních médií

Tabulka č. 15 Koncentrace glyfosátu ve vzorku (g/L)

Vzorek	Glyfosát (g/L)
C	0
1	17
2	1,7
3	0,17

Tabulka č. 16 Kultivační médium Wilkins - Chalgren bujón se sojovým peptonem (W + sp)

Destilovaná voda	1000 ml
Trypton	10 g
Pepton	10 g
Kvasniční extrakt	5 g
Chlorid sodný	5 g
Pyruvát sodný	1 g
L - arginin	1 g
Glukosa	1 g
Haemin	0,005 g
Menadione	0,0005 g

Tabulka č. 17 Látky přidávané ke 33,0 g Wilkins - Chalgren bujónu

Soja pepton	5 g
L - cystein	0,5 g
Tween 80	1 ml

4.2.2 Postup měření

Naočkované zkumavky se vzorky o daných koncentracích byly vloženy do vodní lázně o konstantní teplotě 37 °C. Po té byly v daných časových intervalech pravidelně vyjímány, sušeny, aby nedocházelo ke zkreslování naměřených výsledků díky ulpívajícím kapkám vody na povrchu a vkládány do přístroje McFarland Denzitometr (DEN-1B). Po zjištění a zapsání hodnoty na přístroji byly zkumavky opět vkládány do vodní lázně. Poslední měření proběhlo 24 hodin po začátku měření.

4.2.3 Výpočty

Růstové křivky

Naměřené hodnoty optické density při 600 nm byly převedeny na CFU/mL vynásobením hodnotou 3 000 000. Hodnoty CFU/mL byly použity na tvorbu grafů.

Specifické růstové rychlosti

Dále byla spočítána specifická růstová rychlost (μ) podle vzorečku:

$$\mu = (\ln x * 100) - (\ln x_0 * 100) / (t - t_0)$$

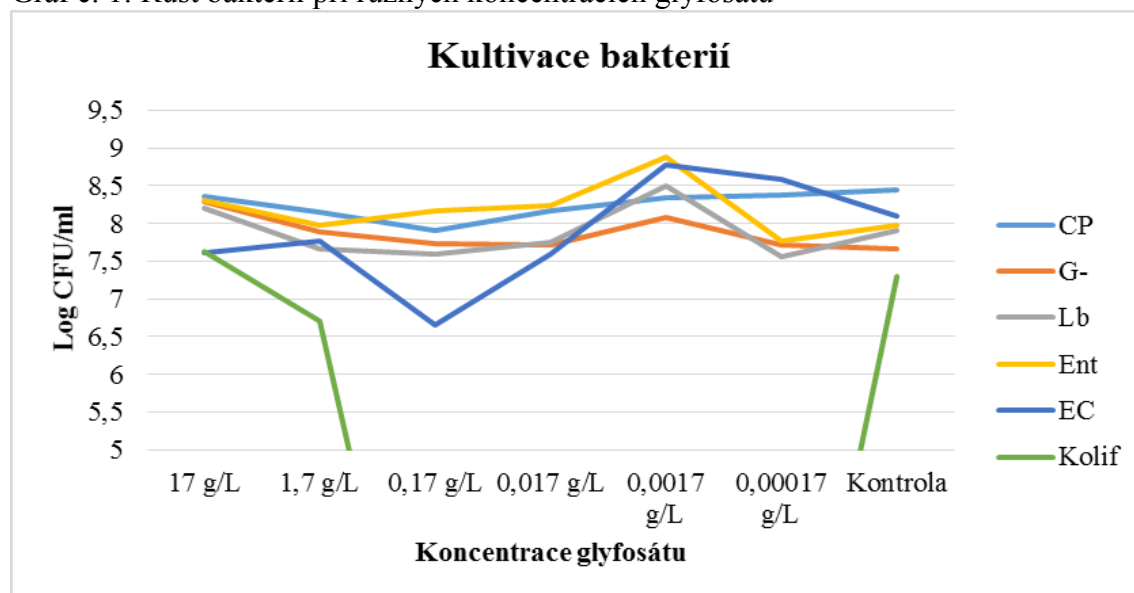
Kde x je větší naměřená hodnota zlogaritmované OD bakterií, x_0 je hodnota menší. τ je doba (v hodinách), ve které byla odečtena hodnota x a τ_0 je doba při odečtení hodnoty x_0

5. Výsledky

5.1 Účinek glyfosátu na bakterie kravského výkalu

Vybrané bakteriální druhy střevní mikrobioty hovězího skotu, byly kultivovány na živných médiích a byl sledován jejich růst při různých koncentracích glyfosátu. Graf č. 1 znázorňuje hodnoty CFU/mL pro různé skupiny bakterií v závislosti koncentraci glyfosátu. Nejvyšší koncentrace glyfosátu ve vzorku odpovídá 17 g/L a nejnižší 0,00017 g/L. Rozpětí hodnot log CFU/ml je v tomto grafu 5 až 9,5.

Graf č. 1: Růst bakterií při různých koncentracích glyfosátu



Kultivovány a následně vyhodnoceny byly rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* a *Bifidobacterium*, dále celkové počty bakterií, gramnegativní a koliformní bakterie. Nárůst ve všech hodnotách koncentrace glyfosátu byl zaznamenán u všech skupin kromě rodu *Bifidobacterium* a koliformních bakterií. Anaerobní bakterie rodu *Bifidobacterium* nenarostly ani při jedné koncentraci glyfosátu, tudíž nejsou v grafu ani zaznamenány. Koliformní bakterienarostly pouze v hodnotách koncentrace glyfosátu 17 g/L, 1,7 g/L a v kontrolním vzorku. Jejich hodnoty log CFU/mL však dosahovaly mírně nižších čísel než hodnoty CFU/mL u ostatních narostlých skupin.

Největší nárůst byl zaznamenán u rodu *Enterococcus* při koncentraci glyfosátu 0,0017 g/L a dosáhl 8,88 log CFU/mL. Při této koncentraci glyfosátu byl také největší nárůst u rodu

Lactobacillus, který dosáhl 8,49 log CFU/mL a *E.coli*, kde byla nejvyšší hodnota 8,78 log KTJ/ml. Naopak nejmenší nárůst byl v koncentraci 0,17 g/L, kde nejnižší hodnota log CFU/mL byla 6,66 u rodu *E. coli*. Při této koncentraci zaznamenaly nejnižší nárůst také celkové počty bakterií, kde hodnota log CFU/mL klesla pod hodnotu 8.

5.1.1 Statistické vyhodnocení

Koncentrace glyfosátu	n	Průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient	Minimum	Maximum
17 ^{b,c}	5	8,15	0,30	3,78%	7,61	8,36
1,7 ^{a,b}	5	7,89	0,18	2,36%	7,67	8,15
0,17 ^a	5	7,61	0,57	7,509%	6,66	8,16
0,017 ^{a,b}	5	7,89	0,29	3,64%	7,6	8,23
0,0017 ^c	5	8,51	0,32	3,82%	8,08	8,88
0,00017 ^{a,b}	5	7,99	0,45	5,66%	7,56	8,59
Kontrola ^{a,b}	5	8,01	0,28	3,56%	7,66	8,44

Tabulka č. 18 Výsledky kultivace kravských střevních bakterií na různých koncentracích glyfosátu. Hodnoty jednotlivých skupin bakterií byly sečteny a porovnány jednofaktorovou analýzou rozptylu ANOVA. Horní indexy značí statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly mezi jednotlivými skupinami.

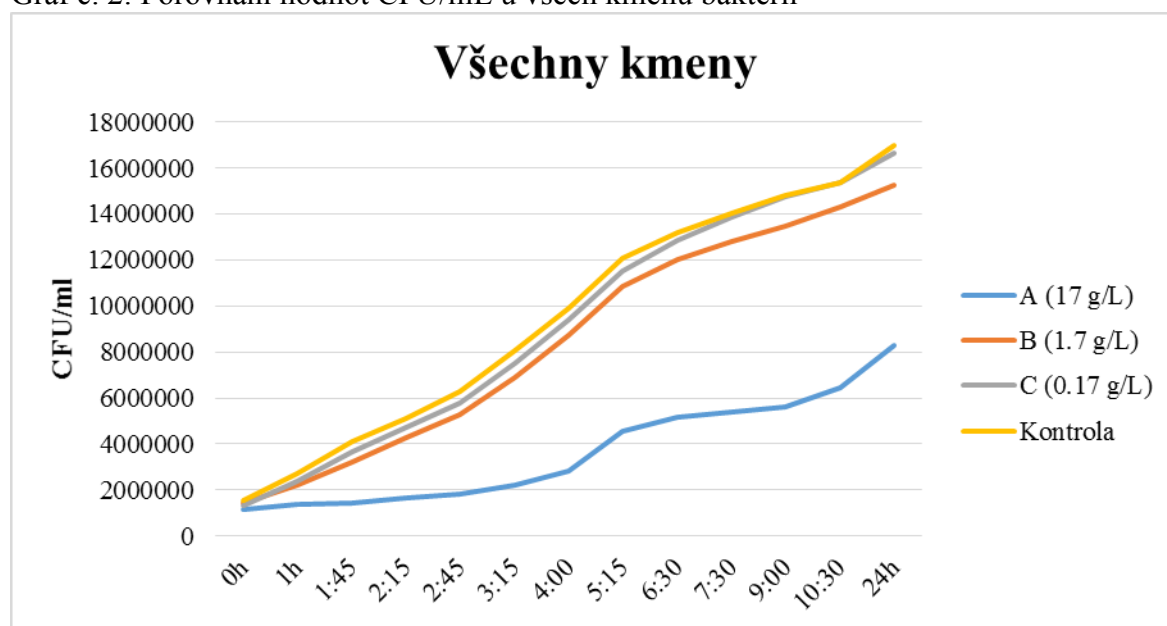
Dále byla pomocí analýzy lineární regrese a korelace ověřena závislost množství bakterií ve vzorcích na koncentraci glyfosátu. Nebyla nalezena žádná korelace mezi koncentrací glyfosátu a množstvím bakterií ve vzorcích ($P = 0,66$), korelační koeficient je roven 0,20.

5.2 Účinek glyfosátu na čisté izoláty z trávicích traktů hospodářských zvířat

5.2.1 Výsledky růstu jednotlivých kmenů bakterií

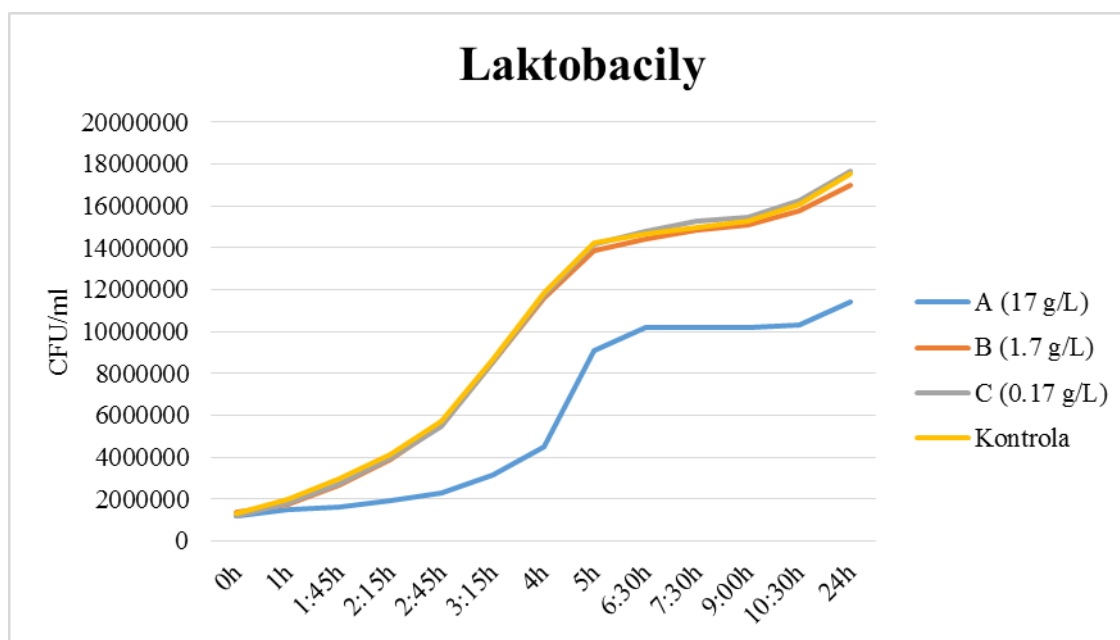
Z naměřených hodnot optické density při 600 nm byla data nejdříve přepočítána z McFarlandovy zákalové stupnice na hodnoty CFU/mL. Na základě hodnot CFU/mL byly vypracovány grafy porovnávající hodnoty bakteriálních kmenů a samostatných živočichů v jednotlivých koncentracích glyfosátu.

Graf č. 2: Porovnání hodnot CFU/mL u všech kmenů bakterií



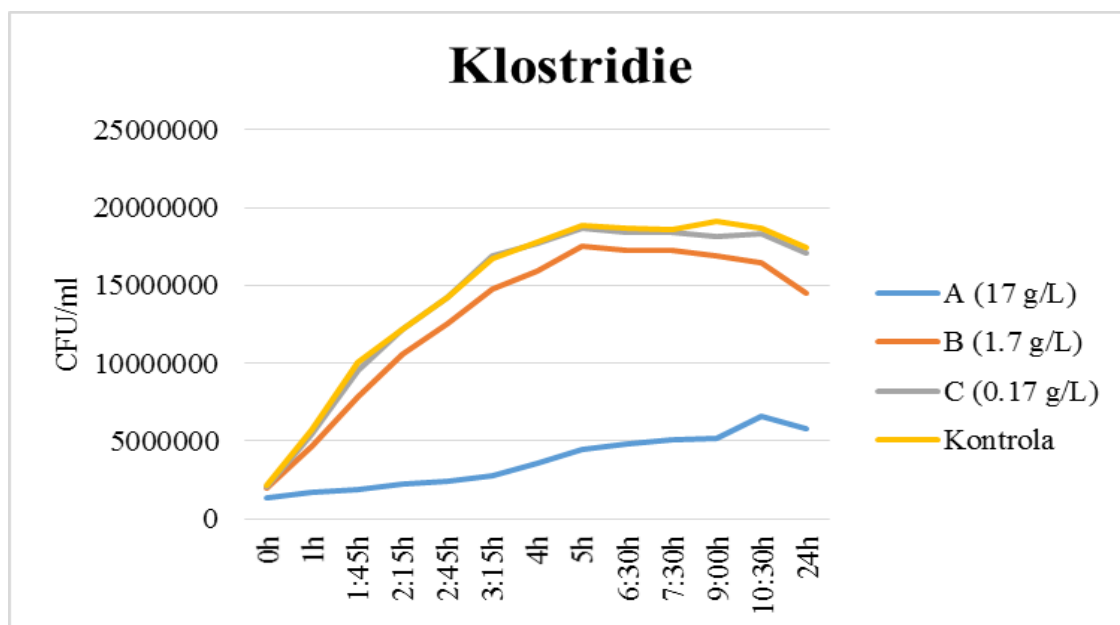
Nejvyšší nárůst můžeme sledovat u kontrolního vzorku, jehož největší hodnota dosahuje při 24 hodinách hodnoty vyšší $1,6 \cdot 10^7$ CFU/ml. Oproti tomu vzorek s nejvyšší koncentrací glyfosátu dosahuje ve svém maximu poloviční hodnot. Vzorky o koncentracích glyfosátu 1,7 g/L a 0,17 g/L dosahují nižších hodnot než kontrolní vzorek avšak není mezi nimi statisticky významný rozdíl.

Graf č. 3: Porovnání hodnot CFU/mL u zástupců rodu *Lactobacillus*



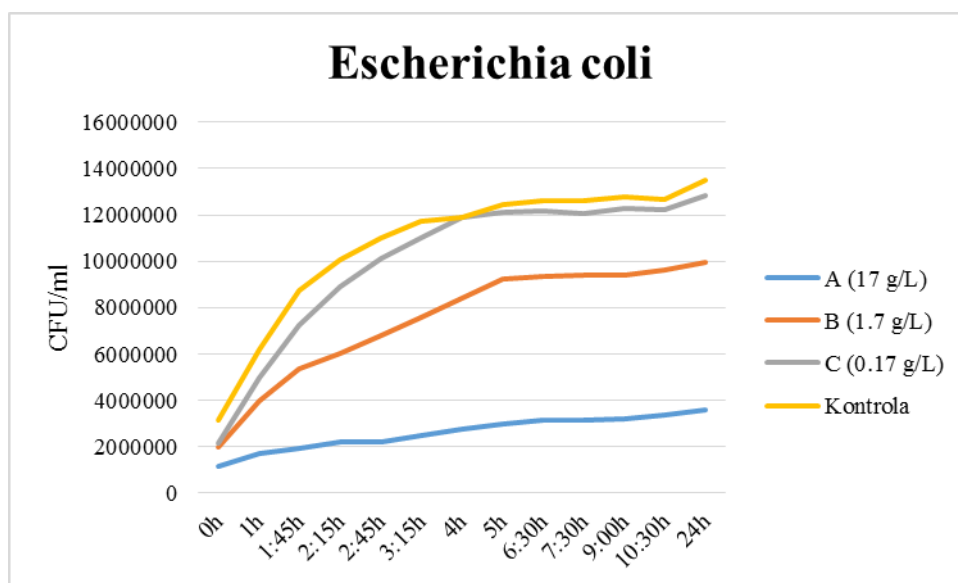
Podobně jako u grafu č.2 můžeme pozorovat nejnižší nárůst vzorků o nejvyšší koncentraci glyfosátu. Vzorky o nižších koncentracích a kontrolní vzorek narostly téměř stejně. Jejich nejvyšší hodnoty dosahují $1,76 \cdot 10^7$ CFU/ml, což je o něco více než u průměrných hodnot všech kmenů.

Graf č. 4: Porovnání hodnot CFU/mL u zástupců rodu *Clostridium*



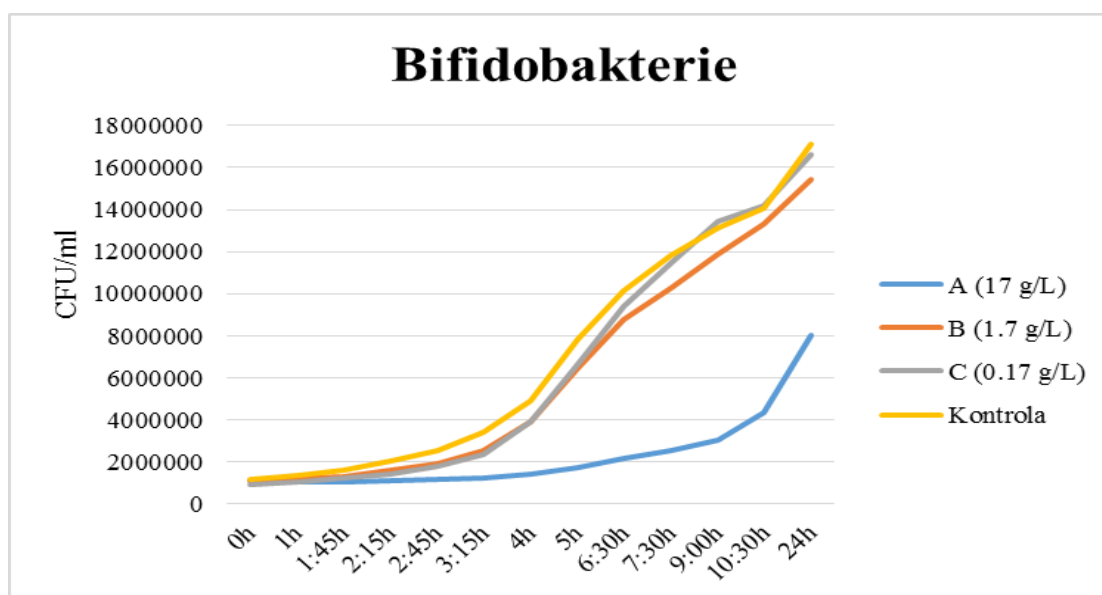
V grafu č. 4 byl opět zaznamenán znatelně nízký nárůst bakterií při koncentraci glyfosátu 17g/L. Nejvyšší zaznamenaná hodnota u této koncentrace činila $6,6 \cdot 10^6$ CFU/ml. Nárůst u této koncentrace je znatelně nižší než v předchozích dvou grafech. Oproti tomu kontrolní vzorek, úzce korelující se vzorkem obsahující nejnižší koncentraci glyfosátu dosahují až $1,91 \cdot 10^7$ CFU/ml, což je zatím nejvyšší průměrná hodnota, která byla zaznamenána. Na rozdíl od předchozích grafů se všemi kmeny a laktobacily má vzorek s koncentrací glyfosátu 1,7g/L mírnější vzestup růstu než u vzorku s koncentrací glyfosátu 0,17g/L a kontrolního vzorku.

Graf č. 5: Porovnání hodnot CFU/mL u zástupců rodu *Escherichia coli*



V grafu č. 5 opět narostl kontrolní vzorek nejvíce, avšak oproti předchozím bakteriím hodnoty CFU/ml kontrolního vzorku dosahují nižších hodnot. Nárůst zaznamenaný po 24 hodinách byl u kontrolního vzorku $1,34 \cdot 10^7$ CFU/ml a u vzorku s koncentrací glyfosátu 0,17g/L $1,28 \cdot 10^7$ CFU/ml. Vzorek s koncentrací glyfosátu 1,7 g/L již tolik nenarostl a jeho nejvyšší hodnota jen mírně přesahuje $1 \cdot 10^7$ CFU/ml. Nejméně opět vyrostl vzorek s vysokou koncentrací glyfosátu.

Graf č. 6: Porovnání hodnot CFU/mL u zástupců rodu *Bifidobacterium*

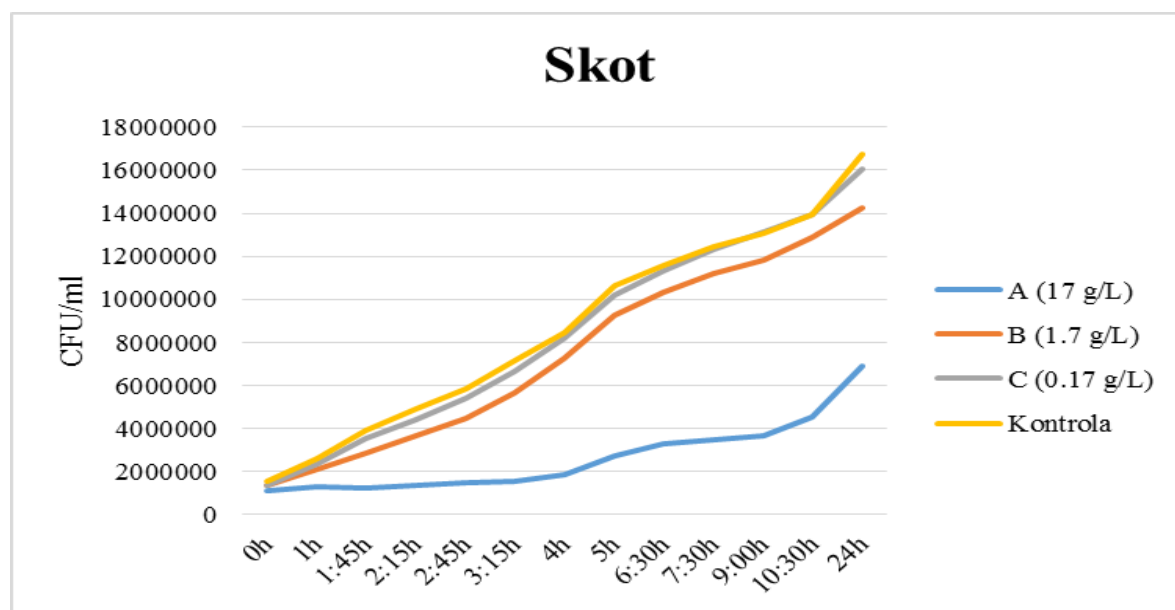


Z grafu č.6 můžeme u vzorků bifidobakterií s koncentrací 0,17 g/L, 1,7 g/L a kontrolního vzorku pozorovat oproti předchozím grafům prudký nástup růstu až po 4. hodině. Vzorky o těchto třech koncentracích glyfosátu vyrostly do podobných hodnot, které se pohybují v rozmezí $1,5 \cdot 10^7$ – $1,7 \cdot 10^7$ CFU/ml. Nejvíce koncentrovaný vzorek narostl nejméně a jeho nejvyšší hodnota CFU/ml mírně přesahuje hranici $8 \cdot 10^6$. Nárůst bakterií při této koncentraci glyfosátu začal prudce stoupat mezi 10. a 24. hodinou měření.

5.2.2 Výsledky růstu bakterií u jednotlivých zvířat

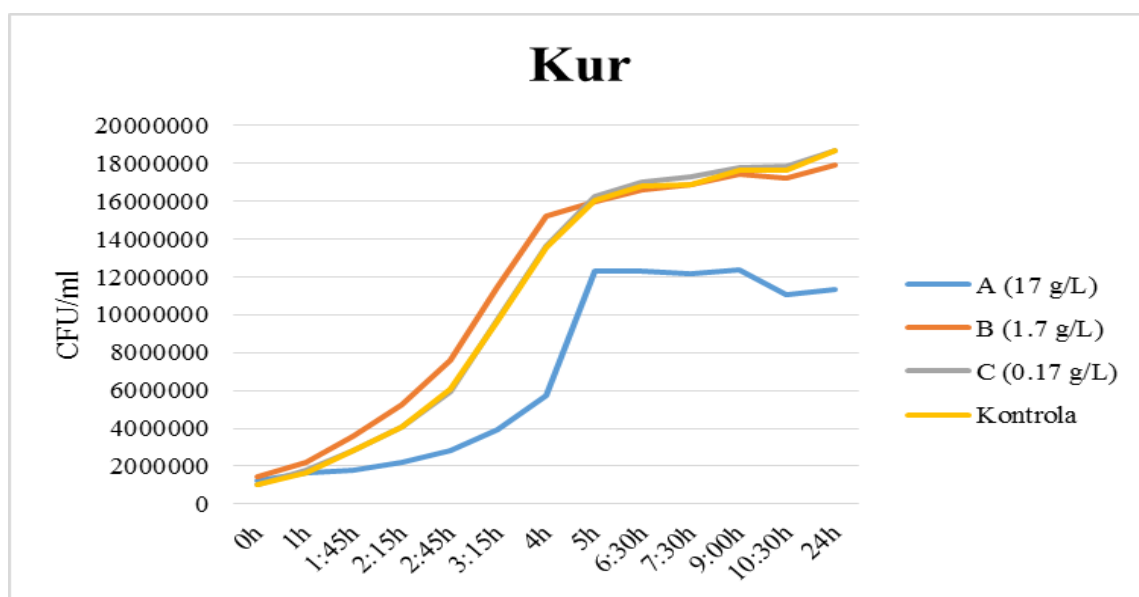
Na následujících grafech budou znázorněny růstové křivky střevních bakterií u jednotlivých zvířat, z jejichž výkalů byly vzorky izolovány. Dané grafy znázorňují průměrné hodnoty CFU/ml zástupců vždy jednoho druhu. Původ a rozčlenění jednotlivých bakteriálních kmenů viz Tabulka č. 15.

Graf č. 7: Růstové křivky střevních bakterií telete



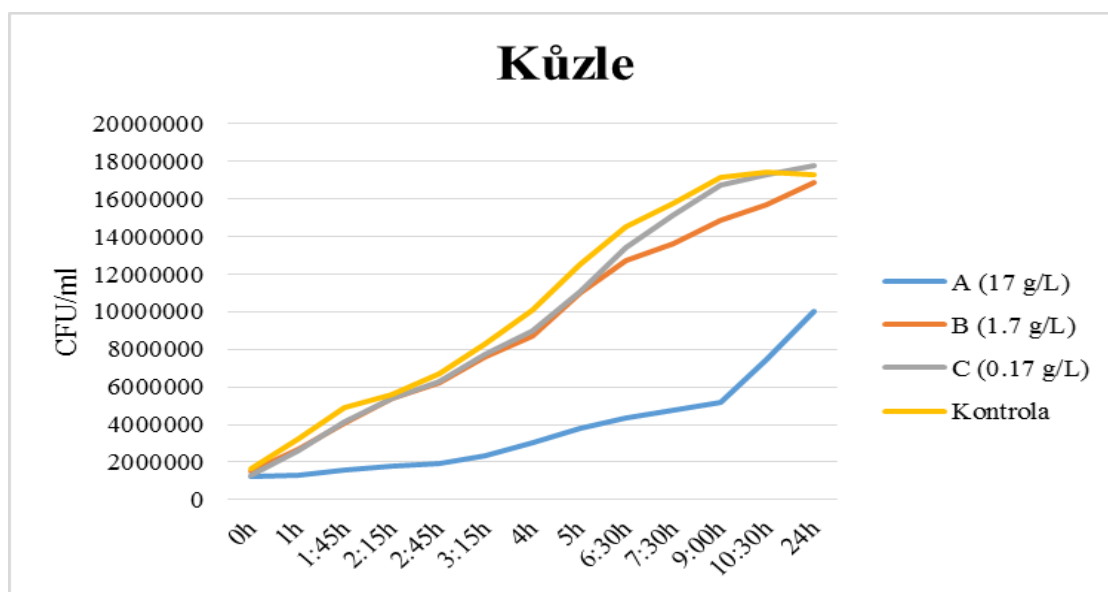
U střevních bakterií telete dosáhly nejvyšších hodnot CFU/ml bakterie kontrolního vzorku a vzorku s nejmenší koncentrací glyfosátu. Křivky těchto dvou koncentrací jsou zcela totožné, avšak v konečné fázi růstu dosáhl kontrolní vzorek mírně vyšších hodnot. Nejvyšší dosahující hodnota CFU/ml u čistého vzorku je $1,67 \cdot 10^7$ a u vzorku o koncentraci glyfosátu 0,17 g/L $1,60 \cdot 10^7$. U vzorku o koncentraci 1,7 g/L byl nárůst menší, avšak jeho nejvyšší hodnota je $1,42 \cdot 10^7$ CFU/ml. Nejméně narostly bakterie ve vzorku o nejvyšší koncentraci glyfosátu. Křivka na Grafu č. 6 naznačuje, že jejich mírný růst započal až na 4. hodině měření.

Graf č. 7: Růstové křivky střevních bakterií u kura



U střevních bakterií kura bylo dosaženo vysokých hodnot CFU/ml u všech koncentrací. Kontrolní vzorek a vzorky o koncentracích glyfosátu 0,17 g/L a 1,7 g/L narostly nejvíce a jejich maxima se pohybují mezi $1,86 \cdot 10^7$ a $1,87 \cdot 10^7$ CFU/ml. Vzorek o koncentraci glyfosátu 17 g/L ze začátku kultivace prudce narostl a po 6. hodině se jeho nárůst zastavil a hodnota CFU/ml stagnovala na hodnotě $1,2 \cdot 10^7$.

Graf č. 8: Růstové křivky střevních bakterií kůzlete



Z Grafu č. 8, znázorňující růstové křivky střevních bakterií kůzlete můžeme nejvyšší nárůst u vzorků s koncentrací glyfosátu 0,17 g/L a kontrolního vzorku. Nejvyšší hodnoty těchto dvou vzorků přesahují $1,78 \cdot 10^7$ CFU/ml. Křivka vzorku o koncentraci glyfosátu 1,7 g/L při začátku kultivace s předchozími dvěma vzorky úzce koreluje, avšak po 7. hodině kultivace se růst mírně zpomaluje a maximální hodnota CFU/ml je nižší. Vzorek s nejvyšší koncentrací zdaleka tolik nenarostl a jeho maximální hodnota CFU/ml dosáhla $1 \cdot 10^7$.

5.2.3 Statistické vyhodnocení růstových křivek

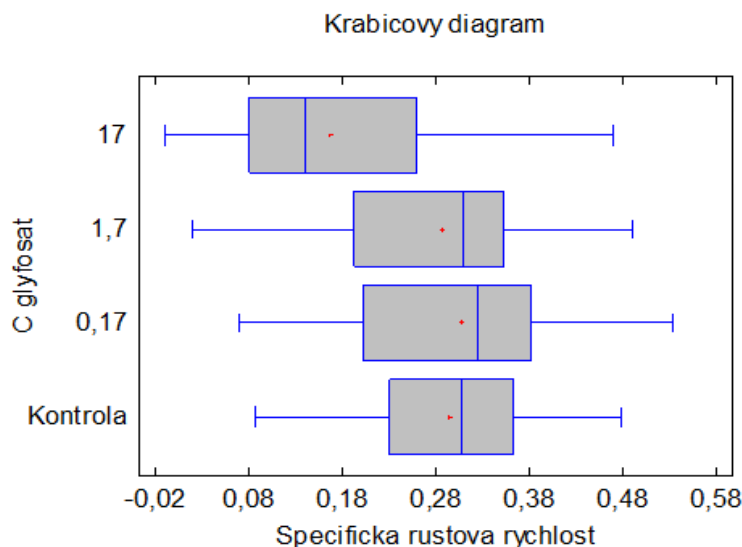
Tabulka č. 19 Popisná tabulka srovnání průměrů všech bakterií a jejich citlivostí na různé koncentrace glyfosátu. Horní indexy u hodnot průměrných specifických růstových rychlostí značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$).

Vzorek	Koncentrace glyfosátu (g/L)	n	Specifická růstová rychlost Průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient	Minimum	Maximum
A	17	23	0,17^a	0,12	70,26%	0,01	0,47
B	1,7	23	0,29^b	0,10	38,07%	0,02	0,49
C	0,17	23	0,31^b	0,11	36,73%	0,07	0,53
Kontrola	0	23	0,29^b	0,10	34,15%	0,08	0,48

Tabulka č. 20 Statistické vyhodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu ($P < 0,01$).

Vzorek	Koncentrace glyfosátu (g/L)	Homogenní skupiny	Průměry a směrodatná odchylka.
A	17	X	$0,17 \pm 0,12$
B	1,7	X	$0,29 \pm 0,10$
Kontrola	0	X	$0,31 \pm 0,11$
C	0,17	X	$0,29 \pm 0,10$

Obr. 6. Krabicový diagram vyznačující specifickou růstovou rychlost při daných koncentracích glyfosátu.



Podle vyhodnocení lineární regrese a korelace zde byla zjištěna korelace mezi koncentrací glyfosátu a specifickou růstovou rychlostí bakterií ($P < 0,01$). Korelační koeficient je roven $-0,99$, jde tedy o silnou závislost. Hodnoty specifické růstové rychlosti jsou tedy nepřímo úměrné koncentraci glyfosátu.

5.2.3.1 Vyhodnocení pro jednotlivé rody

Tabulka č. 21 Popisná tabulka srovnání jednotlivých rodů bakterií a jejich citlivostí na různé koncentrace glyfosátu. Horní indexy u hodnot průměrných specifických růstových rychlostí značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

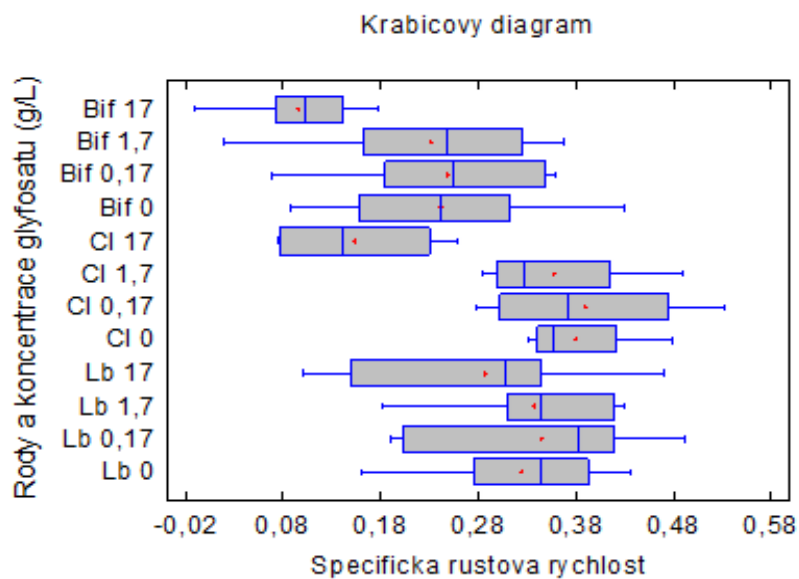
<i>Zástupce</i>	<i>Koncentrac e glyfosátu (g/L)</i>	<i>n</i>	<i>Specifická růstová rychlost Průměr</i>	<i>Směrodatná odchylka</i>	<i>Variační koeficient</i>	<i>Min.</i>	<i>Max.</i>
Bifidobakterie	17	10	0,09^a	0,06	60,38%	0,01	0,17
Bifidobakterie	1,7	10	0,23^{b,c}	0,12	50,29%	0,02	0,36
Bifidobakterie	0,17	10	0,25^{b,c,d,e}	0,10	40,78%	0,07	0,35
Bifidobakterie	0	10	0,24^{b,c,d}	0,10	42,08%	0,08	0,42
Klostridie	17	4	0,15^{a,b}	0,09	59,39%	0,07	0,25
Klostridie	1,7	4	0,36^{d,e,f}	0,09	25,51%	0,28	0,48

Klostridie	0,17	4	0,39^f	0,11	28,79%	0,28	0,53
Klostridie	0	4	0,38^f	0,07	17,46%	0,33	0,47
Laktobacily	17	7	0,29^{c,d,e,f}	0,12	43,23%	0,10	0,46
Laktobacily	1,7	7	0,34^{d,e,f}	0,08	24,47%	0,18	0,43
Laktobacily	0,17	7	0,34^{e,f}	0,11	33,21%	0,19	0,49
Laktobacily	0	7	0,32^{c,d,e,f}	0,09	28,51%	0,16	0,43

Tabulka č. 22 Statistické vyhodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu ($P < 0,05$).

Vzorek	Koncentrace glyfosátu (g/L)	Homogenní skupiny	Průměry a směrodatná odchylka
Bif A	17	X	0,09 ± 0,06
Cl A	17	XX	0,15 ± 0,09
Bif B	1,7	XX	0,23 ± 0,12
Bif Kont	0	XXX	0,24 ± 0,10
Bif C	0,17	XXXX	0,25 ± 0,10
Lb A	17	XXXX	0,25 ± 0,12
Lb Kont	0	XXXX	0,32 ± 0,09
Lb B	1,7	XXX	0,34 ± 0,08
Lb C	0,17	XX	0,34 ± 0,11
Cl B	1,7	XXX	0,36 ± 0,09
Cl Kont	0	X	0,38 ± 0,07
Cl C	0,17	X	0,38 ± 0,11

Obr. 7. Krabicový diagram vyznačující specifickou růstovou rychlost při daných koncentracích glyfosátu u jednotlivých rodů.



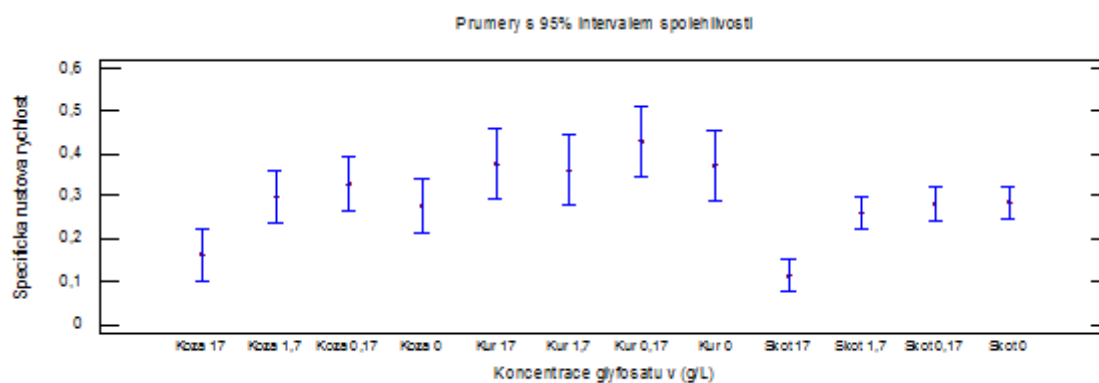
Tabulka č. 23 Popisná tabulka srovnání jednotlivých druhů zvířat a jejich citlivostí na různé koncentrace glyfosátu. Horní indexy u hodnot průměrných specifických růstových rychlostí značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Vzorek	C glyfosátu (g/L)	n	Specifická růstová rychlost Průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient	Minimum	Maximum
Koza	17	5	0,16 ^{a,b}	0,07	43,70%	0,07	0,26
Koza	1,7	5	0,30 ^{c,d}	0,13	43,26%	0,17	0,49
Koza	0,17	5	0,33 ^{c,d}	0,14	44,18%	0,18	0,53
Koza	0	5	0,28 ^{b,c}	0,07	26,86%	0,20	0,36
Kur	17	3	0,37 ^{c,d}	0,08	22,73%	0,31	0,47
Kur	1,7	3	0,36 ^{c,d}	0,05	14,67%	0,32	0,41
Kur	0,17	3	0,43 ^d	0,06	13,10%	0,38	0,49
Kur	0	3	0,37 ^{c,d}	0,02	6,71%	0,34	0,39
Skot	17	14	0,11 ^a	0,08	69,21%	0,01	0,32
Skot	1,7	14	0,26 ^{b,c}	0,11	42,12%	0,02	0,43
Skot	0,17	14	0,28 ^c	0,09	34,49%	0,07	0,41
Skot	0	14	0,28 ^c	0,12	41,01%	0,09	0,47

Tabulka č. 24 Statistické vyhodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu ($P < 0,05$).

Vzorek	Koncentrace glyfosátu (g/L)	Homogenní skupiny	Průměry a směrodatná odchylka.
Skot	17	X	$0,11 \pm 0,8$
Koza	17	XX	$0,16 \pm 0,07$
Skot	1,7	XX	$0,26 \pm 0,11$
Koza	0	XX	$0,28 \pm 0,07$
Skot	0,17	X	$0,28 \pm 0,09$
Skot	0	X	$0,28 \pm 0,12$
Koza	1,7	XX	$0,30 \pm 0,13$
Koza	0,17	XX	$0,33 \pm 0,14$
Kur	1,7	XX	$0,36 \pm 0,05$
Kur	0	XX	$0,37 \pm 0,02$
Kur	17	XX	$0,37 \pm 0,08$
Kur	0,17	X	$0,43 \pm 0,06$

Obr. 8. Diagram s 95% intervaly spolehlivosti porovnávající specifickou růstovou rychlost v závislosti na koncentraci glyfosátu u jednotlivých živočichů.



6. Diskuze

V prvním pokusu byly vybrané bakteriální rody kultivovány na živných médiích a sledován jejich růst při pěti různých koncentracích glyfosátu. Hodnoty koncentrace glyfosátu ve vzorku byly od nejvyšší 17 g/L desetinásobně ředěny až na 0,00017 g/L. Na základě Grafu č. 1 a statistického vyhodnocení tohoto pokusu lze usoudit, že v daných koncentracích glyfosátu se výsledky nijak extrémně nevymykají kontrolnímu vzorku. Nárůst ve všech hodnotách koncentrace glyfosátu byl však zaznamenán u většiny rodů. Pouze koliformní bakterie narostly jen v kontrolním vzorku a vzorku s koncentrací glyfosátu 1,7 g/L. Rod *Bifidobacterium* nenarostl vůbec, tudíž nebyl ani zaznamenán v grafu. Pravděpodobně nebyl ve vzorku obsažen v detekovaném množství.

V druhém pokusu jsme se zabývali měřením specifických růstových rychlostí bakterií izolovaných z trávicího traktu hospodářských zvířat. Nejdříve byla stanovena suma CFU/ml všech kmenů bakterií, kdy nejvíce narostl kontrolní vzorek, jehož nejvyšší hodnota dosahovala $1,69 \cdot 10^7$ CFU/ml. Suma nárůstu vzorků o nejnižší koncentraci glyfosátu se od kontrolních téměř nelišila. Oproti tomu vzorky o nejvyšší koncentraci glyfosátu dosahovaly ve svém maximu polovičních hodnot. Je tedy zřejmé, že při koncentraci glyfosátu ve vzorku 0,17 g/L nemá v tomto pokusu glyfosát vliv na růst střevních bakterií naopak při koncentraci 17 g/L má glyfosát na jejich růst inhibiční účinky.

Co se týče specifických růstových rychlostí, nejvyšších hodnot dosáhly klostridie. Bylo tomu tak ve vzorku o nejnižší koncentraci glyfosátu $0,39 \pm 0,11$ a v kontrolním vzorku $0,38 \pm 0,07$. Po nich následovaly laktobacily ve všech čtyřech koncentracích glyfosátu se specifickými růstovými rychlostmi v rozmezí $0,25 \pm 0,12$ až $0,34 \pm 0,11$. Nejnižší specifické růstové rychlosti u samostatných bakteriálních rodů dosáhly bifidobakterie s nejnižší hodnotou $0,09 \pm 0,06$ při koncentraci glyfosátu 17 g/L. Mezi bifidobakteriemi s nejnižšími specifickými růstovými rychlostmi se objevil vzorek klostridií s hodnotou $0,15 \pm 0,09$ a s koncentrací glyfosátu 17 g/L. Můžeme tedy u klostridií upozorovat zvýšenou citlivost na glyfosát až při vyšší koncentraci glyfosátu. U zvířat dosahuje nejvyšší specifické rychlosti vzorek bakterií z kura při koncentraci glyfosátu 0,17 g/L těsně následovaný čistým vzorkem. Hodnoty specifických růstových rychlostí u kura jsou $0,36 \pm 0,05$ až $0,43 \pm 0,06$. Nejnižší specifické růstové rychlosti $0,11 \pm 0,8$ dosáhl vzorek skotu o koncentraci glyfosátu 17 g/L.

Nelze z tabulky vyčíst, u kterého zvířete byla specifická růstová rychlost nejmenší. Hodnoty se u koz a skotu střídají.

Z testování růstových křivek u jednotlivých rodů bakterií, vykazovali nejnižší citlivost vůči glyfosátu laktobacily. Díky poměrně vysokým a vyrovnaným hodnotám CFU/ml lze pokládat laktobacily za nejodolnější bakterie vůči glyfosátu v tomto měření. U klostridií byla zaznamenána nejvyšší naměřená hodnota CFU/ml, která dosahovala $1,91 \cdot 10^7$ v kontrolním vzorku a téměř totožná hodnota ve vzorku s nejnižší koncentrací, avšak vzorek o koncentraci glyfosátu 17 g/L vykazoval vysokou citlivost a nedosáhl ani třetinových hodnot CFU/ml předchozích vzorků. Toto tvrzení nám potvrzuje i statistické vyhodnocení pomocí analýzy rozptylu, kdy klostridie v nízkých koncentracích vykazují nejnižší citlivost vůči glyfosátu ze všech bakterií, avšak při koncentraci 17 g/L je jejich citlivost velmi vysoká. Oproti tomu laktobacily při nejvyšší koncentraci glyfosátu ve vzorku mají vůči němu citlivost znatelně vyšší a v analýze rozptylu vykazují stálější charakter.

Shehata et al. (2012) ve své studii tvrdí, že glyfosát inhibuje růst rodu *Lactobacillus* spp. při koncentraci 0,6 mg/ml a způsobuje morfologické změny zahrnující otoky a vlnitost buněčné stěny. V našem pokusu jsme inhibici růstu laktobacilů v tomto rozmezí nezaznamenali. Naopak laktobacily nevykazovaly znatelnou citlivost vůči glyfosátu ani při nejvyšší koncentraci. Hodnota 0,6 mg/mL tedy 0,6 g/L neodpovídá výsledkům našeho měření.

Shehata et al.(2012) dále tvrdí, že bifidobakterie vykazují vysokou citlivost na glyfosát, který narušuje střevní mikrobiotu. Z výsledků našeho pokusu nemůžeme potvrdit jimi zmiňovanou vysokou citlivost, protože hodnoty měření CFU/ml u bifidobakterií vykazují snížení pouze u nejvyšší koncentrace glyfosátu 17 g/L. U ostatních koncentrací se vzorky statisticky významně neliší.

U zvířecích růstových křivek vykazuje nejvyšších hodnot CFU/ml vzorek kuřete. V kontrolním vzorku a vzorcích o koncentracích glyfosátu 1,7 g/L a 0,17 g/L není patrná inhibice růstu bakterií. Vzorek s nejvyšší koncentrací však inhibován byl, ale celkově nám bakterie z trávicího traktu kuřete vykazují nejnižší citlivost vůči glyfosátu což jednoznačně potvrzuje i jednofaktorová analýza rozptylu. Naopak nejvyšší citlivost vykazují bakterie skotu. I tam ale pozorujeme zvýšenou citlivost jen u nejvyšší koncentrace. U ostatních

koncentrací již jsou rozdíly statisticky nevýznamné. U bakterií izolovaných z trávicího traktu koz není prokazatelně patrný vztah mezi koncentrací glyfosátu a specifickou růstovou rychlostí bakteriálních kmenů.

Glyfosát je specifickým inhibitorem enzymu EPSPS, který je nezbytnou součástí biosyntézy daných aromatických aminokyselin a jeho zablokování vede k narušení tvorby bílkovin (Schuette, 1998). Vzhledem k tomu, že trávicí trakt je nika bohatá na mnoho zdrojů živin, nehraje zřejmě glyfosát podstatnou roli v narušování bakteriální populace hospodářských zvířat.

7. Závěr

V této práci byl testován vliv účinné látky glyfosátu v různých koncentracích na střevní bakterie živočichů, izolované z jejich výkalů a na čerstvý vzorek kravského výkalu. Výsledky této práce nám ukazují, že v určitých koncentracích má glyfosát inhibiční vliv na růst střevní mikrobioty. V našem měření je to nejčastěji pouze ta nejvyšší hodnota koncentrace glyfosátu, 17 g/L, v jejíž přítomnosti je bakteriální růst v některých případech i několikanásobně inhibován. Výsledky našeho výzkumu z velké části splňují hypotézu danou v úvodu této práce, avšak ne zcela.

Vzhledem k tomu, že pokud byly mikroorganismy na glyfosát citlivé, tak pouze na jeho nejvyšší koncentraci. Aby však bylo dosaženo přesných hodnot, při jaké koncentraci glyfosátu nastává inhibice daných druhů střevních bakterií, muselo by být použito mnohem širší množství bakteriálních kultur i vícero koncentrací glyfosátu.

8. Seznam použité literatury

Bajgar, J., Fusek, J., Hrdina, V. 1991. Vojenská toxikologie. Vojenská lékařská akademie J.E. Purkyně. Hradec Králové.

Baligar, P.N., Kaliwal, B.B. 2001. Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to mancozeb. *Industrial Health*. 39. s. 235-243.

Barnes, E. M., Mead G. C., Barnum D. A., Harry E. G. 2007. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *British Poultry Science*. 13(3): 311-326.

Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg J.L., Peterson, D. A., Gordon J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 307(5717):1915–1920.

Bednář, M. et al. 1999. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Marvil. Praha. 558 s.

Benbrook, C. M. 2012. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. -- the first sixteen years. *Environmental Sciences Europe*. 24. S. 24–21.

Berg, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 4. s. 430-435.

Bradberry, S.M. et. al. 2004. Glyphosate poisoning. *Toxicology Review*. 23(3). s. 159-67

Bray, J. 1945. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *J. Pathol.Bacteriol*. 57. s. 239-247.

Brooks, G.T. 1999. Pesticide chemistry and bioscience: the food-environment. London: RSC. ISBN 08-540-4709-3.

Buchel, K. H. 1983. Chemistry of Pesticides. John Wiley & Sons. New York, USA.

Burdychová, R. 2007. Identifikace a charakterizace bakterií rodu *Enterococcus* určených pro výrobu funkčních potravin. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. sv. LV, č. 2, s. 9-14.

Costa, L.G. 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta* 366. s. 1-13 .

Cox, C., 1995. Glyphosate. *Toxicology. J. Pesticide Reform* 15 (3). s. 14-20.

Cremlyn, R. 1985. *Pesticidy*. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 244 s.

Cummings, J.H., MacFarlane, G.T. 1997. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition*. 16. s. 3–9.

Davídek, J., Janíček, G., Pokorný, J. 1983. *Chemie potravin: učebnice pro vys. školy chemickotechnologické*. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 629 s.

DG SANCO. Review report for the active substance glyphosate [online]. 2002, 56 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z:

http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/pro/eva/existing/list1_glyphosate_en.pdf

Dijkstra, J., Forbes, J., France, J. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. 2005. Cambridge. 734 s.

Drum, C. 1980. *Soil Chemistry of Pesticides*. PPG Industries. USA.

Duke, S.O., Powles, S.B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*. 64. s. 319-325.

Ecobichon, D.J. 2001. “Carbamate insecticides”, *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, Krieger. San Diego. s. 1087-1106.

Eto, M. 1974 *Organic and Biological Chemistry: Organophosphorus Pesticides*. CRC Press. Cleveland, Ohio. 325 s.

Franz, J. E., Mao, M.K., Sikorinski, J.A. 1997. Glyphosate: a unique global herbicide. American Chemical Society. Washington, DC. 653 s. ISBN 08-412-3458-2.

Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. 2000. Ecological risk assessment for Roundup® herbicide. Review of Environmental Contamination and Toxicology. 167. 35-120.

Görner, F., Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia potravín: princípy mikrobiológie potravín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodoky sú prenášané potravinami. 1. vyd. Malé centrum. Bratislava. ISBN 80-967064-9-7.

Gray, N. 2008. Drinking water quality. Cambridge University Press. Cambridge. 520 s. ISBN 978-0-521-87825-8.

Green, M. B, West, T.F., Hartley G.S. 1979. Chemicals for crop protection and pest control. Pergamon Press. Oxford. 296 s.

Grlić, L. 1988. Mali kemijski leksikon Napried. Zagreb. 198 s.

Gupta, P.K. 2004. Pesticide exposure-Indian scene. Toxicology. 198(1-3). s. 83-90.

Gupta, R.C. 2006. Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compound. Elsevier. Academic Press. Amsterdam. s. 5-24.

Hartley, G.S., West T.F. 1969. Chemicals for Pest Control. Pergamon Press. Oxford.

Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., Gordon, J.I. 2001. Molecular analysis of commensal host microbial relationships in the intestine. Science. 291:881–884.

Chang, F.C., Simcik, M.F., Capel, P.D. 2011. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. Environmental Toxicology and Chemistry 30. s. 548-555.

Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology, Seventh Edition. Springer. New York. ISBN 0 – 387 – 23180 – 3.

Jones D., Woods, D. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiological reviews. 50. s. 484-524.

Junquera, P. Synthetic pyrethroids for veterinary use dogs, cats and on livestock - cattle, sheep, goats, pig, poultry - against external parasites. In: parasitipedia.net [online]. 2014 [cit. 2015-09-06].

Komprda, T. 2004. Obecná hygiena potravin. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. 145 s. ISBN 80-715-7757-X.

Krejsek, J., Kudlová M., Kolářková M. 2007. Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. Pediatrie pro praxi. č. 3, s. 156-162.

Kubitschek, H. E. 1990. Cell volume increase in Escherichia coli after shifts to richer media. Journal of Bacteriology. 172 (1) s. 94–101.

Kun Lee, Y., Salminen, S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley and Sons. New Jersey. s. 596. ISBN: 978-0-470-13544-0.

Leitgeb, S., Vošta, J. 1988. Mikrobiologie. VN MON tiskárenský provoz I. Praha.

Lupp, C., Finlay, B.B. 2005. Intestinal microbiota. Curr Biol. April 12. 15(7): 235–236.

Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. 2012. Brock biology of microorganisms. Benjamin Cummings. San Francisco. 1168 s.

Mansour, S., 2004. Pesticide exposure- Egyptian scene. Toxicology 198; s. 91-115.

Martin, H. 1973. The scientific principles of crop protection. Crane. New York. 423 s.

Marshall, E.J. 2009. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J Toxicology Enviromental Health*. 72. s. 986–97.

Mayo, B., Sinderen, D. 2010. *Bifidobacteria: genomics and molecular aspects*. Caister Academic. Norfolk. ISBN 978-1-904455-68-4.

Metcalf, R. L. Insect Control. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000 [cit. 2016-02-26]. DOI: 10.1002/14356007.a14_263. ISBN 3527306730. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a14_263.

Monsanto. Summary of Human Risk Assessment and safety evaluation on glyphosate and Roundup herbicide [online]. 2005 [cit. 2016-03-01]. Dostupné z: www.monsanto.com/products/Pages/roundup-safety-background-materials.aspx.

Mundt, J.O. 1963. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *Appl Microbiol*. s. 136–140.

Nandula, V.K. 2010. *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management*. Hoboken, USA. 344 s. ISBN 978-0470410318

O'Hara, A. M., Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*. 7(7): 688-693.

Phillips, V. A., VonTungeln D. L. 1985. The effect of yeast culture on the post-stress performance of feeder calves. *Nutr. Rep*. 32. s .287.

Proskocil, B. J., Bruun, D. A., Thompson, C. M., Fryer, A. D., Lein, P. J. 2010. Organophosphorus Pesticides Decrease M2 Mucarinic Receptn or Function in Guinea Pig Airway Nevers via Indirect Mechanisms. *PLoS ONE*. s. 1-11.

Prousek, J. 2001. *Rizikové vlastnosti látok*. 1. vyd. Bratislava. 247 s. ISBN 80-227-1497-6.

Purchiaroni, F., Tortora, A., Gabrielli, M., Bertucci, F., Gigante, G., Ianiro, G., Ojetti, V., Scarpellini, E., Gasbarrini, A. 2013. The role of intestinal microbiota and the immune system. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. February; 17(3): 323–333.

Rada, V., Petr, J. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J Microbiol Methods* [online]. 2000, 43(2), 127–132 [cit. 2016-02-10].

Reiss, T. 2013. Fictions of the cosmos: science and literature in the seventeenth century. 104(1). s. 158–159.

Reuter, G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: Composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2. 43–53.

Samsel, A., Seneff, S. 2013. Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. *Entropy*. 15. 1416-1463.

Savageau, M. A. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *American Nature*. 122, s. 732–744.

Sedláček, I. 2007. *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita. Brno. 270 s.

Schuette, Jeff. 1998. ENVIRONMENTAL FATE OF GLYPHOSATE [online]. [cit. 2015-11-17]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Glyphosate#cite_note-urlwww.cdpr.ca.gov-23.

Sharma, R., Young, C., Neu, J. 2010. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *Journal of Biomed Biotechnol.* s.15.

Shehata, A.A., Schrödl, W., Aldin, A.A., Hafez, H.M., Krüger, M. 2013. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Current Microbiology*. 66(4):350-8. doi: 10.1007/s00284-012-0277-2.

Stapley, J., Gayner, F. a Hassall, K.A. 1969. World crop protection. CRC Press. Cleveland. 270 s.

Šuta, Miroslav. 2015. Glyfosát: Nejběžnější pesticid na českých polích nově zařazen mezi karcinogeny [online]. [cit. 2015-10-21]. Dostupné z: <http://suta.blog.respekt.cz/glyfosat-nejbeznejsi-pesticid-na-ceskych-polich-nove-zarazen-mez-karcinogeny/>.

Tannock, G. W. 2004. A special fondness for lactobacilli. Appl Environ Microbiol.70(6). s. 3189–3194.

Tomlin, C. 2006. The Pesticide Manual. British Crop Protection Council. Hampshire. ISBN 1-901396-14-2.

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.

Votava, M. 2005. Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun. Brno. 351 s.

Ware, G. W. 1983. Pesticides, theory and application. W.H. Freeman. San Francisco. 308 s. ISBN 0716714167.

Wood, Laura. 2013. Research and Markets: Research Report on Global and China Glyphosate Industry, 2013-2017 [online]. [cit. 2015-10-21]. Dostupné z: <http://www.reuters.com/article/2013/06/13/>.

Zbořil, V. 2005. Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. Grada. Praha. 153 s. ISBN 80-247-0584-2.

Zimdahl, R. L. 2007. Fundamentals of weed science. Elsevier Academic Press. Boston. ISBN 978-0-12-372518-9.

Zvára, J. 1998. Fytofarmacie. Jihočeská univerzita. České Budějovice. 125 s. ISBN 80-704-0268-7.

9. Samostatné přílohy

Tabulka č. 25 Log CFU/ml u jednotlivých vzorků střevních bakterií (část 1.)

Kmen	Zvíře	0h	1h	1:45h	2:15h	2:45h	3:15h	4h	5h	6:30h	7:30h	9:00h	10:30h	24h
1.Lb - A	Prase	6,08	6,26	6,38	6,48	6,57	6,70	6,83	7,04	7,15	7,16	7,17	7,16	6,99
Lb - B	Prase	6,38	6,26	6,42	6,59	6,69	6,87	7,00	7,24	7,26	7,27	7,27	7,26	7,13
Lb - C	Prase	6,32	6,55	6,74	6,87	6,96	7,09	7,19	7,26	7,28	7,28	7,27	7,27	7,15
Lb -0	Prase	6,43	6,68	6,84	6,97	7,05	7,16	7,24	7,27	7,27	7,27	7,27	7,26	7,15
2.Lb - A	Kuře	6,02	6,15	6,21	6,30	6,43	6,56	6,73	7,08	7,09	7,08	7,10	7,05	7,08
Lb - B	Kuře	6,15	6,33	6,55	6,71	6,89	7,07	7,19	7,21	7,22	7,22	7,23	7,23	7,26
Lb - C	Kuře	5,97	6,26	6,50	6,65	6,85	7,06	7,19	7,21	7,24	7,24	7,25	7,25	7,27
Lb -0	Kuře	5,91	6,03	6,41	6,58	6,75	6,98	7,14	7,19	7,22	7,23	7,24	7,24	7,27
3.Lb - A	Kuře	6,15	6,28	6,32	6,41	6,49	6,65	6,81	7,11	7,10	7,10	7,11	7,08	7,06
Lb - B	Kuře	6,18	6,42	6,64	6,81	6,96	7,10	7,20	7,22	7,23	7,24	7,25	7,24	7,27
Lb - C	Kuře	6,07	6,33	6,55	6,71	6,85	7,04	7,18	7,22	7,23	7,25	7,25	7,25	7,25
Lb -0	Kuře	6,08	6,30	6,47	6,62	6,78	7,00	7,13	7,23	7,24	7,25	7,25	7,25	7,27
4.Lb - A	Kuře	6,12	6,22	6,23	6,32	6,42	6,57	6,73	7,09	7,08	7,08	7,07	6,99	7,02
Lb - B	Kuře	6,11	6,24	6,45	6,62	6,78	7,01	7,15	7,18	7,21	7,22	7,23	7,23	7,23
Lb - C	Kuře	5,95	6,14	6,26	6,41	6,57	6,83	7,01	7,20	7,22	7,22	7,24	7,25	7,29
Lb -0	Kuře	6,02	6,28	6,47	6,63	6,81	6,98	7,13	7,20	7,21	7,20	7,24	7,24	7,27
5.Cl - A	Tele	6,12	6,19	6,14	6,18	6,19	6,16	6,18	6,20	6,18	6,20	6,17	6,19	6,11
Cl - B	Tele	6,22	6,45	6,67	6,80	6,96	7,06	7,13	7,21	7,21	7,21	7,18	7,12	6,69
Cl - C	Tele	6,18	6,51	6,81	6,98	7,10	7,22	7,24	7,30	7,28	7,28	7,27	7,26	7,11
Cl - 0	Tele	6,28	6,62	6,89	7,05	7,14	7,22	7,24	7,29	7,30	7,30	7,29	7,27	7,11
6.Cl - A	Tele	6,13	6,21	6,23	6,26	6,25	6,29	6,30	6,39	6,36	6,41	6,45	6,45	6,25
Cl - B	Tele	6,40	6,76	7,01	7,13	7,18	7,22	7,25	7,28	7,28	7,28	7,28	7,29	7,29
Cl - C	Tele	6,47	6,94	7,15	7,21	7,25	7,27	7,29	7,30	7,30	7,30	7,30	7,29	7,30
Cl - 0	Tele	6,35	6,83	7,11	7,19	7,24	7,27	7,29	7,31	7,31	7,31	7,29	7,30	7,31
7.Lb - A	Tele	6,03	6,12	6,12	6,20	6,30	6,48	6,71	7,08	7,18	7,18	7,18	7,17	7,13
Lb - B	Tele	5,94	6,13	6,33	6,55	6,76	7,03	7,21	7,25	7,25	7,24	7,24	7,24	7,27
Lb - C	Tele	5,98	6,15	6,33	6,55	6,81	7,06	7,22	7,26	7,26	7,25	7,25	7,24	7,27
Lb - 0	Tele	5,94	6,10	6,26	6,45	6,70	7,00	7,19	7,27	7,26	7,26	7,25	7,25	7,29
8.Lb - A	Tele	6,00	6,05	6,02	6,06	5,97	6,03	5,98	6,00	6,00	6,03	5,97	6,26	7,10
Lb - B	Tele	5,98	5,95	5,92	5,92	5,91	5,94	5,92	5,95	5,95	6,00	6,15	6,81	7,23
Lb - C	Tele	6,10	6,02	5,92	6,07	5,91	5,97	5,94	6,03	5,89	6,00	6,18	6,88	7,27
Lb - 0	Tele	6,12	6,06	5,94	5,98	5,98	5,97	6,02	5,97	6,02	6,14	6,23	6,87	7,24

Tabulka č. 26 Log CFU/ml u jednotlivých vzorků střevních bakterií (část 2.)

9.Lb - A	Tele	6,02	6,03	5,97	5,98	6,07	6,12	6,18	6,42	6,60	6,64	6,51	6,91	7,00
Lb - B	Tele	6,05	6,23	6,36	6,53	6,64	6,79	6,92	7,11	7,15	7,22	7,21	7,23	7,21
Lb - C	Tele	6,05	6,17	6,35	6,50	6,64	6,78	6,92	7,12	7,16	7,22	7,23	7,22	7,22
Lb - 0	Tele	6,13	6,24	6,39	6,54	6,66	6,80	6,94	7,12	7,16	7,20	7,22	7,22	7,20
10.Ec - A	Tele	6,03	6,23	6,26	6,29	6,24	6,28	6,37	6,39	6,41	6,39	6,40	6,45	6,45
Ec - B	Tele	6,26	6,53	6,63	6,68	6,74	6,79	6,85	6,92	6,94	6,94	6,93	6,94	6,96
Ec - C	Tele	6,32	6,63	6,76	6,87	6,95	6,99	7,05	7,04	7,04	7,04	7,05	7,05	7,07
Ec - 0	Tele	6,48	6,73	6,86	6,95	6,99	7,03	7,05	7,06	7,07	7,06	7,07	7,07	7,10
11.Ec - A	Tele	6,08	6,23	6,31	6,39	6,43	6,49	6,49	6,54	6,58	6,59	6,58	6,59	6,64
Ec - B	Tele	6,33	6,66	6,81	6,86	6,91	6,95	6,99	7,00	7,00	7,01	7,01	7,02	7,03
Ec - C	Tele	6,35	6,75	6,94	7,02	7,06	7,09	7,10	7,12	7,12	7,12	7,13	7,12	7,14
Ec - 0	Tele	6,52	6,85	7,01	7,05	7,09	7,10	7,10	7,12	7,13	7,14	7,14	7,14	7,15
12.Bif -A	Kůzle	6,14	6,18	6,20	6,18	6,27	6,32	6,37	6,53	6,61	6,66	6,69	6,97	6,92
Bif - B	Kůzle	6,17	6,42	6,64	6,88	6,97	7,12	7,16	7,21	7,18	7,18	7,18	7,18	7,17
Bif - C	Kůzle	6,15	6,43	6,66	6,88	7,02	7,16	7,20	7,21	7,21	7,23	7,19	7,20	7,22
Bif - 0	Kůzle	6,14	6,39	6,60	6,80	6,97	7,12	7,20	7,24	7,23	7,23	7,22	7,25	7,23
13.Bif -A	Kůzle	6,17	6,35	6,47	6,60	6,65	6,76	6,92	7,02	7,05	7,06	7,07	7,10	7,07
Bif - B	Kůzle	6,38	6,85	7,08	7,17	7,22	7,25	7,25	7,27	7,27	7,26	7,25	7,26	7,28
Bif - C	Kůzle	6,35	6,86	7,10	7,19	7,21	7,26	7,26	7,27	7,26	7,25	7,26	7,29	7,28
Bif - 0	Kůzle	6,51	6,97	7,19	7,20	7,21	7,26	7,26	7,26	7,25	7,24	7,33	7,27	7,29
14.Bif -A	Tele	6,10	6,12	6,12	6,12	6,22	6,21	6,32	6,48	6,60	6,64	6,70	6,79	6,94
Bif - B	Tele	6,07	6,13	6,24	6,31	6,39	6,57	6,76	6,86	6,93	6,96	7,06	7,07	7,15
Bif - C	Tele	5,97	6,10	6,21	6,23	6,35	6,47	6,76	6,88	6,96	7,01	7,09	7,11	7,21
Bif - 0	Tele	6,14	6,24	6,31	6,41	6,53	6,68	6,78	6,95	7,00	7,03	7,09	7,11	7,22
15.Bif -A	Tele	6,12	6,17	6,08	6,07	6,12	6,16	6,18	6,28	6,44	6,51	6,67	6,92	7,08
Bif - B	Tele	6,05	6,14	6,11	6,23	6,26	6,42	6,60	6,95	7,14	7,26	7,28	7,29	7,31
Bif - C	Tele	5,95	6,06	6,14	6,17	6,24	6,41	6,59	6,96	7,16	7,27	7,28	7,30	7,31
Bif - 0	Tele	6,08	6,14	6,19	6,23	6,30	6,44	6,63	7,00	7,18	7,27	7,28	7,26	7,30
16.Bif -A	Tele	6,07	6,07	6,06	6,10	6,10	5,98	6,11	6,10	6,13	6,07	6,16	6,15	6,39
Bif - B	Tele	6,13	6,26	6,32	6,41	6,51	6,64	6,84	7,08	7,18	7,20	7,20	7,24	7,23
Bif - C	Tele	6,07	6,24	6,29	6,38	6,48	6,65	6,87	7,11	7,20	7,22	7,20	7,20	7,25
Bif - 0	Tele	6,10	6,22	6,33	6,43	6,56	6,70	6,92	7,15	7,21	7,21	7,21	7,20	7,25

Tabulka č. 27 Log CFU/ml u jednotlivých vzorků střevních bakterií (část 3.)

17.Bif -A	Tele	5,62	5,73	5,56	5,71	5,71	5,62	5,76	5,82	5,88	5,80	5,80	5,95	6,27
Bif - B	Tele	6,01	5,78	5,78	5,80	5,84	5,84	6,02	6,23	6,48	6,67	7,00	7,23	7,24
Bif - C	Tele	5,86	5,88	5,86	5,76	5,84	6,00	6,12	6,37	6,64	6,92	7,18	7,24	7,27
Bif - 0	Tele	5,76	5,76	5,73	5,73	5,78	5,86	5,76	6,30	6,60	6,87	7,14	7,25	7,27
18.Bif - A	Kůzle	6,05	5,48	6,00	6,06	5,95	6,01	6,08	6,02	6,06	6,09	6,15	6,26	6,45
Bif - B	Kůzle	5,95	5,95	5,94	5,94	6,00	6,02	6,18	6,35	6,48	6,60	6,76	6,93	7,08
Bif - C	Kůzle	5,95	6,00	6,03	6,09	6,16	6,18	6,47	6,73	6,93	7,02	7,12	7,13	7,17
Bif - 0	Kůzle	6,09	6,15	6,18	6,23	6,41	6,50	6,69	6,92	7,03	7,06	7,09	7,14	7,13
19.Bif - A	Kůzle	6,05	6,06	6,05	6,06	6,17	6,18	6,28	6,41	6,56	6,62	6,70	6,91	7,08
Bif - B	Kůzle	6,06	6,10	6,20	6,33	6,45	6,61	6,85	7,12	7,25	7,25	7,25	7,26	7,31
Bif - C	Kůzle	5,95	5,98	6,08	6,18	6,30	6,45	6,76	7,05	7,22	7,27	7,28	7,27	7,31
Bif - 0	Kůzle	6,08	6,18	6,28	6,38	6,53	6,66	6,94	7,14	7,25	7,30	7,27	7,27	7,30
20.Bif -A	Kůzle	6,08	6,12	6,10	6,07	6,02	6,12	6,10	6,18	6,23	6,35	6,44	6,72	7,18
Bif - B	Kůzle	6,18	6,19	6,18	6,17	6,20	6,32	6,42	6,68	6,94	7,10	7,25	7,27	7,27
Bif - C	Kůzle	6,00	6,03	6,05	6,06	6,11	6,21	6,32	6,57	6,89	7,08	7,25	7,28	7,27
Bif - 0	Kůzle	6,12	6,18	6,19	6,23	6,26	6,34	6,48	6,70	6,97	7,12	7,23	7,26	7,22
21.Bif -A	Tele	6,00	6,00	5,88	5,86	5,80	5,76	5,76	5,89	5,82	5,84	5,80	5,89	6,02
Bif - B	Tele	5,97	5,97	5,82	5,82	5,76	5,78	5,84	5,71	5,86	5,84	5,88	5,89	6,23
Bif - C	Tele	5,95	5,95	5,86	5,84	6,00	5,89	5,80	5,80	5,95	5,89	5,82	5,95	6,73
Bif - 0	Tele	6,01	5,95	5,91	5,89	5,88	5,88	5,92	5,86	5,94	5,97	5,89	5,95	7,10
22.Bif -A	Tele	6,10	6,00	5,98	6,01	5,97	5,97	6,05	6,05	6,02	6,00	6,00	6,15	7,04
Bif - B	Tele	6,00	5,97	5,89	5,88	5,91	5,91	5,89	5,97	6,06	6,03	6,06	6,32	7,08
Bif - C	Tele	6,02	5,84	5,84	5,84	5,84	5,76	5,86	5,92	5,84	6,05	6,13	6,60	7,13
Bif - 0	Tele	6,06	6,00	5,94	6,08	5,98	5,98	6,02	6,05	6,00	6,00	6,11	6,56	7,18
23.Bif -A	Tele	6,12	6,15	6,22	6,26	6,35	6,36	6,44	6,57	6,70	6,83	6,90	6,96	7,13
Bif - B	Tele	6,11	6,18	6,31	6,52	6,66	6,72	6,95	7,12	7,20	7,26	7,29	7,30	7,32
Bif - C	Tele	5,95	6,06	6,28	6,46	6,59	6,71	6,94	7,11	7,19	7,26	7,29	7,30	7,32
Bif - 0	Tele	6,14	6,32	6,50	6,70	6,82	6,96	7,06	7,15	7,21	7,28	7,30	7,31	7,32