

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Využití mikrotitračních destiček pro měření růstových
křivek anaerobních bakterií**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Ivor Stupčuk

Vedoucí práce: Ing. Eva Popelářová, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití mikrotitračních destiček pro měření růstových křivek anaerobních bakterií" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 9.dubna 2014

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucí diplomové práce Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za odborné vedení, dále bych rád poděkoval doc. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za věcné připomínky při konzultacích a v neposlední řadě Bc. Adéle Kabrhelové za měření růstových křivek ve zkumavkách.

Využití mikrotitračních destiček pro měření růstových křivek anaerobních bakterií

Souhrn

Nedílnou součástí trávicího traktu člověka, především tlustého střeva, jsou anaerobní bakterie. V průběhu života však dochází ke změnám složení střevní mikroflóry. Zpočátku jsou hojně zastoupeny bifidobakterie, s věkem jejich počet klesá nebo zcela vymizí a dochází k významnému zvýšení množství klostridií. Také počet laktobacilů se zvyšuje.

Množství zdraví prospěšných bakterií trávicího traktu, jako jsou laktobacily a bifidobakterie, mohou do značné míry ovlivnit prebiotika. Prebiotika jsou nestavitelnou potravinovou složkou, která blahodárně působí na hostitele selektivní stimulací některých bakteriálních druhů střevní mikroflóry. Mezi významná prebiotika patří oligosacharidy.

Cílem této diplomové práce bylo porovnat dvě metody pro měření růstu anaerobních bakterií na prebiotických oligosacharidech. Práce vychází z předpokladu, že růstové křivky budou ovlivněny použitým substrátem, vztahem bakterií ke kyslíku a významný vliv bude mít také zvolená metoda.

Jednou z metod bylo měření v kultivačních zkumavkách Densitometrem DEN - 1B. Tato metoda je náročná na spotřebu materiálu a věnovaný čas při měření. Druhou metodou bylo měření na mikrotitračních destičkách přístrojem Infinite M200, která je náročnější na kvalitu práce a přístrojové vybavení. Obě metody jsou založené na principu turbidimetrie.

V práci byl měřen růst anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií rodu *Bifidobacterium*, *Clostridium* a *Lactobacillus* na prebiotických oligosacharidech Raftilose[®], Vivinal[®] a Nutriose[®]. Na použitých oligosacharidech (u obou metod) rostly nejlépe klostridie, především *C. perfringens*. Slabší, ale poměrně vyrovnaný růst vykazovaly laktobacily. U všech tří rodů byl horší růst na Nutriose[®] ve srovnání s Raftilosou[®] a Vivinalem[®]. Bifidobakterie na mikrotitrační destičce s Nutriosou[®] prakticky nerostly. Rostl zde pouze jeden kmen *B. breve*.

Výsledky potvrzují vliv zvolené metody v závislosti na vztahu bakterií ke kyslíku. Zatímco některé kmeny bifidobakterií a klostridií nerostly na destičce, v případě laktobacilů byl zaznamenán růst u všech kmenů. Nicméně mezi metodami není statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$). Lze konstatovat, že mikrotitrační destičky nejsou vhodné pro měření růstových křivek anaerobních bakterií, ale můžeme uvažovat o jejich využití pro měření růstu fakultativně anaerobních bakterií.

Klíčová slova: anaerobní bakterie, růstová křivka, prebiotika, klostridie, laktobacily

Use of microtiter plates for determination of growth curves of anaerobic bacteria

Summary

The human digestive tract, in particular the large intestine, naturally houses numerous species of anaerobic bacteria. However, in the course of life, the intestinal bacteria microflora gradually changes. While the profusely high amount of the bifidobacteria present in the system decreases or completely disappears with age, the amount clostridia significantly rises. Similarly, the amount of lactobacilli increases.

To a large extent, the amount of health beneficial bacteria, including the lactobacilli and the bifidobacteria, may be affected by prebiotics. The prebiotics are a non - digestible food component the effect of which benefits the host thanks to selective stimulation of some of the bacteria types present in the intestinal microflora. Important prebiotics include, among others, the oligosaccharides.

The thesis aims to draw a comparison between the two methods of determining the growth of anaerobic bacteria on prebiotic oligosaccharides. Our point of departure is the assumption that the growth curves shall be influenced by the substrate and the bacteria's relation to the oxygen, while the selected method will also have a major impact.

The methods applied in the research included measurement with the DEN - 1B densitometer. This particular method is demanding in terms of material use and time-consuming nature of the measurement. In contrast, the other method that we applied used the Infinite M200 machine to perform measurement on microtiter plates. The latter method was more challenging due to the required quality of work and machine equipment. Both methods are based on measuring turbidity.

The thesis focused on measuring the growth of anaerobic and facultative anaerobic bacteria of the genus *Bifidobacterium*, *Clostridium* and *Lactobacillus* on the prebiotic oligosaccharides Raftilose[®], Vivinal[®] a Nutriose[®]. The measurement results for both methods showed that the highest growth curve on the oligosaccharides used was recorded for the clostridia, more specifically the *C. perfringens*. In comparison, the lactobacilli demonstrated slightly lower, yet balanced growth rate. With all three genera, Nutriose[®] provided inferior conditions for growth in contrast with Raftilose[®] and Vivinal[®]. The bifidobacteria proved virtually no growth on the microtiter plate with Nutriose[®], except for the *B. breve*.

As a result, it can be stated that the effects of the selected methods depend on the bacteria's relation to oxygen. While some of the strains of the bifidobacteria and clostridia failed to grow on the plate, all of the lactobacilli strains proved to be growing here.

Nevertheless, there is not statistic difference between the methods ($\alpha = 0,05$). To conclude, the microtirate plates were found to be unsuitable for determining the growth curves of the anaerobic bacteria, but their use may be considered for measuring the growth of the facultative anaerobic bacteria.

Keywords: anaerobic bacteria, growth curve, prebiotics, clostridia, lactobacilli

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíl	10
3. Literární rešerše	11
3.1 Bakterie obecně.....	11
3.1.1 Růst	13
3.1.1.1 Růstová křivka.....	14
3.1.1.2 Vnější prostředí	15
3.1.1.2.1 Fyzikální požadavky	15
3.1.1.2.2 Chemické požadavky	17
3.1.2 Anaerobní bakterie	19
3.1.2.1 Rod <i>Bifidobacterium</i>	21
3.1.2.1.1 Význam	23
3.1.2.2 Rod <i>Clostridium</i>	24
3.1.2.2.1 Význam	25
3.1.2.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	26
3.1.2.3.1 Význam	28
3.2 Mikroflóra trávicího traktu lidí	29
3.2.1 Probiotika	32
3.2.2 Prebiotika	33
3.2.2.1 Oligosacharidy.....	34
3.2.2.1.1 Vybrané oligosacharidy	35
4. Materiál a metody	37
4.1 Složení a příprava médií	38
4.2 Pracovní postup.....	39
4.2.1 Měření růstu	40
5. Výsledky.....	42

5.1 Vybrané křivky růstu na destičkách.....	42
5.2 Vybrané křivky růstu na zkumavce	45
5.3 Specifické růstové rychlosti.....	47
6. Diskuze	52
7. Závěr.....	56
8. Seznam použité literatury	57
9. Seznam použitých zkratek	67
10. Samostatné přílohy	68

1. Úvod

Anaerobní bakterie jsou nedílnou součástí trávicího traktu lidí a zvířat. Již od narození jsou v tlustém střevě kojenců většinou dominantně zastoupeny bifidobakterie, které společně s laktobacily pozitivně působí na zdraví hostitele. V průběhu života však vlivem stravovacích návyků a životního stylu dochází ke změnám složení mikroflóry tlustého střeva, což může mít nepříznivý vliv na naše zdraví.

V současnosti je trendem obohacovat potraviny o prebiotika, které stimulačně působí na růst bakterií trávicího traktu. Cílem prebiotik je především podpořit růst zdraví prospěšných bakterií a nepřímo tak potlačit růst patogenních mikroorganismů, např. klostridií. Proto je věnována velká pozornost měření růstu (růstové křivky, počty KTJ) na médiích obohacených o prebiotika.

Nejčastěji používanou metodou pro měření růstových křivek je měření v kultivačních zkumavkách na Densitometru. Měření na Densitometru je spolehlivou metodou, která je založená na principu turbidity. Nicméně tato metoda je náročná na spotřebu materiálu a věnovaný čas během měření.

Novou metodou založenou na podobném principu je měření na mikrotitračních destičkách. Měření probíhá automaticky na čtecím zařízení Infinite za nižší spotřeby materiálu, ale při této metodě jsou kladeny vyšší nároky na kvalitu práce a přístrojové vybavení. Proto byly porovnávány obě metody.

Výsledky v této práci mohou do budoucna napovědět, zda je možné nahradit měření růstu anaerobních bakterií v kultivačních zkumavkách novou metodou, měřením na mikrotitračních destičkách, či nikoliv.

2. Cíl

Měření růstových křivek anaerobních bakterií na mikrotitračních destičkách je méně časově náročné v porovnání s měřením v kultivačních zkumavkách. Cílem diplomové práce je navázat na předchozí bakalářskou práci a porovnat tak obě metodiky. Předchozí práce se zabývala pouze růstem bifidobakterií. V této práci jsou měřeny růstové křivky klostridií a laktobacilů.

Hypotéza vychází z předpokladu, že na průběh růstových křivek má vliv vztah bakterií ke kyslíku a použité prebiotikum. Hypotéza také předpokládá, že rozdíl bude statisticky významný v závislosti na použité metodě.

3. Literární řešerše

3.1 Bakterie obecně

Slovo bakterie (z řeckého „bakterion“ = „tyčka“) bylo původně používáné pro mikroorganismy ve tvaru tyčinek, zařazených mezi rostliny jako „mikroskopicky jednobuněčné rostliny, bez přítomnosti chlorofylu, které se rozmnožují dělením“ (Trivedi et al., 2010). V současnosti jsou bakterie spolu s archea ve skupině prokaryota, které jsou svým chemickým složením podobné eukaryota, především strukturou buněčných stěn a membrán. Obě skupiny obsahují nukleové kyseliny, proteiny, lipidy a sacharidy. Využívají stejné chemické reakce pro látkovou přeměnu potravy, tvorbu proteinů a zásob energie (Neidhardt, 2004b). Základním rozdílem mezi oběma skupinami je přítomnost buněčných organel (Tortora et al., 2010).

Dnes jsou bakterie chápány jako nejmenší živé buňky schopné samostatné reprodukce. Základním tvarem bakterií je kulovitý (koky), tyčinkovitý (bacily) a spirálovitý. Bakterie kulovitého tvaru mají většinou průměr od 0,5 do 2 μm , ve tvaru tyčinek jsou obvykle 0,2 až 2 μm široké a 1 až 10 μm dlouhé. Tyčinky mohou být ohnuté či zakřivené. Kromě tvaru může být pro některé rody charakteristické uspořádání buněk. Koky uspořádané v párech se nazývají diplokoky, v řetízcích streptokoky a v nepravidelných shlucích stafylokoky. Pro svou velikost se bakterie podstatně liší od ostatních buněk. Z buněčných organel chybí mitochondrie, Golgiho aparát, lysozomy a endoplasmatické retikulum (Neidhardt, 2004b).

Buněčná stěna bakterií se nachází nad cytoplazmatickou membránou. Jedná se o velmi pevnou strukturu, která dodává buňce tvar. Je odolná proti vysokému tlaku a je nezbytná pro růst a množení. Obecně platí, že buněčná stěna je složena z několika vrstev. Nejdůležitější složkou buněčné stěny je peptidoglykan, někdy také nazývaný murein, jež je nerozpustný, zesíťovaný polymer o velké pevnosti a tuhosti, který se vyskytuje pouze u prokaryot. V podstatě se jedná o N - acetylglukosamin, N - acetyl muramovou kyselinu a aminokyseliny v L a D formě. Pomocí tetrapeptidu, složeného z aminokyselin, jsou propojeny jednotlivé vrstvy peptidoglykanu. Díky tomuto propojení je okolo buňky vytvořena pevná struktura, která buňku chrání. Některá antibiotika, např. penicilin, inhibují tuto syntézu (Trivedi et al., 2010).

Další složky buněčné stěny jsou rozdílné u gramnegativních a grampozitivních bakterií. Jako grampozitivní se označují ty bakterie, jejichž usmrcené buňky po obarvení

Gramovým barvicím roztokem neztrácejí toto barvivo působením rozpouštědel, acetonu nebo etanolu. U gramnegativních bakterií je toto barvivo vyplavováno.

Hlavní složkou buněčné stěny grampozitivních bakterií je silná peptidoglykanová vrstva, která je vyplněna kyselinou teichovou. Kyselina teichová je kovalentní vazbou vázána na muramovou kyselinu a představuje až 50 % sušiny buněčné stěny. Kromě kyseliny teichové jsou na peptidoglykan grampozitivních bakterií vázány ještě polysacharidy, složené z monosacharidů. U gramnegativních bakterií se buněčná stěna skládá z tenké vrstvy peptidoglykanů bez kyseliny teichové a z tzv. vnější membrány, složené z fosfolipidů, proteinů, lipoproteinů a lipopolysacharidů. Obsah lipidů je příčinou jejich zvýšené odolnosti ke žlučovým kyselinám. Tato odolnost umožňuje vysoký výskyt gramnegativních bakterií, především enterobakterií, ve střevním traktu savců (Šilhánková, 2008).

Kromě trávicího traktu jsou bakterie přirozenou součástí půdní mikroflóry. Můžeme je nalézt prakticky všude, kde se nachází příznivé podmínky pro život, ve vodě, ve vzduchu, v potravinách a potravinářských výrobcích (Trivedi et al., 2010).

Cytoplazmatická membrána, je velmi jemná, tenká membrána, složená z fosfolipidů a proteinů, z níž vybíhají do cytoplazmy vychlípeniny, jejichž počet a velikost jsou závislé na druhu bakterií. Zvláštním typem těchto vychlípenin jsou mezozomy, které se především vyskytují poblíž oblasti, kde se při dělení buňky vytváří přepážka. Mezozomy jsou vytvořeny jedinou membránou, složenou do mnoha záhybů. Cytoplazmatická membrána je sídlem dýchacích enzymů, systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů a konečné fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů. U bakterií, které získávají energii ze světla je také přítomen bakteriochlorofyl, nezbytný pro přeměnu světelné energie v energii chemickou. V cytoplazmatické membráně jsou dále přítomny bílkovinné přenašeče, nutné pro transport látek do buňky a z buňky (Šilhánková, 2008).

Ve středu buňky se nachází nukleoid. Na rozdíl od eukaryotických buněk, není ohraničen jadernou membránou. Nukleoid je složen z chromozomu, dvoušroubovicové kruhové molekuly DNA. Absence jaderné membrány dodává prokaryotické buňce velkou výhodu pro rychlý růst v měnících se podmínkách (Neidhardt, 2004b).

Bakterie se liší svými požadavky na vhodné podmínky. Díky velkému specifickému povrchu je umožněna přeměna látek potřebných k rychlému růstu a dělení (Görner et Valík, 2004).

3.1.1 Růst

Podle Brookse et al. (2010) pokud buňka roste do velikosti v důsledku příjmu vody, ukládání tuku nebo polysacharidů, nelze to považovat za pravý růst. Za pravý růst lze považovat nárůst počtu jedinců, jednobuněčných mikroorganismů, tvořících populaci nebo kulturu.

Adams et Moss (2008) popisují růst jako autokatalycký proces, při kterém je zapotřebí alespoň jedné životaschopné buňky, a jeho rychlost se zvyšuje spolu s přibývajícím množstvím biomasy.

Šilhánková (2008) uvádí, že většina bakterií se rozmnožuje dělením. Pouze několik rodů se rozmnožuje pučením. Dělení je charakterizováno tím, že ve střední části buňky začne z cytoplazmatické membrány vyrůstat prstencovitá vychlípenina, která směřuje dovnitř buňky a vytvoří přepážku. Přepážka rozděluje buňku na dvě zhruba stejně velké části. Přepážka je potom pokryta buněčnou stěnou a z jedné buňky tak vzniknou buňky dvě. Buňky se od sebe oddělí nebo zůstanou v řetízku. Při pučení má dceřiná buňka velmi malé rozměry a postupně dorůstá. S mateřskou buňkou je přitom stále spojena pouze úzkým krčkem.

Rozdělení bakteriální buňky vždy předchází replikace chromozomální DNA. U buněk, které se pomalu rozmnožují, je mezi jednotlivými replikačními cykly DNA časový interval, při němž dochází k syntéze bílkovin a ostatních složek buňky

Celková doba od vzniku dceřiné buňky k jejímu dalšímu rozdělení se nazývá generační doba. Je to doba, za níž dojde ke zdvojnásobení počtu buněk a většinou také ke zdvojnásobení buněčné hmoty. Za optimálních podmínek je generační doba většiny bakterií 10 až 30 minut (Šilhánková, 2008).

Pokud nejsou vnější podmínky příznivé, mohou některé grampozitivní bakterie vytvářet spory. Spory jsou odolné klidové útvary, se sníženým obsahem vody, které neslouží k rozmnožování. Jsou určeny pro přečkání velmi nepříznivých podmínek (pH a teploty) po velmi dlouhou dobu (Neidhardt, 2004b). Jakmile se spory dostanou do vhodného prostředí, nastává klíčení, kdy cytoplazma spor nabobtná absorpcí vody, solí a živin. Obecně z jedné buňky vznikne jedna spora (Trivedi et al., 2010).

Růst mikroorganismů můžeme měřit několika způsoby. Některé metody měří počet buněk, jiné celkovou hmotnost populace, která je často přímo úměrná na počtu buněk. Protože je celkový počet mikroorganismů příliš velký, je většina metod založena na přímém nebo nepřímém počítání menších vzorků, z kterých se určí celková velikost dané populace.

Jednou z nepřímých metod je **turbidimetrie**, která je často používána pro měření růstových křivek (Tortora et al., 2010).

Turbidimetrie je optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích při určité vlnové délce. Zjednodušené tedy turbidimetrie měří stupeň zákalu (turbiditu). Absorpce záření po průchodu nehomogenním prostředím, tj. koloidním roztokem nebo roztokem zakaleným jemnou sraženinou, se měří absorpčními fotometry a spektrofotometry (Štern, 2006). Ve spektrofotometru je paprsek světla přenášen přes bakteriální suspenzi k detektoru. Pokud je počet bakterií vyšší, intenzita dopadajícího světla je nižší (Tortora et al., 2010).

3.1.1.1 Růstová křivka

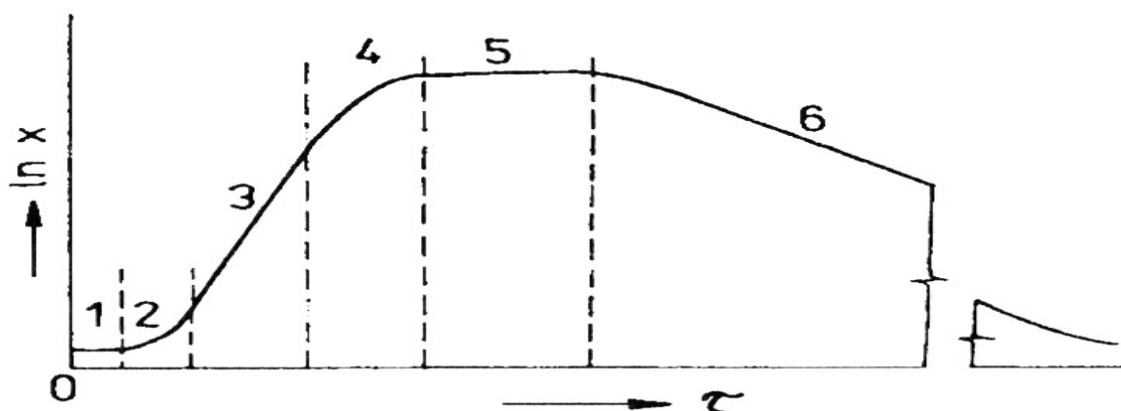
Pro znázornění průběhu bakteriálního růstu se používají tzv. růstové křivky, kdy na osu x nanese čas a na osu y logaritmus počtu živých buněk (Šilhánková, 2008).

Růstovou křivku můžeme rozdělit do 4 základních fází. Po přenesení buněk do nového prostředí, nastává tzv. **lag fáze**. Během této fáze se buňky okamžitě nerozmnožují, ale adaptují se na nové podmínky. Doba, po kterou se adaptují, může trvat hodinu, ale i několik dní. Probíhá syntéza enzymů (včetně různých molekul) za velmi intenzivního metabolismu. Později se buňky začínají dělit a přichází **fáze exponenciálního růstu**, označovaná také jako log fáze. Fáze exponenciálního růstu se vyznačuje krátkou generační dobou, která dosahuje svého konstantního minima. Probíhá velmi intenzivní dělení a tato fáze se využívá pro průmyslové účely (Tortora et al, 2010). Pokud podle Šilhánkové (2008) přeneseme z této fáze buňky do nového prostředí, které se svým složením neliší, buňky pokračují v dělení bez zřetelné lag fáze, tedy po stejnou generační dobu.

Aby byla rychlost růstu konstantní a netrvala pouze několik hodin, je zapotřebí udržovat přijatelnou koncentraci živin a metabolických produktů. Pokud tomu tak není, růst je postupně zpomalován, až se nakonec zastaví. Tato fáze se nazývá **stacionární**. Buňky jsou ve stacionární fázi menší. Liší se nejen velikostí, ale také složením enzymů, které jsou určeny pro přežití v nutričně nepříznivých podmínkách. Jak již bylo zmíněno, některé druhy gram pozitivních bakterií mohou začít vytvářet spory (Neidhardt, 2004a).

Kromě nedostatku živin, omezují růst nahromaděné metabolity a s tím související změny např. pH. Poslední fází je tzv. **fáze smrti**, kdy počet mrtvých buněk je vyšší, jak nově vzniklých (Tortora et al, 2010).

Obr. 1. Růstová křivka (Šilhánková, 2008)



τ - doba (h), x - počet živých buněk v 1 ml, 1 - lag fáze, 2 - fáze zrychleného růstu, 3 - exponenciální fáze, 4 - fáze zpomaleného růstu, 5 - stacionární fáze, 6 - fáze smrti

3.1.1.2 Vnější prostředí

Životní činnost mikroorganismů i jejich vývoj jsou závislé na vnějším prostředí. Aby se mohly mikroorganismy rozmnožovat, musí být v prostředí jak dostatečné množství živin pro syntézu buněčné hmoty spolu s dostatečným množstvím využitelné energie, tak i vhodné fyzikální, chemické a biologické podmínky. Mikroorganismy jsou ovšem schopny se přizpůsobit vnějším podmínkám nejen změnou enzymového vybavení, ale mohou do určité míry změnit složení i tvar buněk, aby byly vůči nepříznivým podmínkám odolnější (Šilhánková, 2008).

Tortora et al. (2010) rozdělují požadavky mikroorganismů na vnější prostředí do 2 hlavních kategorií, fyzikální (teplota, pH, osmotický tlak) a chemické (zdroje uhlíku, dusíku, síry, fosforu, kyslíku, stopových prvků a organických růstových faktorů).

3.1.1.2.1 Fyzikální požadavky

- **Teplota**

Teplota je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů. Rozeznáváme tři základní body teploty: minimální teplotu, tj. nejnižší teplota, při které se daný druh, rozmnožuje ještě zjištěnou rychlostí; optimální, při níž se rozmnožuje největší rychlostí; a maximální teplotu, což je nejvyšší teplota, při které je daný mikroorganismus schopen se ještě rozmnožovat. Všechny tři zmíněné body mohou být

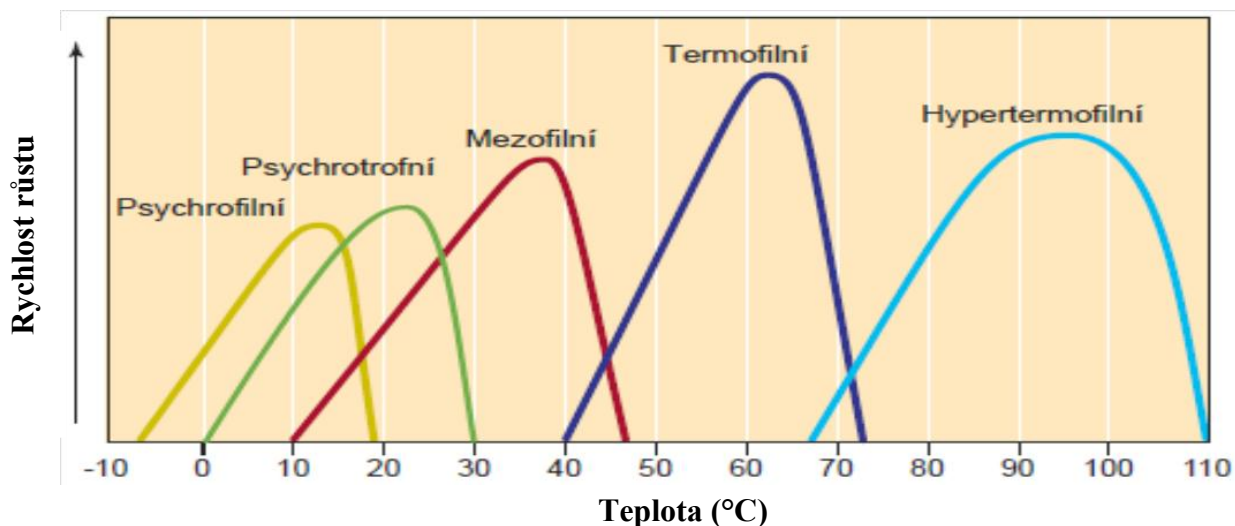
do značné míry ovlivněny dalšími vnějšími faktory, jako je např. pH a osmotický tlak prostředí.

Minimální teplota je určena enzymem, jehož aktivita je nejcitlivější k nízkým teplotám. V teplotním rozmezí mezi minimální a optimální teplotou se v buňce s rostoucí teplotou zvyšuje rychlost všech procesů, a tedy i rychlost rozmnožování. Při vyšších teplotách je prudký pokles růstu způsoben denaturací určitých enzymů, jež jsou pro růst nezbytné. Zvýšením nebo snížením teploty, od teploty optimální, tedy dochází k poklesu rychlosti rozmnožování a může dojít až k jeho úplnému zastavení a usmrcení buněk. Optimální teplota je obvykle asi o 30 °C vyšší než teplota minimální, zatímco maximální teplota ji převyšuje o 5 až 10 °C (Šilhánková, 2008).

Podle vztahu k teplotě, rozdělujeme mikroorganismy do několika skupin, psychrofilní, mezofilní, termofilní a hypertermofilní. Nejrozšířenější skupinou mikroorganismů jsou mezofilové, jejichž optimum leží kolem 30 °C a jsou součástí teplokrevných živočichů. Psychrofilové mají optimum mezi 15 až 20 °C, zatímco termofilové mezi 50 až 60 °C. Některé termofilní bakterie, označované jako hypertermofilní, mohou růst i při teplotách nad 100 °C (Brooks et al., 2010).

Adams et Moss (2008) rozlišují psychrofilní mikroorganismy ještě na psychrotrofní, jež mají optimum vyšší (25 - 30 °C) a nerostou při nižších teplotách. Oproti tomu psychrofilové nerostou nad 20 °C a nachází se v polárních oblastech či mořském prostředí.

Obr. 2 Vliv teploty na rychlost růstu rozdílných mikroorganismů (Pommerville, 2010).



- **pH**

Termín pH znamená potenciál vodíku a vyjadřuje záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů. Jedná se tedy o logaritmickou stupnici s rozsahem hodnot

od 0 do 14. Hodnota 7 vyjadřuje neutrální prostředí (např. voda). Kyselé prostředí má hodnotu nižší, a čím je hodnota nižší, tím je prostředí kyselejší, např. žaludeční šťávy mají pH v rozmezí 1 - 2. Prostředí s vyšším pH jak 7 se označuje jako zásadité, zásaditý je např. čpavek pro domácí použití o pH 11,5.

Většina bakterií roste nejlépe v pH blízkému neutralitě mezi 6,5 až 7,5. Plísně a kvasinky mají větší rozsah pH než bakterie. Obecně mají plísně a kvasinky pH nižší, obvykle v rozmezí 5 až 6. Acidofilní bakterie rostou i při nižším pH. Pokud jsou bakterie kultivovány v laboratorních podmínkách, produkují kyseliny, které snižují pH a tím omezují jejich růst. Proto jsou součástí růstových médií tzv. pufrů, které vyrovnávají tyto změny. Jako pufrů slouží peptony a aminokyseliny. Některá média mohou obsahovat také fosfátové soli, které mají tu výhodu, že poskytují pufrovací účinek v rozmezí růstu většiny bakterií, jsou netoxické a dodávají fosfor jako živinu (Tortora et al., 2010).

- **Osmotický tlak**

Mikroorganismy jsou z 80 až 90 % složeny z vody a téměř veškeré živiny přijímají z okolního prostředí ve formě roztoku. Voda je tedy nezbytnou součástí pro správný růst. Koncentrace rozpuštěných látek ve vodě udává osmotický tlak.

Pokud je v prostředí koncentrace rozpuštěných látek vyšší jak v buňce, tzv. hypertonické prostředí, působí na buňku vyšší osmotický tlak. Z buňky se uvolňuje voda a smršťuje se buněčná cytoplazma, což může mít za následek odchlípení cytoplazmatické membrány od buněčné stěny. Tento jev se nazývá plazmolýza a může vést k zániku buňky. Uvolněním vody se vyrovnává koncentrace rozpuštěných látek mezi buňkou a vnějším prostředím. Pokud je koncentrace mezi buňkou a vnějším prostředím vyrovnaná, hovoříme potom o izotonickém prostředí.

Většina bakterií žije v hypotonickém prostředí, kdy koncentrace rozpuštěných látek je v buňce vyšší. Bakterie se slabší buněčnou stěnou, především gramnegativní bakterie, se v důsledku nadměrného příjmu vody postupně zvětšují, dokud neprasknou. Dochází k tzv. plazmoptýze (Tortora et al., 2010).

3.1.1.2.2 Chemické požadavky

Podle způsobu přijímání živin rozlišujeme bakterie autotrofní a heterotrofní. Autotrofním bakteriím stačí k výživě anorganické sloučeniny. Některé autotrofní bakterie, nazývané jako fototrofní, jsou vybaveny fotosyntetickým pigmentem,

tzv. bakteriochlorofylem. Bakteriochlorofyl využívají k přeměně světelné energie v energii chemickou. Druhou skupinou autotrofních bakterií jsou bakterie chemotrofní, které získávají energii oxidací chemických sloučenin.

Heterotrofní bakterie, na rozdíl od autotrofních, nejsou vybaveny fotosyntetickým pigmentem. Pomocí enzymů získávají energii rozkladem organických sloučenin na přijatelnější formu, kterou vstřebají (Trivedi et al., 2010).

- **Uhlík**

Společně s vodou, je jedním z nejdůležitějších faktorů příjem uhlíku. Uhlík je součástí organických sloučenin a tvoří až polovinu suché hmotnosti bakterií. Zdrojem uhlíku pro chemoheterotrofní bakterie je organická látka (cukry, lipidy a proteiny), zatímco pro chemoautotrofní a fototrofní oxid uhličitý (Tortora et al., 2010).

- **Dusík, síra, fosfor**

Pro syntézu buněčné hmoty jsou zapotřebí i další prvky. Např. pro syntézu proteinů je zapotřebí značné množství dusíku. Dusík, společně s fosforem, se také podílí na syntéze genetického materiálu, DNA a RNA. Kromě toho, je fosfor také důležitou součástí syntézy ATP a fosfolipidů buněčných membrán. ATP je molekula, která se účastní buněčných pochodů, umožňuje přenos a uskladnění energie. Síra je potřebná k syntéze sirných aminokyselin a vitaminů, např. thiaminu a biotinu.

Bakterie mohou získávat dusík několika způsoby. Mnoho bakterií získává dusík rozkladem organického materiálu. Jiné přijímají dusičnanů nebo amoniakových iontů, které jsou již v redukované formě, vhodné pro syntézu aminokyselin a následně proteinů. Některé bakterie jsou schopny fixace dusíku z atmosféry. Bakterie schopné fixovat vzdušný dusík nalezneme volně žijící v půdě nebo v symbióze na kořenech bobovitých rostlin. Jsou nepostradatelnou součástí koloběhu dusíku v přírodě. Přírodním zdrojem síry je sulfátový anion, sulfan a sirné aminokyseliny. Zdrojem fosforu je fosfátový anion (Tortora et al., 2010).

- **Kyslík**

Kyslík má významný vliv na oxidačně redukční potenciál, který je dán přítomností oxidačních nebo redukčních činidel. K nejdůležitějším oxidačním činidlům patří kyslík, dusičnany, železité ionty, peroxidy, zatímco k nejčastěji se vyskytujícím redukujícím činidlům patří železnaté ionty, vodík, sloučeniny se sulfohydrylovou skupinou nebo s reaktivními dvojnými vazbami. Redukující látky vedou k negativnímu potenciálu,

zatímco oxidační k pozitivnímu. Mikroorganismy pro svůj růst vyžadují různý oxidačně redukční potenciál, a proto se značně liší vztahem ke kyslíku. Podle požadavků na kyslík rozděluje mikroorganismy na aerobní, anaerobní, mikroaerofilní a fakultativně anaerobní (Šilhánková, 2008).

Aerobní mikroorganismy mají vyvinutý pouze aerobní metabolismus a pro svůj růst vyžadují přítomnost kyslíku, tedy pozitivní oxidačně redukční potenciál. V důsledku aerobního metabolismu a spotřeby kyslíku klesá oxidačně redukční potenciál prostředí. Snížením oxidačně redukčního potenciálu se vytváří vhodné podmínky pro **anaerobní** mikroorganismy, které mají anaerobní metabolismus a kyslík ke svému růstu nevyžadují. Kyslík na ně působí inhibičně nebo toxicky. Je proto zapotřebí pro ně vytvořit anaerobní podmínky, a to snížením oxidačně redukčního potenciálu prostředí, odstraněním kyslíku varem nebo přidávkem redukčních látek (cystein, askorbová kyselina, thioglykolát sodný). Některé bakterie mléčného kvašení mají anaerobní metabolismus, avšak nízké koncentrace kyslíku urychlují jejich rozmnožování. Tyto mikroorganismy se nazývají **mikroaerofilní**. Příkladem mikroaerofilních bakterií je např. rod *Lactobacillus*, který je také řazen mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy. **Fakultativně anaerobní** mikroorganismy jsou schopny aerobního i anaerobního metabolismu. Díky tomu jsou schopny růstu jak za přítomnosti, tak i nepřítomnosti kyslíku. Za aerobních podmínek se většinou rozmnožují rychleji, protože aerobní metabolismus účinněji přeměňuje substrát v energii, a tím poskytuje mnohem více energie pro růst buněk než metabolismus anaerobní (Šilhánková, 2008).

3.1.2 Anaerobní bakterie

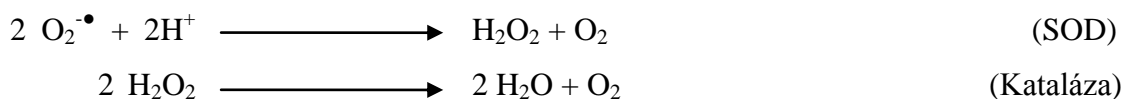
Podle Gerardi (2003) můžeme anaeroby rozdělit na druhy tolerantní vůči přítomnosti volného kyslíku a druhy netolerantní, tzv. striktní anaeroby. Bakterie, které jsou vůči kyslíku odolnější, mohou během vystavení aerobním podmínkám přežít, ovšem během této doby jsou pozastaveny buněčné procesy. Nicméně pokud jsou krátkodobě vystaveny aerobním podmínkám, mohou po obnovení anaerobního prostředí pokračovat v růstu, zatímco striktně anaerobní bakterie v přítomnosti kyslíku nepřežijí (Brioukhanov et Netrusov, 2007).

Aerobní mikroorganismy, na rozdíl od anaerobních, využívají během respirace molekulární kyslík pro získání energie, potřebné k dalším buněčným procesům. Proto pro boj s tzv. oxidačním stresem vyvinuly silné obranné mechanismy (Kurtz, 2003). Během dýchání totiž vznikají velmi toxické reaktivní formy kyslíku, superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové

radikály, které mohou poškodit buněčnou DNA, RNA, membránové lipidy a proteiny. K neutralizaci těchto reaktivních forem, využívají aerobní mikroorganismy enzymy, superoxid dismutázy (SOD), peroxidázy a katalázy (Yamamoto et al., 2011). Kromě enzymů se na obraně proti oxidačnímu stresu podílí ještě proteiny thioredoxin, glutaredoxin a molekuly jako glutathion (Cabiscol et al., 2000).

Podle Tortory et al. (2010) postrádají striktně anaerobní bakterie zmíněné enzymy pro neutralizaci toxických forem kyslíku, zatímco méně striktní anaerobní bakterie jsou vybaveny jedním z těchto enzymů. Brioukhanov et Netrusov (2007) dodávají, že striktně anaerobní bakterie s vyšší aktivitou SOD a katalázy se vyznačují větší odolností vůči kyslíku.

Reakce superoxid dismutázy (SOD) a katalázy:



(Adams et Moss, 2008).

Anaerobní bakterie získávají energii anaerobní respirací. Při aerobní respiraci je koncovým akceptorem elektronu kyslík, zatímco při anaerobní respiraci je akceptorem jiná anorganická látka. Některé bakterie využívají jako akceptor elektronu dusičnanový iont (NO_3^-), jiné zase síranový (SO_4^{2-}) nebo uhličitanový (CO_3^{2-}) anion. Dusičnan je postupně redukován přes dusitan, oxid dusný až na plynný dusík (N_2). Síranový anion je redukován na sulfan (H_2S) a uhličitan za vzniku metanu. Anaerobní respirace je tedy nezbytnou součástí koloběhu prvků. Během ní je zisk energie menší, oproti respiraci aerobní, kdy při oxidaci glukózy, za vzniku oxidu uhličitého a vody, je čistý energetický zisk 36 molekul ATP. V souladu s tím mají anaerobní bakterie tendenci růst pomaleji, než bakterie aerobní (Tortora et al., 2010).

Základním anaerobním katabolickým procesem sacharolytických mikroorganismů je tzv. glykolýza. Glykolýza spočívá v přeměně hexos (glukosy, fruktosy, mannosy nebo galaktosy) a její úsek k pyruvátu ($\text{CH}_3\text{-CO-COO}^-$). Při odbourávání molekuly hexosy je čistý zisk pouze 2 molekuly ATP. Pyruvát je pak dále metabolizován za anaerobních podmínek u různých mikroorganismů odlišným způsobem. Např. některé mléčné bakterie rodu *Lactobacillus* přeměňují pyruvát na kyselinu mléčnou, rod *Clostridium* zase na kyselinu máselnou za vzniku dalších metabolitů. Existují však i některé anaerobní proteolytické bakterie, pro něž jsou zdrojem energie proteiny a jejich štěpné produkty - aminokyseliny. Z rodu *Clostridium* sem patří především *C. histolyticum*. Proteolytické bakterie získávají energii rozkladem aminokyselin na amoniak, oxid uhličitý a nižší mastné kyseliny o jednom

až čtyřech uhlících. U většiny proteolytických kmenů rodu *Clostridium* však přítomnost sacharidů v prostředí vyvolává intenzivnější růst a urychluje rozklad bílkovin (Šilhánková, 2008).

V následujících kapitolách jsou podrobněji popsány bakteriální rody, jejichž růstové křivky byly měřeny v praktické části diplomové práce. Z anaerobních bakterií rody *Clostridium* a *Bifidobacterium*, z fakultativně anaerobních rod *Lactobacillus*.

3.1.2.1 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie byly izolovány již roku 1900 v Německu ze stolice kojenců. V té době byly označeny jako *Bacillus bifidus*. Zpočátku nebyly dostatečně popsány jejich fyziologické vlastnosti a tak byla jejich taxonomie naprosto nedostatečná. Ještě v šedesátých letech devatenáctého století byl popsán pouze *Lactobacillus bifidus*, přestože roku 1924 byla uznána existence samostatného rodu *Bifidobacterium* Orla Jensenem (Maxa et Rada, 1996). V současnosti je identifikováno přibližně 38 druhů bifidobakterií (Ventura et al., 2012).

Podle morfologie jsou bifidobakterie nesporulující, grampozitivní, striktně anaerobní, pleomorfní tyčinky, často ve tvaru Y. Optimální teplota pro bifidobakterie se pohybuje v rozmezí 37 a 41 °C, optimální pH je mezi 6,5 - 7 (Roy, 2003). Ventura et al. (2004) dodávají, že buňky vykazují vysoký buněčný pleomorfismus za nepříznivých podmínek a některé druhy mohou tolerovat nízké koncentrace kyslíku.

Při přechodu z anaerobních podmínek do aerobních byly u bifidobakterií zaznamenány 3 typy reakcí. První je růst bez hromadění H₂O₂. Kmen *B. bifidum* je do určité míry aerotolerantní a vytváří malé množství peroxidu, přestože postrádá katalázu. Absence peroxidu vodíku může být příčinou neznámého peroxidázového systému (Ballongue, 2004). Ve své studii Kawasaki et al. (2006) zjistili, že *B. boum* a *B. thermophilum* vykazovali mikroaerofilní růst bez hromadění peroxidu vodíku. *B. bifidum* a *B. longum* zastavili růst při vyšší koncentraci kyslíku, ale po přidání katalázy do média pokračovali v růstu. Podle Ballongue (2004) souvisí množství H₂O₂ s přítomností NADH peroxidázy.

Druhým typem reakce je omezený růst spolu s vyšším množstvím H₂O₂. Peroxid je považován za toxický pro klíčový enzym metabolismu cukrů (Ballongue, 2004). Klíčovým enzymem pro glykolytické fermentace u bifidobakterií je fruktóza - 6 - fosfát fosfoketoláza, která slouží jako taxonomický znak při identifikaci rodu. Během fermentace produkují kyselinu mléčnou a octovou, netvoří CO₂. Ze dvou molekul hexós vzniká kyselina mléčná a octová v poměru 2 : 3 (Gomes et Malcata, 1999). Poslední reakcí v aerobních podmínkách

je zastavený růst, přestože nedochází k nahromadění H₂O₂. Pro tyto kmeny bifidobakterií je optimální prostředí s nízkým redoxním potenciálem (Ballongue, 2004).

Za přirozené prostředí bifidobakterií se považuje trávicí trakt savců, včetně člověka (Ventura et al., 2006), ale můžeme je naléznout i u hmyzu a pravděpodobně důsledkem kontaminace z původního zdroje, trávicího traktu, byly bifidobakterie nalezeny také v odpadních vodách a krvi (Turroni et al., 2011).

Tab. 1: Přehled jednotlivých druhů bifidobakterií a jejich původ (Ventura et al., 2004).

Druh	Původ
<i>B. adolescentis</i>	TT dospělých lidí
<i>B. angulatum</i>	TT dospělých lidí
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	TT zvířat
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	jogurt
<i>B. asteroides</i>	TT včel
<i>B. bifidum</i>	TT dětí
<i>B. bombi</i>	TT čmeláka
<i>B. boum</i>	bachor skotu
<i>B. breve</i>	TT dětí
<i>B. catenulatum</i>	TT dospělých lidí
<i>B. choerinum</i>	TT prasat
<i>B. coryneforme</i>	TT včel
<i>B. crudilactis</i>	syrové mléko
<i>B. cuniculi</i>	TT králíků
<i>B. dentium</i>	ústní dutina lidí
<i>B. gallicum</i>	TT lidí
<i>B. gallinarum</i>	TT kuřat
<i>B. indicum</i>	TT včel
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	TT dětí
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	TT dospělých lidí
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i>	TT prasat
<i>B. magnum</i>	TT králíků
<i>B. merycicum</i>	bachor hovězího dobytka
<i>B. minimum</i>	odpadní kaly
<i>B. pseudocatenulatum</i>	TT dětí
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	bachor hovězího dobytka
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>	TT prasat
<i>B. psychraerophilum</i>	TT prasat
<i>B. pullorum</i>	TT kuřat
<i>B. ruminantium</i>	bachor hovězího dobytka
<i>B. saeculare</i>	TT králíků
<i>B. scardovii</i>	lidská krev
<i>B. subtile</i>	odpadní kaly
<i>B. thermophilum</i>	TT prasat
<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>porcinum</i>	TT prasat
<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>thermacidophilum</i>	odpadní kaly

TT - trávicí trakt.

3.1.2.1.1 Význam

Bifidobakterie jsou součástí tzv. prospěšné střevní mikroflóry, která má příznivý vliv na zdraví hostitele (Léké et al., 2007). Bifidobakterie hrají důležitou roli pro udržení příznivých podmínek ve střevě, kde kromě působení na optimální složení střevní flóry, inhibují tvorbu hnilobných látek a zmírňují zácpu nebo průjem. Jak bylo zmíněno dříve, bifidobakterie kromě kyseliny mléčné produkují také kyselinu octovou, která má silné baktericidní účinky vůči zdraví škodlivým bakteriím (Ishibashi et al., 1997). Produkce kyseliny mléčné a octové má inhibiční účinek např. na *Clostridium albicans*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* a *Staphylococcus aureus* (Fliss et al., 2010).

Kromě snižování pH produkcí kyselin a bránění adhezi patogenů, se bifidobakterie podílí také na syntéze vitaminů a trávicích enzymů (Vandeplas et al., 2008). Podle Deguchi et al. (1985) mohou bifidobakterie syntetizovat thiamin, pyridoxin, riboflavin, kobalamin, kyselinu listovou a nikotinovou. Koncentrace kyseliny listové a nikotinové, spolu s thiaminem se výrazně liší mezi druhy či kmeny. Produkci enzymů laktázy a galaktosidázy mohou zlepšit stravitelnost mléčných produktů a tím i toleranci vůči laktóze (Reyed, 2007).

Významnou roli mají bifidobakterie po narození, kdy dochází k osídlení trávicího traktu. Podle Yoshioky et al. (1991) u kojenců tvoří bifidobakterie více než 95 % střevní mikroflóry. Ishibashi et al. (1997) dodávají, že zvýšená rezistence proti infekcím u kojenců může být z části přičtena právě bifidobakteriím.

S věkem však dochází ke změně počtu bifidobakterií v trávicím traktu. Jejich počet klesá v důsledku změn výživy a životního stylu (Jardine, 2009). Podle Rowlanda et Gilla (2008) bylo prokázáno, že nižší počet bifidobakterií vede ke zvýšenému riziku infekcí a některých chronických degenerativních onemocnění, především u starších lidí. Kromě poklesu počtu bifidobakterií se s věkem mění i jejich druhové zastoupení. Druhy *B. infantis*, *B. breve* a *B. bifidum* dominují ve střevech kojenců, zatímco *B. adolescentis* a *B. cantelanum* převládají u dospělých lidí (Léké et al., 2007).

V současnosti jsou bifidobakterie uváděny na trh ve formě probiotik, určených pro lidskou spotřebu. Bifidobakterie jsou schopny uplatnit své příznivé účinky prostřednictvím interakce s hostitelskými buňkami, zejména enterocyty a imunitními buňkami (González - Rodríguez et al., 2013). Po požití bifidobakterie přispívají k příznivému složení mikroflóry tlustého střeva a slouží tak jako prevence před onemocněním a infekcemi trávicího

traktu (Ishibashi et al., 1997). Některé nepřímé důkazy naznačují možnou úlohu bifidobakterií při prevenci rakoviny (Goderska et Stanton, 2010).

3.1.2.2 Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* patří mezi jeden z největších rodů prokaryota a poprvé byl popsán roku 1880 Prazmowskim (Andreesen et al., 1989). Klostridie jsou heterogenní skupinou bakterií, které mají málo společných znaků. Jedná se o anaerobní, grampozitivní tyčinky, tvořící endospory (Mitchell, 2001). Nicméně toto zobecnění má určité výjimky. Podle Wellse et Wilkinse (1996) některé klostridie mohou být gramnegativní či aerotolerantní, např. *C. carnis*, *C. histolyticum*, *C. tertium* rostou i v aerobních podmínkách.

Rozsah optimálních podmínek je dán rozmaností klostridií. Většina klostridií je neutrofilních s optimálním pH mezi 6,5 a 7. Nicméně některé kmeny se adaptovaly na vyšší nebo nižší pH díky svým metabolickým schopnostem. Např. purinolytické kmeny uvolňují značné množství amoniaku během degradace heterocyklických sloučenin. Tyto kmeny mají optimální pH 8. Na druhou stranu klostridie, které v průběhu růstu produkují kyseliny (*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. thermoaceticum*) snižují pH k hodnotám 4 - 5. Mimořádně široký je rozsah teplotního optima od psychrofilních po termofilní druhy. Většina klostridií je mezofilních, jejichž optimální teplota je 30 - 40 °C. Termofilní klostridie (60 - 70 °C) přitahují pozornost díky svým termostabilním enzymům. Méně početná je skupina psychrofilních klostridií. Za psychrofilní lze považovat *C. estherticum* a *C. putrefaciens*, které mají optimum pod 25 °C (Mitchell, 2001).

Většina klostridií se řadí mezi heterotrofní organismy. Mohou být sacharolytické, proteolytické či obojí. Vedle toho klostridie vykazují schopnost metabolizovat velmi širokou škálu organických molekul, včetně cukrů a jiných sacharidů, organických kyselin, alkoholů, aromatických sloučenin, aminokyselin, aminů, purinů a pyrimidinů (Mitchell, 2001). Některé druhy jsou také schopny fixovat atmosférický dusík (Linhová, 2011).

Klostridie jsou velice rozsáhlým rodem, jehož zástupci se vyskytují na mnoha místech s různými zdroji energie a uhlíku (sedimenty, půda, trávicí trakt, komposty atd.), proto mají klostridie rozdílný metabolismus a enzymatickou výbavu. Jako zdroj uhlíku a energie využívají klostridie převážně sacharidy (některé druhy jsou schopny využít i glycerol), které jsou v první řadě metabolizovány na organické kyseliny a následně na aceton, butanol a etanol (Linhová, 2011).

Polysacharidy jako je celulóza, xylan, škrob a pektin, které jsou součástí rostlinné biomasy, jsou nejprve rozloženy pomocí extracelulárních enzymů či enzymových komplexů na nízkomolekulární látky, které jsou následně buňkou vstřebány (Mitchell, 2001).

Fermentace hexos je u klostridií rozdělena na dvě části, acidogenní a solventogenní. Během první fáze buňky rychle rostou a produkují karboxylové kyseliny (máselnou a octovou) spolu s vodíkem a CO₂. V solventogenní fázi se produkce kyselin a vodíku snižuje, zpomaluje se růst buněk a pH média se zvýší v závislosti na množství spotřebovaných kyselin. Převážná část kyseliny máselné je redukována na butanol, zatímco u kyseliny octové je to přibližně 55 %, zbytek je dekarboxylován na aceton a CO₂. Předpokládá se, že přechod metabolismu z acidogenního na solventogenní je odpovědí buněk na nepříznivé podmínky, konkrétně nízké pH (Linhová, 2011).

Macfarlane et Gibson (1997) uvádějí, že z jedné molekuly hexósy vznikají dvě molekuly pyruvátu spolu s produkcí NADH a ATP. Dalšími reakcemi z pyruvátu vzniká především kyselina octová, mléčná a máselná. Berezina et al. (2008) dodávají, že klostridie, které produkují aceton, butanol, etanol a isopropanol, včetně kyseliny máselné a octové spolu s vedlejšími produkty, jsou pojmenované jako solventogenní, ke kterým se řadí *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutyacetonicum*, *C. saccharobutylcum* a *C. ljungdahlii*.

Pro klostridie je charakteristická tvorba spor. Ke sporulaci klostridií nejčastěji dochází na konci exponenciální fáze růstu a trvá přibližně 10 hodin v závislosti na kmenu a podmínkách sporulace (Linhová, 2011). Poloha spor je u klostridií užitečná při určování druhů. Některé druhy však nesporulují, dokud nejsou vystaveny méně příznivým podmínkám (Wells et Wilkins, 1996). Endospory jsou buď v poloze centrální, subterminální nebo na okraji buňky (Andreesen et al., 1989).

3.1.2.2.1 Význam

Klostridie nacházejí především uplatnění v průmyslu. Průmyslové využití mají sacharolytické druhy *C. acetobutylicum* a *C. butyricum*, které se používají pro kvasnou výrobu kyseliny máselné a první z nich také pro výrobu butanolu a acetonu kvasnou cestou (Šilhánková, 2008). *C. acetobutylicum* spolu s *C. beijerinckii* jsou nejčastěji využívané druhy pro produkci rozpouštědel (Linhová, 2011).

Některé druhy rodu *Clostridium* produkují velmi nebezpečné toxiny. Z potravinářského hlediska je nejdůležitější *C. botulinum*, protože produkuje

tzv. botulotoxiny, které patří k nejučinnějším jedům. Dalším druhem produkující toxin je *C. perfringens*. Otrava však nastává pouze při silné kontaminaci potravin touto bakterií. Toxin se tvoří během sporulace, která probíhá většinou až ve střevním traktu člověka. Vnikne - li *C. perfringens* do hluboké rány, způsobuje bolestivou plynou sněť, která často končí smrtí. Stejně tak *C. tetani* se může pomnožit v hlubokých ranách a vytvářet neurotoxin, který difunduje do nervového systému a způsobuje smrt. Úmrtnost je zde 100% (Šilhánková, 2008).

Mezi významné patogeny trávicího traktu patří *C. difficile*, který během své replikace vylučuje cytotoxin a enterotoxin. Pokud je narušena střevní flóra podáváním antibiotik, může dojít k jeho přemnožení. *C. difficile* je součástí běžné střevní flóry dospělých lidí (do 3 %) a svou patogenitou způsobuje onemocnění od průjmů až po zánět tlustého střeva (Wells et Wilkins, 1996). Podle Seki et al. (2003) má *C. butyricum* (který je v Japonsku součástí probiotik) příznivý vliv na obnovu narušené střevní flóry během léčby pomocí antibiotik a zmírňuje tak průjmové onemocnění. Woo et al. (2011) obdobně uvádějí, že *C. butyricum* snižuje toxicitu *C. difficile*. Detoxikační účinek je pravděpodobně způsoben inhibicí produkce bílkovinných toxinů *C. difficile*. Dále autoři uvádějí, že snížení pH produkcí organických kyselin inhibuje růst, metabolismus a toxicitu *C. difficile*.

Neobvyklým patogenem u lidí je *C. tertium*, který je spojován s bakteriemií, meningitidou, septickou artritidou, enterokolitidou, bakteriální peritonitidou, posttraumatickým abscesem mozku a zápalom plic (Ray, 2003). Od ostatních klostridií se odlišuje tím, že neprodukuje toxiny a je aerotolerantní (Miller et al., 2001).

3.1.2.3 Rod *Lactobacillus*

První popis rodu *Lactobacillus* se datuje do roku 1901, kdy Martinus Willem Beijerinck takto pojmenoval bakterie s podobnými morfologickými a fenotypovými vlastnostmi, které byly izolovány z různě prokvašených materiálů (Barinov et al., 2011). Později, roku 1919 byl rod reorganizován Orla Jensenem do třech skupin (*Betabacterium*, *Streptobacterium* a *Thermobacterium*), které nemají taxonomický význam, jelikož nejsou fylogeneticky definované. Některé nově identifikované druhy laktobacilů nebylo totiž možné umístit do těchto tradičních skupin. Proto byly později názvy skupin ponechány, ale bez definovaných teplot a morfologických znaků (Görner et Valík, 2004).

Rod *Lactobacillus* zahrnuje různorodou skupinu druhů nacházejících se v různých prostředích, počínaje rostlinami a fermentovanými potravinami přes trávicí trakt, dutinu ústní a vaginu. Jedná se o grampozitivní, nesporulující tyčinky, které patří do heterogenní skupiny

bakterií mléčného kvašení (Barinov et al., 2011). Většina druhů je fakultativně anaerobních nebo mikroaerofilních a při fermentaci glukózy produkují kyselinu mléčnou. Neredukují dusičnan na dusitan, neprodukují H₂S. Kataláza a oxidáza jsou negativní (Darbro et al., 2009).

Všeobecně jsou laktobacily acidotolerantní až acidofilní. Nejlépe rostou v slabě kyselých médiích s počáteční hodnotou pH 6,4 až 4,5. Při fermentaci sacharidů za tvorby kyselin snižují kyselost prostředí až pod pH 4. Růst laktobacilů se zastavuje při poklesu pH na hodnotu 4 - 3,6. Hlavním metabolitem při fermentaci sacharidů je kyselina mléčná, ale produkují i kyselinu octovou, etanol a CO₂. Vedle mírně kyselého prostředí roste většina laktobacilů nejlépe při mezofilních teplotách s horní hranicí 40 °C (Görner et Valík, 2004). Podle Ahmeda et al. (2006) mohou růst i v rozmezí nižších (5 °C) a vyšších teplot (53 °C) v závislosti na druhu.

Na základě fenotypových a biochemických vlastností, byly laktobacily rozděleny do tří skupin podle typu kvašení na obligátně homofermentativní a heterofermentativní a fakultativně heterofermentativní (Lee, 2009). Obligátně homofermentativní produkují při zkvašování hexos prakticky pouze kyselinu mléčnou a nezksvašují pentosy, zatímco fakultativně heterofermentativní zkvašují vedle hexos také pentosy za produkce kyseliny mléčné a octové (Adams et Moss, 2008). Podle Görnera et Valíka (2004) fermentaci pentós umožňuje indukovaná fosfoketoláza. Některé druhy při nedostatku glukosy spolu s kyselinou octovou produkují etanol a kyselinu mravenčí. Obligátně heterofermentativní při zkvašování hexos produkují vedle kyseliny mléčné také etanol a CO₂ (Lee, 2009). Görner et Valík (2004) uvádějí ještě produkci kyseliny octové. Pentózy zkvašují na kyselinu mléčnou a octovou.

Tab. 2 Rozdělení laktobacilů podle Görnera et Valíka (2004).

Obligátně homofermentativní	Fakultativně heterofermentativní	Obligátně heterofermentativní
<i>L. delbrüeckii</i> ssp. <i>delbrüeckii</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. bifermantas</i>
<i>L. delbrüeckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrüeckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplantarum</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	<i>L. confusus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. divergens</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. maltaromaticus</i>	<i>L. fructivorans</i>
<i>L. yamanashiensis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. halotolerans</i>
	<i>L. sake</i> (<i>L. bavaricus</i>)	<i>L. kandleri</i>
		<i>L. kefir</i>
		<i>L. reuteri</i>
		<i>L. sanfrancisciscensis</i>
		<i>L. viridescens</i>

3.1.2.3.1 Význam

Laktobacily jsou saprofytní, velmi zřídka patogenní mikroorganismy. Jsou součástí trávicího traktu lidí a zvířat jako komenzálové mukózního povrchu epitelu. Nejvýznamnějším druhem je pravděpodobně *L. acidophilus*, používaný k výrobě acidofilního mléka, jemuž je připisován blahodárny účinek na zdraví lidí a zvířat. *L. salivarius* je pravděpodobně nejtypičtějším druhem ústní dutiny, ale nachází se i ve střevech. Jiné druhy laktobacilů se více či méně izolují z přírodních lokalit. V bachoru přežvýkavců byly popsány anaerobní druhy *L. ruminis* a *L. vitulinus*.

Pozitivní vlastnosti laktobacilů jsou spojeny s produkcí kyseliny mléčné a octové, které jsou v kyselém prostředí málo disociované a v tomto stavě spolu s nižším pH působí inhibičně až mikrobicidně na mikroorganismy v prostředí, s výjimkou jiných bakterií mléčného kvašení a kvasinek. Tyto vlastnosti laktobacilů se uplatňují v trávicím traktu a jsou využívány v potravinářské technologii (Görner et Valík, 2004).

V pochvě produkují laktobacily kyselinu mléčnou přeměnou glykogenu, kde tak dochází k okyselení poševního prostředí. Produkují také peroxid vodíku a bakteriociny, tedy látky, které úspěšně brání růstu ostatních bakterií (Koliba, 2012). Laktobacily tak hrají důležitou roli při ochraně před urogenitálními infekcemi (Vásquez et al., 2002). K obnovení přirozeného osídlení pochvy se nejčastěji používají *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* a *L. paracasei* (Koliba, 2012).

Tradičně jsou laktobacily využívány pro fermentaci mléka, masa, zeleniny a těst. V dnešní době se také hojně využívají pro přípravu probiotických preparátů (Sedláčková et al., 2011). V Evropě je pravděpodobně nejpoužívanější probiotickou bakterií v potravinách *L. rhamnosus* (Jardine, 2009). *L. rhamnosus* působí preventivně proti rotavirovým infekcím a průjmům, které jsou závažné pro kojence a malé děti (Wu et al., 2013). V humánních probiotikách dominuje zejména *L. acidophilus* a *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *L. acidophilus* má široké antimikrobiální spektrum účinnosti, působí jak proti grampozitivním, tak proti gramnegativním bakteriím (Maxa et Rada, 1997). Podle studie Sedláčkové et al. (2011) vykazuje kmen *L. acidophilus* vyšší autoagregační schopnosti v porovnání s izolovanými kmeny laktobacilů z trávicího traktu. Může tak lépe přilnout ke střevní stěně a bránit tak hostitele před kolonizací nežádoucích mikroorganismů.

Tab. 3 Používané druhy laktobacilů jako lidská probiotika (Sanders et Klaenhammer, 2001).

Obligátně homofermentativní	Fakultativně heterofermentativní	Obligátně heterofermentativní
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. amylovarus</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. helveticus</i>		
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>		
<i>L. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i>		

3.2 Mikroflóra trávicího traktu lidí

Mikroflóra trávicího traktu představuje komplexní, vyvážený mikrobiální ekosystém, který směrem aborálním prodělává specifické změny, v poměrném zastoupení aerobů a anaerobů. Jejich funkce se vzájemně doplňují tím, že aeroby zajišťují pro celý ekosystém „scavenger effect“. Mikrobiální profil trávicího traktu je charakterizován absencí anaerobů v žaludku, a naopak jejich naprostou převahou v distálním kolonu (Zbořil et al., 2005).

Aeroby zajišťují „scavenger effect“ tím, že s dominancí *E. coli* spotřebovávají kyslík v reakcích oxidativní fosforylace při energetickém metabolismu. Tím klesá aborálním směrem redoxní potenciál, což umožňuje růst anaerobů, citlivých na přítomnost kyslíku (Lata et Juránková, 2011).

Mikroflóra trávicího traktu je rozdělena do dvou skupin na autochtonní a alochtonní mikroorganismy. Autochtonní mikroorganismy jsou klasifikovány jako stálí obyvatelé trávicího traktu na rozdíl od alochtonních, kteří patří mezi přechodné mikroorganismy, jež střevem pouze procházejí (Manson et al., 2008).

Trávicí trakt lidí se skládá z horní a dolní části gastrointestinálního traktu. Hlavními orgány trávicího traktu jsou žaludek, tenké a tlusté střevo. U dospělých lidí je trávicí trakt dlouhý kolem 7 metrů (Forssten et al., 2011).

Pro jednotlivé části trávicího traktu jsou charakteristické fyzikálně - chemické podmínky, které poskytují útočiště určitým mikrobiálním populacím (McCartney et Gibson, 2006). Složení střevní mikroflóry je regulováno již slinami (lysozymy), žaludeční kyselinou (pH), žlučí (laktoferin, nekonjugované žlučové kyseliny), pankreatickou šťávou (lipáza) a také střevní motilitou. Důležitou roli hraje také regenerace buněk střevní sliznice. Střevní

mikroflóra má vlastní regulační schopnosti (tzv. kolonizační rezistence). Brání průniku nežádoucích organizmů, látek a inhibuje patogenní mikroflóru (Lata et Juránková, 2011).

Relativně malý je obsah bakterií v žaludku a proximální části tenkého střeva, kde na bakterie působí kyselé žaludeční šťávy spolu s peristaltikou střev (Kerckhoffs et al., 2006). Pohyb tenkého střeva ke konci kyčelníku zabraňuje stabilní kolonizaci bakterií (Guarner et Malagelada, 2003).

Přestože nejsou podmínky v horní části trávicího traktu příznivé, některé acidorezistentní grampozitivní bakterie se zde mohou vyskytovat (laktobacily a streptokoky). Nepříznivé podmínky v žaludku je schopen přežít *Helicobacter pylori*, který se částečně chrání před kyselým prostředím zavrtáváním do slizniční výstelky.

V kyčelníku tenkého střeva je peristaltika střev spolu s tráveninou pomalejší, což vytváří příznivé podmínky pro osídlení mikroorganismy. Počet a druhové zastoupení mikroorganismů je zde vyšší. Jsou zde přítomny gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie (např. členové rodu *Enterobacteriaceae*), obligátně anaerobní (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Veillonella*) spolu s laktobacily a enterokoky (McCartney et Gibson, 2006).

Tlusté střevo je díky dostatečnému množství živin (nestravitelné sacharidy a složky potravin v horní části trávicího traktu, buněk epitelu a mikrobiálních zbytků) za působení neutrálního pH oázou pro bakterie. Nachází se zde nejpočetnější část lidské mikroflóry (McCartney et Gibson, 2006). Tlusté střevo (včetně konečníku a slepého střeva) obývá přes 500 druhů bakterií, které jsou z více jak 99 % obligátně anaerobní (Kerckhoffs et al., 2006).

V tlustém střevě dochází k přeměně polysacharidů a proteinů, které začíná depolymerizací komplexních sacharidů a proteinů na jednodušší sloučeniny (mono a oligomerní) a dále na krátké mastné kyseliny. K přeměně sacharidů dochází především v proximální části tlustého střeva, zatímco fermentace proteinů probíhá v distální části. Dekarboxylací aminokyselin vznikají aminy, zatímco oxidační a redukční deaminace aminokyselin vede ke vzniku čpavku, jehož vysoké koncentrace působí jako promoter vzniku tumoru (Blaut et Clavel, 2007). Na tvorbě amoniaku a aminů (toxických pro játra) se podílí *Escherichia coli* a klostridie (Fliss et al., 2010).

Konečným produktem fermentace jsou krátké mastné kyseliny (kyselina máselná, octová, propionová), které jsou v tlustém střevě obsaženy ve větších koncentracích (Cummings et Englyst, 1987). Řetězce krátkých mastných kyselin jsou nejen zdrojem energie, ale stimulují také střevní peristaltiku a kyselina máselná má navíc ochranný vliv na buňky intestinální mukózy. Kyselina octová a mléčná v důsledku snížení pH zlepšují ve střevech

absorpci některých minerálů (Fe, Ca) a spolu s tím snižují počet patogenů (*C. perfringens*), které kyselé prostředí nesnášejí (Rudolfová et Čurda, 2005). Kyselina propionová se v játrech účastní glukogeneze (Priebe et al., 2002).

Tab. 4 Složení mikroflóry lidského gastrointestinálního traktu (Ballongue, 2004).

	Žaludek	Jejunum	Ileum	Kolon
Celková mikrobiální koncentrace	0-10 ^{3a}	0-10 ⁵	10 ³ -10 ⁷	10 ¹¹ -10 ¹²
Striktně aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie				
<i>Enterobacteria</i>	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁴ -10 ¹⁰
<i>Streptococcus</i>	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ⁶	10 ⁵ -10 ¹⁰
<i>Staphylococcus</i>	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁷
<i>Lactobacillus</i>	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ⁵	10 ⁶ -10 ¹⁰
Kvasinky	0-10 ²	0-10 ²	10 ² -10 ³	10 ² -10 ⁶
Anaerobní bakterie				
<i>Bacteroides</i>	vzácně	0-10 ²	10 ³ -10 ⁶	10 ¹⁰ -10 ¹²
<i>Bifidobacterium</i>	vzácně	0-10 ³	10 ³ -10 ⁷	10 ⁸ -10 ¹²
<i>Peptococcus</i>	vzácně	0-10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁸ -10 ¹²
<i>Clostridium</i>	vzácně	vzácně	10 ³ -10 ⁴	10 ⁶ -10 ¹¹
<i>Fusobacterium</i>	vzácně	vzácně	vzácně	10 ⁹ -10 ¹⁰
<i>Eubacteria</i>	vzácně	vzácně	10 ³ -10 ⁵	10 ⁹ -10 ¹²
<i>Veillonellae</i>	vzácně	0-10 ²	10 ³ -10 ⁴	10 ³ -10 ⁴

^a Počet buněk na gram střevního obsahu.

V průběhu života se však složení mikroflóry trávicího traktu mění. Plod dítěte se nachází ve sterilním prostředí a k prvnímu osídlení trávicího traktu dochází v průběhu porodu. Po průchodu vaginou je horní část trávicího traktu novorozence osídlena vaginální a fekální mikroflórou matky. Děti narozené císařským řezem jsou primárně vystaveny mikroorganismům z okolního prostředí. U dětí narozených přirozenou cestou trvá zhruba měsíc, než je jejich střevní mikroflóra zavedena, zatímco u dětí narozených císařským řezem může být narušena až po dobu 6 měsíců od porodu. Během prvního týdne je počet bakterií poměrně nestabilní. Prvními bakteriemi, které se usazují v trávicím traktu, jsou enterobakterie a streptokoky. Anaerobní bakterie se usazují v trávicím traktu později (Forssten et al., 2011).

Na strukturu a funkci fyziologické mikroflóry pozitivně působí kojení (Zbořil et al., 2005). Podle některých studií, patří mezi nejčastěji uváděné zdroje kolonizace střeva novorozence mateřské mléko. V mateřském mléce se vyskytují bifidobakterie, enterokoky, laktobacily, laktokoky, stafylokoky a streptokoky (Bronský, 2011).

Bifidobakterie jsou v tlustém střevě dominantně zastoupeny v průběhu 4. až 7. dne. Dosahují počtu 10^{10} - 10^{11} na gram stolice, zatímco počet *Bacteroides*, klostridií, enterobakterií, streptokoků a stafylokoků se snižuje. S přechodem na pevnou stravu se mění zastoupení gramnegativních bakterií a svým složením mikroflóra dětí přechází v dospělou. Počet bifidobakterií se snižuje z celkového počtu mikroorganismů na 5 - 10 % (Mitsuoka, 1990).

U kojených dětí dominují z 90 % ve stolici anaerobní bakterie s převahou bifidobakterií (Zbořil et al., 2005). Naproti tomu je podle Favier et al. (2002) rozmanitější rodové zastoupení u uměle kojených dětí (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, včetně rodu *Bifidobacterium*).

Mezi 3. až 5. rokem má mikroflóra dětí strukturu téměř totožnou s mikroflórou dospělých lidí. V dospělosti jsou odlišnosti ve složení mikroflóry trávicího traktu závislé především etnicky, geograficky a podle stravovacích návyků. Změny mikroflóry ve vyšším věku se týkají především mikroflóry tlustého střeva (Zbořil et al., 2005). S věkem klesá počet bifidobakterií nebo zcela vymizí, dochází k významnému zvýšení množství klostridií (včetně *C. perfringens*), také počet laktobacilů, streptokoků a enterobakterií se zvyšuje (Mitsuoka, 1990). Jak bylo uvedeno už dříve, především u starších lidí může pokles bifidobakterií vést ke zvýšenému riziku infekcí a některých degenerativních onemocnění (Rowland et Gill, 2008).

Současné úsilí optimalizovat střevní mikrobiální prostředí a ovlivnit zdravý vývoj zvýšilo zájem o doplnění zdraví prospěšných mikrobů (probiotik) a nestravitelných oligosacharidů (prebiotik) do kojeneckých formulí, označované souhrnně také jako tzv. bioterapeutická agens (Sýkora, 2011).

3.2.1 Probiotika

Slovo probiotika je odvozeno z řeckého slova „pro život“ a v průběhu let se s novými vědeckými poznatky jejich definice měnila (Lee, 2009). Dnes jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy, které při podávání v adekvátním množství přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele. Obvykle jsou používány bakterie přirozeně obývající trávicí trakt lidí (Rada, 2010).

Účinek probiotik spočívá ve stabilizaci přítomné mikroflóry trávicího traktu, tím se vytváří předpoklady pro příznivé ovlivnění zdravotního stavu člověka s cílem dosáhnout prevence určitých chorob nebo napomoci k léčbě stávajících nemocí (Švestka, 2007).

Podle Rady (2010) se u hospodářských zvířat očekává příznivý vliv jak na užitkové vlastnosti (dojivost, snáška vajec, přírůstky na hmotnosti), tak zdravotní stav. U lidí se očekávají především účinky na zdravotní stav. Mezi nejčastěji zmiňované (a z velké části prokázané) patří prevence a terapie průjmových onemocnění (hlavně u malých dětí), snižování hladiny krevního cholesterolu (působí zejména termofilní mléčné bakterie), prevence kolorektální rakoviny a rakoviny močového měchýře (účinné jsou hlavně bifidobakterie).

Mikroorganismy jako probiotika musí splňovat určité nezbytné předpoklady. Musí být účinná a bezpečná (protože jsou aplikována v živém stavu, nesmějí mít žádné patogenní vlastnosti), nezbytná je odolnost k žaludeční šťávě a žluči, musí mít schopnost adherovat ke střevnímu epitelu a být lidského původu (Švestka, 2007).

Nejpoužívanějšími bakteriemi jsou bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Výčet probiotických mikroorganismů je však daleko pestřejší a zahrnuje další bakteriální rody a druhy (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *C. butyricum*, *Propionibacterium*), ale také kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) a plísně (*Aspergillus oryzae*). Tyto kultury jsou dnes běžně přidávány do mléčných kysaných výrobků, sýrů, fermentovaných masných výrobků, ale i do náplní sušenek a oplatek. V těchto výrobcích je potřeba vždy řešit problematiku udržení počtu živých buněk po dobu expirace. Další alternativou je podávání probiotik ve formě kapslí, lyofilizovaných, popř. sušených prášků (Rada, 2010).

3.2.2 Prebiotika

Gibson et Roberfroid (1995) definovali prebiotikum jako nestravitelnou potravinovou složku, která blahodárně působí na hostitele selektivní stimulací růstu, aktivity či obojí jednoho nebo omezeného počtu bakteriálních druhů mikroflóry tlustého střeva. Prebiotika tedy mohou příznivě ovlivnit složení střevní mikroflóry zvýšením počtu specifickým bakterií.

Aby mohla být určitá složka potravy klasifikována jako prebiotikum, musí splňovat následující kritéria:

- nesmí být hydrolyzována ani absorbována v horní části gastrointestinálního traktu
- musí být selektivním substrátem pro jednu nebo omezený počet prospěšně komenzálních bakterií tlustého střeva a tím tak stimulovat jejich růst, metabolickou aktivitu nebo obojí

- musí být schopna ovlivnit složení mikroflóry tlustého střeva směrem k zdraví prospěšnějšímu (Collins et Gibson, 1999).

Prebiotika jsou obvykle ve formě oligosacharidů. Vyskytují se v přirozené formě v mateřském mléce, jsou přítomny v mnoha rostlinách (čekanka, obiloviny, banány, cibule atd.) a mohou být doplněna také do stravy a nápojů (Sýkora, 2011).

3.2.2.1 Oligosacharidy

Oligosacharidy jsou definovány jako sacharidy se třemi až deseti vázanými jednotkami. Většina oligosacharidů, které jsou nestravitelné nebo částečně stravitelné, se snadno fermentuje bakteriemi v tlustém střevě. Ke zlepšení střevní mikroflóry prostřednictvím konzumace oligosacharidů je proto zapotřebí, aby sloučeniny nepodléhaly procesu trávení a absorpci v tenkém střevu a dostaly se tak do tlustého střeva v nezměněné podobě. Zde jsou metabolizovány střevními bakteriemi za produkce velkého množství mastných kyselin s krátkým řetězcem. Důsledkem toho dochází v tlustém střevě ke snížení pH za současného zvýšení celkového počtu střevních mikroorganismů a objemu výkalů. Prospěšné bakterie (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) jsou odolné ke kyselému prostředí, zatímco škodlivé bakterie, např. *Clostridium* spp., jsou citlivé ke kyselým podmínkám (Kvasničková, 2000).

Prebiotické oligosacharidy obsahují většinou řetězce fruktózy nebo galaktózy s terminálně připojenou glukózou. Příkladem prebiotických oligosacharidů jsou galakto - oligosacharidy (GOS), frukto - oligosacharidy (FOS), sojové oligosacharidy a inulin. V současnosti výrobci mléčné kojenecké výživy upravují kojenecké formule obohacením o oligosacharidová prebiotika (Sýkora, 2011).

Podle Rady et al. (2008) podporují komerčně dostupná prebiotika nejen růst bifidobakterií, ale také klostridií a je tedy diskutabilní jejich podávání u kojenců s deficitem bifidobakterií. Podstatně lépe rostly bifidobakterie pouze na GOS.

Ve starší práci Ohtsuka et al. (1989) uvádějí horší růst laktobacilů na GOS ve srovnání s bifidobakteriemi. Nicméně výsledky Watsona et al. (2012) naznačují, že u většiny testovaných laktobacilů jsou vynikající růstové schopnosti na GOS ve srovnání s FOS nebo inulinem. Ve studii Bouhnik et al (2004) je zase patrné, že GOS mají silnější bifidogenní účinek v porovnání s FOS s kratším řetězcem.

3.2.2.1.1 Vybrané oligosacharidy

- **Galakto - oligosacharidy**

GOS se obvykle získávají z koncentrovaného laktózového sirupu působením β - galaktosidázy. Jsou složené z molekul galaktózy a glukózy, vyjádřené vzorcem $\text{Glu } \alpha 1 - 4 [\text{Gal } 1 - 6]_n$, kde n (2 - 5) je počet navázaných jednotek galaktózy na molekulu glukózy (Lamsal, 2012).

Výskyt bifidogenní mikroflóry ve střevě kojenců byl přisuzován přítomnosti GOS v mateřském mléce. Z tohoto důvodu přilákaly GOS značný komerční zájem a některé společnosti se v současnosti podílejí na jejich výrobě (Crittenden et Playne, 1996). GOS vyrobené enzymatickou přeměnou laktózy se přirozeně nevyskytují v mateřském mléce. Nicméně byl značný zájem o GOS jako součást kojenecké výživy (Barile et Rastall, 2013).

Komerčně dostupné GOS jsou směsi s více než 55 % obsahem oligosacharidů, obsahují okolo 20 % laktózy, 20 % glukózy a malé množství galaktózy. Jsou dostupné v práškové či tekuté formě (Sako et al., 1999).

- **Frukto - oligosacharidy**

FOS se vyrábějí dvěma odlišnými způsoby, čímž vznikají mírně odlišné konečné produkty. FOS se získávají ze sacharózy buď pomocí enzymu β - fruktofuranosidázy nebo řízenou hydrolyzou z inulinu (Crittenden et Playne, 1996).

Po chemické stránce jsou FOS polymery (polymerizační stupeň 2 - 30) D - fruktózy spojené β - (2 - 1) vazbami zakončené molekulou sacharosy, jsou rostlinného původu a přirozeně se nachází v čekance, cibuli, artyčocích, česneku, banánech, rajčatech a jejich průměrný obsah v čerstvém ovoci a zelenině je 6 % (Rudolfová et Čurda, 2005).

- **Malto - oligosacharidy**

MOS se vyrábí komerčně ze škrobu působením pullulanázy nebo isoamylázy v kombinaci s α - amylázami. Vzhledem k rozdílné specifčnosti α - amyláz vznikají sirupy bohaté na MOS s různou délkou řetězce. MOS obsahují zbytky glukózy propojené α - 1 - 4 glykosidickou vazbou (Crittenden et Playne, 1996).

Podle Crittenden et Playna (1996) MOS obecně nepodporují zvýšení počtu bifidobakterií v tlustém střevě. MOS jsou hydrolyzovány a absorbovány v tenkém střevě a obecně tedy nepůsobí jako prebiotika, ale mohou být efektivní při zlepšení podmínek tlustého střeva (Kvasničková, 2000). Nicméně v japonské studii Sugawara et al. (1989) zjistili, že

konzumace kukuřičného sirupu bohatého na maltotetraosu vede ke snížení počtu hnilobných bakterií *C. perfringens* a *Enterobacteriaceae*.

4. Materiál a metody

Pro měření růstových křivek byly dodány katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky, vzorky anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií ze sbírkových kultur, trávicího traktu kojenců a mléčných výrobků. Celkem bylo použito 28 kmenů (10 kmenů bifidobakterií, 9 kmenů klostridií a laktobacilů), jejichž růst byl měřen na třech různých prebiotických oligosacharidech - FOS (Raftilose[®] P95), GOS (Vivinal[®]) a MOS (Nutriose[®] FM06). Přehled jednotlivých kmenů je uveden v následující tabulce.

Tab. 5 Použité kmeny

Kmen	Označení	Původ
<i>C. perfringens</i>	T2	TT
<i>C. perfringens</i>	FW2	TT
<i>C. perfringens</i>	DSMZ 11 778	DSMZ
<i>C. butyricum</i>	BCA	TT
<i>C. butyricum</i>	CM14	TT
<i>C. sp.</i>	CM11	TT
<i>C. difficile</i>	KK4	TT
<i>C. tertium</i>	LAA III	TT
<i>C. acetobutylicum</i>	L4	TT
<i>L. acidophilus</i>	BOV	TT
<i>L. acidophilus</i>	MR	TT
<i>L. brevis</i>	DCH	TT
<i>L. rhamnosus</i>	JP	TT
<i>L. rhamnosus</i>	A	TT
<i>L. delbrueckii</i>	JH	TT
<i>L. paracasei</i>	KRA	TT
<i>L. paracasei</i>	JA	TT
<i>L. fermentum</i>	TS	TT
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	BB12	ml. výrobky
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	DSMZ 20 104	DSMZ
<i>B. dentium</i>	AP	TT
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	ATCC 15 707	ATCC
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	J2	TT
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	FE8	TT
<i>B. breve</i>	ATCC 15 700	ATCC
<i>B. breve</i>	DCH	TT
<i>B. breve</i>	FB	TT
<i>B. bifidum</i>	JKM	TT

DSMZ - německé sbírkové kmeny, ATCC - americké sbírkové kmeny, TT - izoláty trávicího traktu.

4.1 Složení a příprava médií

Příprava cukerného roztoku (20%)

Složení:

- Destilovaná voda 1000,0 ml
- Cukr 200,0 g
(Raftilose[®] P95, Vivinal[®], Nutriose[®] FM06)

Navážený cukr byl rozpuštěn a dávkován přibližně po 20 ml do skleněných lahvíček. Poté byl cukerný roztok 10 - 15 minut provařen a následně probublán CO₂ (pro odstranění kyslíku), anaerobně uzavřen a sterilován při 120 °C po dobu 15 minut.

Kultivační médium Wilkins - Chalgren bujón se sojovým peptonem (W + sp)

Složení:

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

K 33,0 g Wilkins - Chalgren bujónu přidáme:

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

Po rozpuštění byla navážka média rozvařena a rozplněna po 9 ml do skleněných lahvíček. Lahvičky byly anaerobně uzavřeny a sterilovány při 120 °C po dobu 15 minut.

Ředící řady s resazurinem

Složení:

• Destilovaná voda	1000,0 ml
• Trypton	10,0 g
• Nutrien broth 2	10,0 g
• Kvasniční autolyzát	5,0 g
• L - cystein	0,5 g
• Resazurin	10,0 mg
• Tween 80	1,0 ml

V Erlenmayerově baňce bylo rozpuštěno a promícháno 26,5 g média s přidaným indikátorem resazurinem, který indikuje přítomnost kyslíku. Baňka byla uzavřena folií a povařena do čirého zbarvení. Po úpravě pH (7) bylo médium dávkováno do zkumavek popř. skleněných lahviček po 9 ml. Dále bylo provařeno (10 - 15 minut), probubláno CO₂, anaerobně uzavřeno a sterilováno při 120 °C po dobu 15 minut.

4.2 Pracovní postup

- **Příprava anaerobního boxu**

Den před vlastním měřením byl připraven anaerobní box (Bug Box). V boxu je vytvořeno anaerobní prostředí, které je automaticky regulováno dopouštěním dusíku a směsného plynu.

- **Kultivace**

Vybrané čisté kultury byly anaerobně rozočkovány v aseptickém prostředí po 0,5 ml ve 2 kopiích do zkumavek popř. skleniček s kultivačním médiem (W + Sp). Naočkované kmeny byly poté kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

- **Očkování**

Vybrané vzorky byly anaerobně rozočkovány do ředících řad s příslušným cukrem (1 ml) a 0,3 ml zkoumaného kmene. Následně byly vzorky v boxu pipetovány do mikrotitračních destiček s rovným dnem. Pro každý vzorek byl připraven 1 sloupec po 8 jamkách. Pro kontrolu (Blank) bylo do prvního sloupce pipetováno čisté médium. V ostatních

sloupcích byly pipetovány vzorky s příslušným kmenem a cukrem po 0,2 ml. Nakonec byla destička překryta vzduchotěsnou folií a přenesena k vlastnímu měření.

Současně probíhalo očkování do zkumavek ve 4 opakováních. Bylo zachováno stejné množství kmene a příslušného cukru. Rozdíl je pouze v množství kultivačního média. V průběhu měření byly zkumavky umístěny ve vodní lázni při 37 °C.

4.2.1 Měření růstu

Před příchodem měření na mikrotitračních destičkách probíhal růst v Erlenmayerových baňkách nebo v kultivačních zkumavkách při konstantní teplotě místnosti či ve vodní lázni. Vzorek byl poté spektrofotometricky změřen. Z naměřených dat, ať už ručně nebo po převedení do počítače, byly počítány specifické růstové rychlosti, což bylo velmi zdoluhavé (Hall et al., 2013).

Optická densita (OD) v kultivačních zkumavkách byla měřena při vlnové délce 575 nm na Densitometru DEN - 1B (Biosan). Před každým měřením po vyjmutí z vodní lázně (37 °C) bylo potřeba zkumavky řádně protřepat, protože docházelo u některých bakterií k agregaci (viz. příloha obr. 7), a utřít do sucha. Jedná se o spolehlivou metodu, ale její nevýhodou je náročnost z hlediska času a spotřeby materiálu.

Proto bylo měření v kultivačních zkumavkách současně porovnáváno s měřením OD na mikrotitračních destičkách pomocí automatického spektrofotometru Infinite M200 (Tecan). Přístroj umožňuje kontinuální měření, při kterém využívá tři sady moderní optiky spolu se třemi výkonnými detektory, které umožňují absorbanční, fluorescenční a luminiscenční čtení.

Destička byla vložena do přístroje, dopředu nastaveném na 37 °C. Měření probíhalo při vlnové délce 420 nm v ½ hodinových intervalech po dobu 24 hodin. V průběhu času přístroj před každým měřením protřepal destičku a postupně změřil absorbanci OD jednotlivých jamek. Naměřené hodnoty byly potom převedeny do programu Excel (není tedy nutné hodnoty ručně přepisovat, jako je tomu u měření na zkumavkách). Kromě toho přístroj umožňuje graficky zaznamenat růst pro každou jamku, lze tak dopředu zjistit, zda daný kmen roste, popř. zda je čistá kontrola.

- **Růstové křivky**

Z naměřených hodnot byl vypočten průměr, který byl upraven pomocí přirozeného logaritmu. Z takto upravených hodnot byl sestaven graf růstových křivek (kde na ose x je čas a na ose y je $\ln OD \cdot 100$) pro každý kmen na daném substrátu.

- **Specifické rychlosti**

Grafem byla proložena přímka zachycující exponenciální fázi růstu, která procházela minimálně třemi body. Následně byla vypočtena specifická růstová rychlost [h^{-1}] ze vzorce:

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

kde $\ln x$ a $\ln x_0$ je rozdíl hodnot OD mezi prvním a posledním bodem exponenciální fáze v časech t a t_0 .

- **Maximální nárůst**

Vedle rychlostí byl spočítán z logaritmicky upravených křivek maximální nárůst

- **Statistické vyhodnocení**

Výsledky byly statisticky zpracovány v programu Statistica 12. V rámci bakteriálního rodu na daném prebiotiku byly porovnány celkové průměry specifických růstových rychlostí. Pro vyhodnocení byl použit T - test při zvolené hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

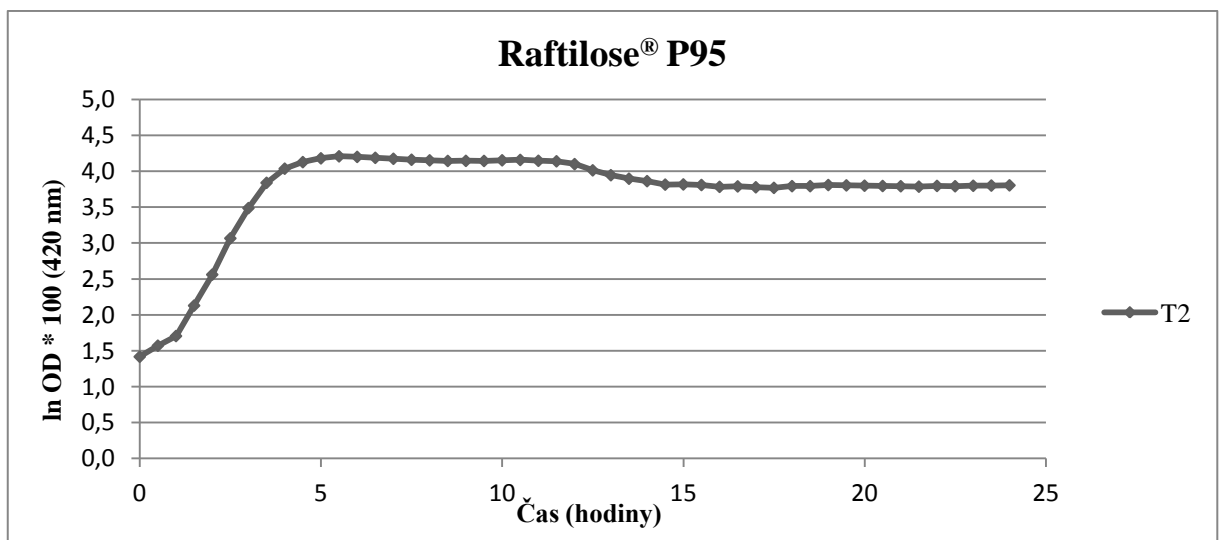
5. Výsledky

Pro porovnání bakteriálního růstu na mikrotitračních destičkách a v kultivačních zkumavkách byly naměřené hodnoty převedeny do grafické podoby růstových křivek, z kterých byly následně vypočteny specifické růstové rychlosti. V následující části je pro značný počet výsledků uvedeno několik vybraných křivek z obou metod.

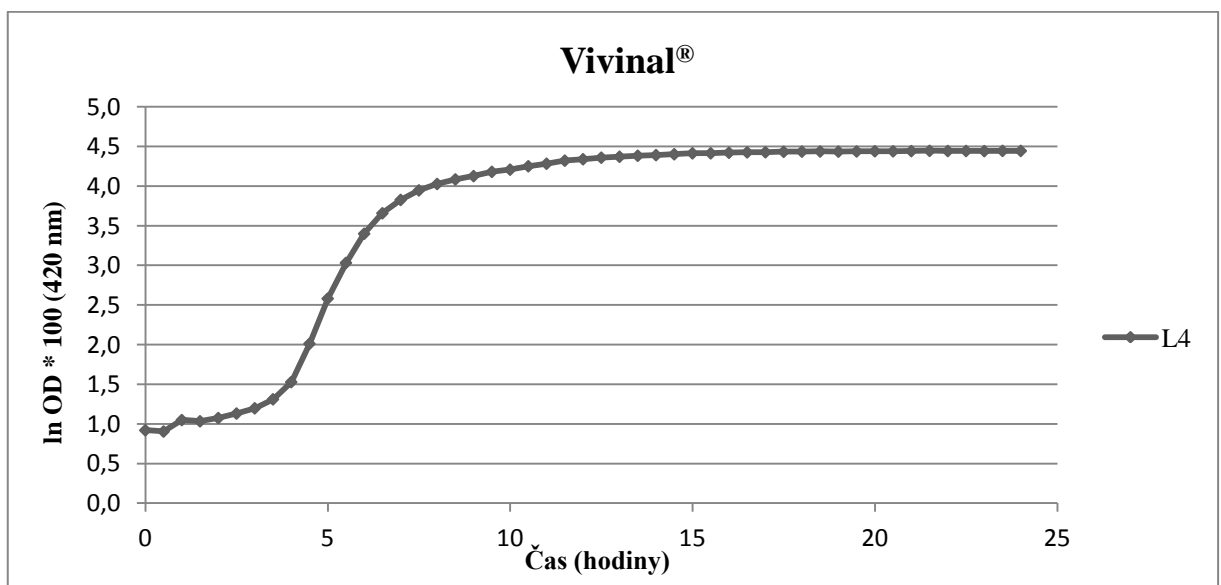
5.1 Vybrané křivky růstu na destičkách

Vybrané grafy znázorňují specifické růstové křivky odlišných bakteriálních kmenů na různých substrátech - Raftilose[®] (FOS), Vivinalu[®] (GOS) a Nutriose[®] (MOS). Grafy 1 - 6 uvádějí růstové křivky s výraznou exponenciální částí.

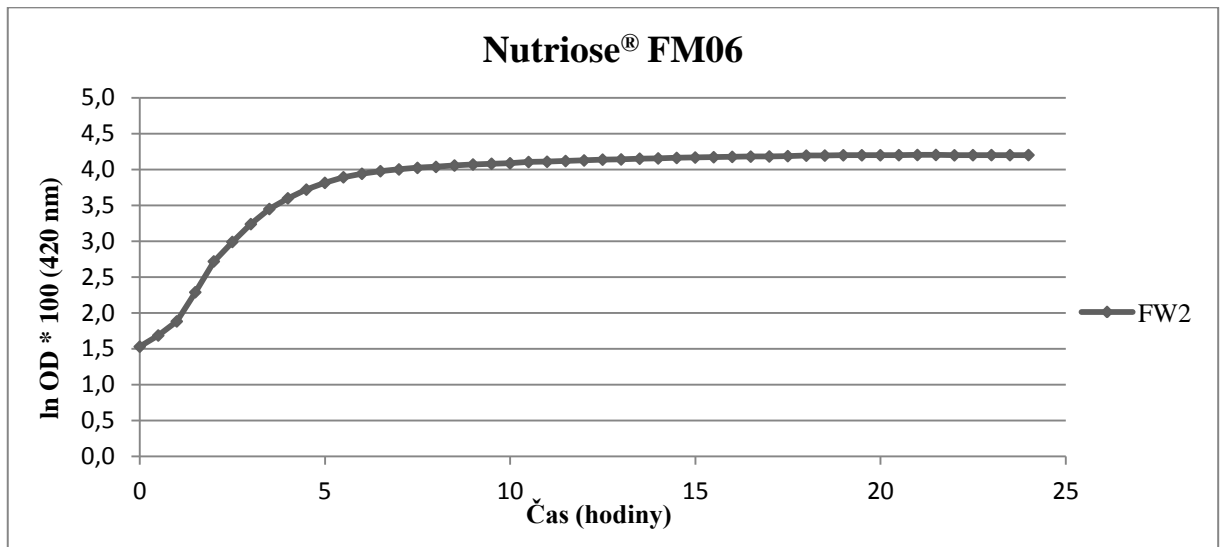
Graf 1 *C. perfringens*



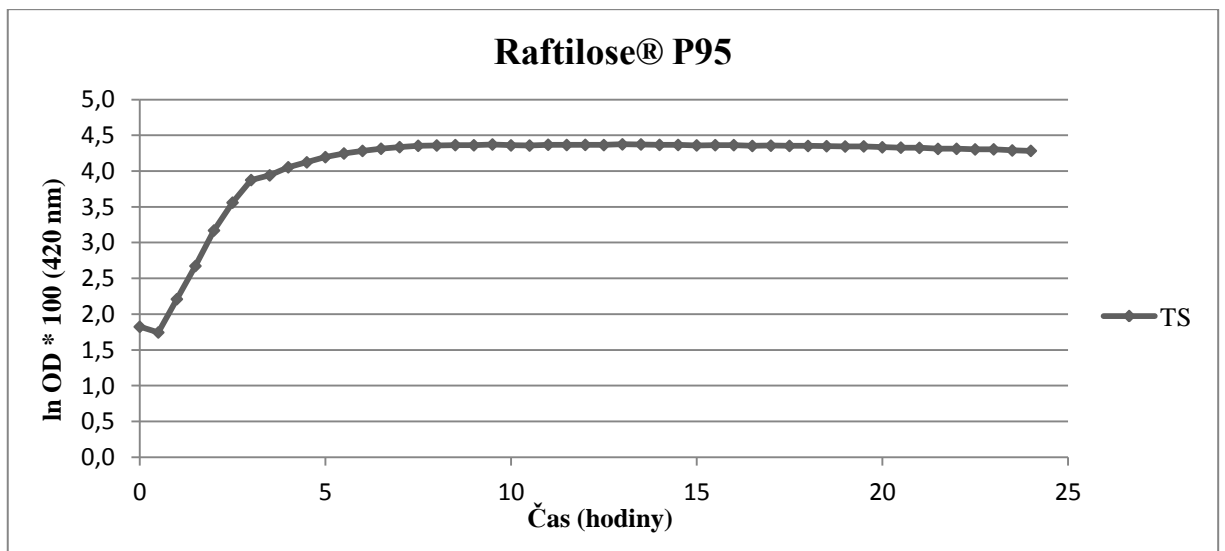
Graf 2 *C. acetobutylicum*



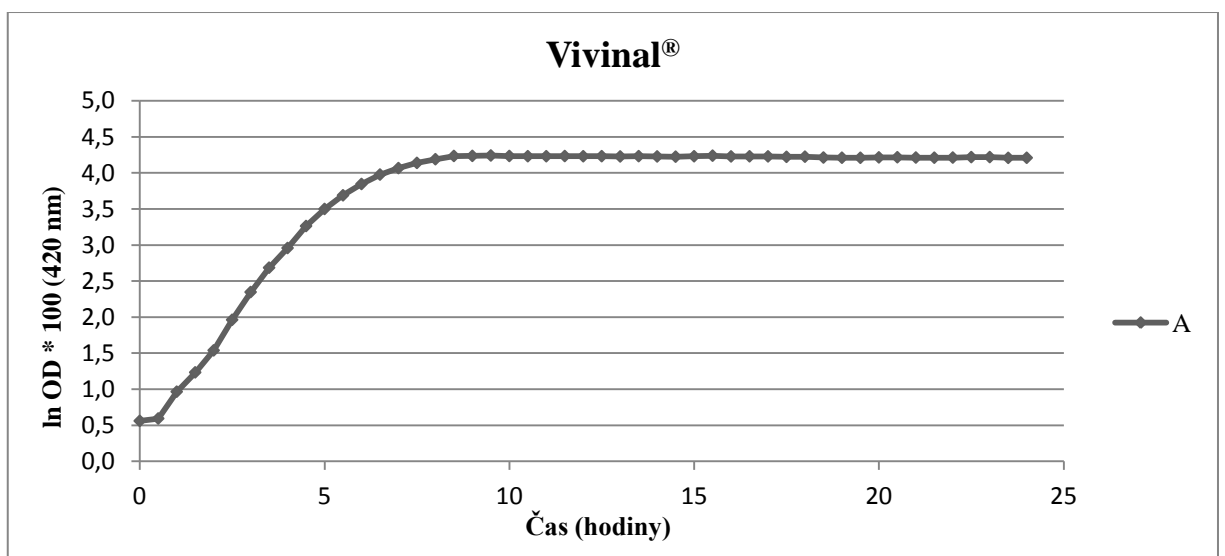
Graf 3 *C. perfringens*



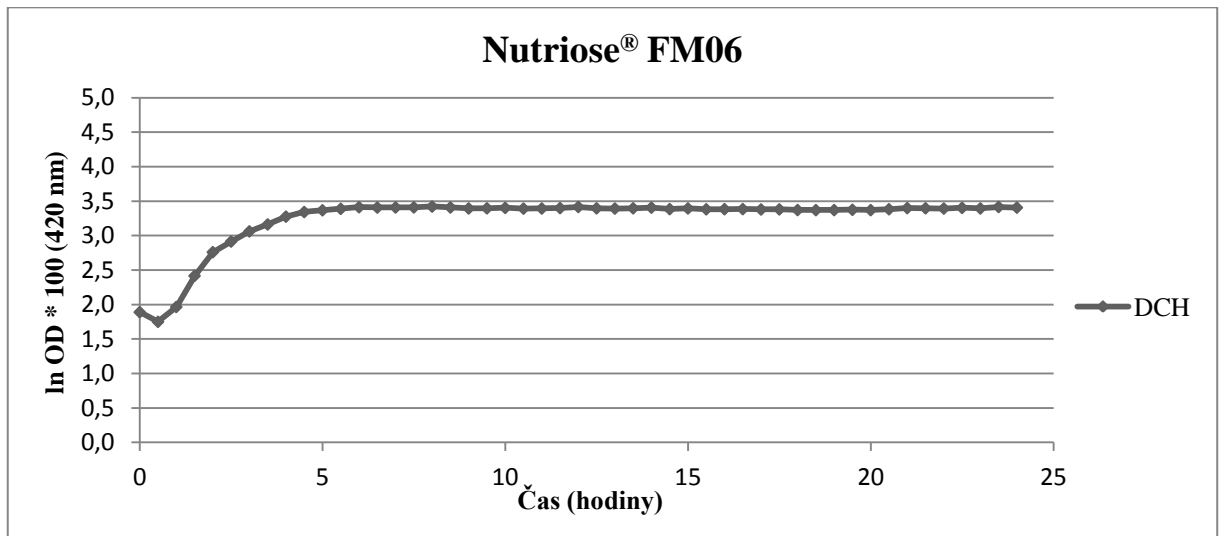
Graf 4 *L. fermentum*



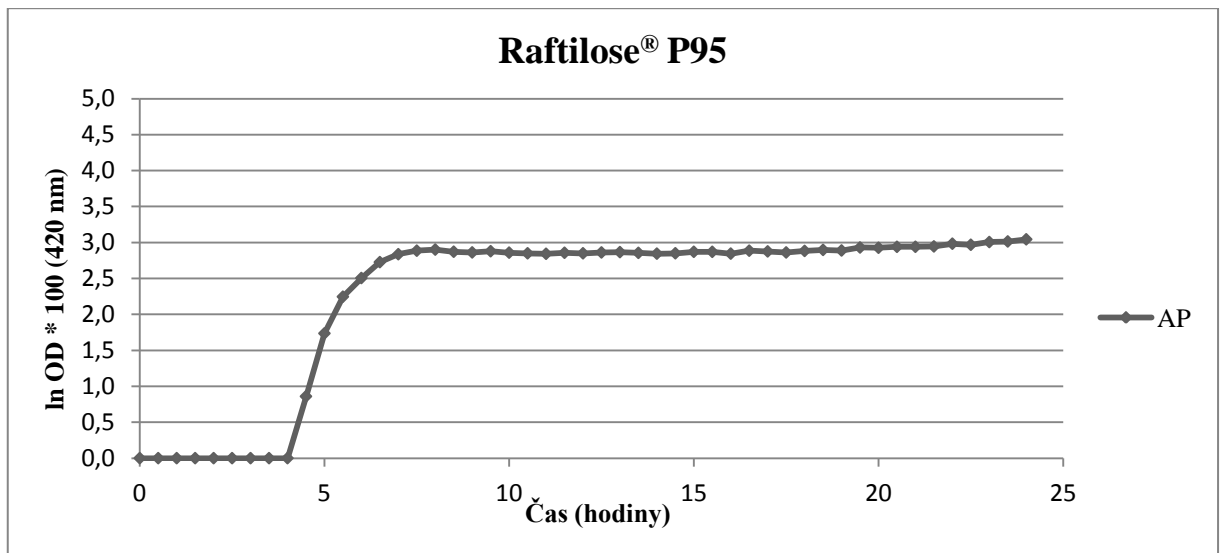
Graf 5 *L. rhamnosus*



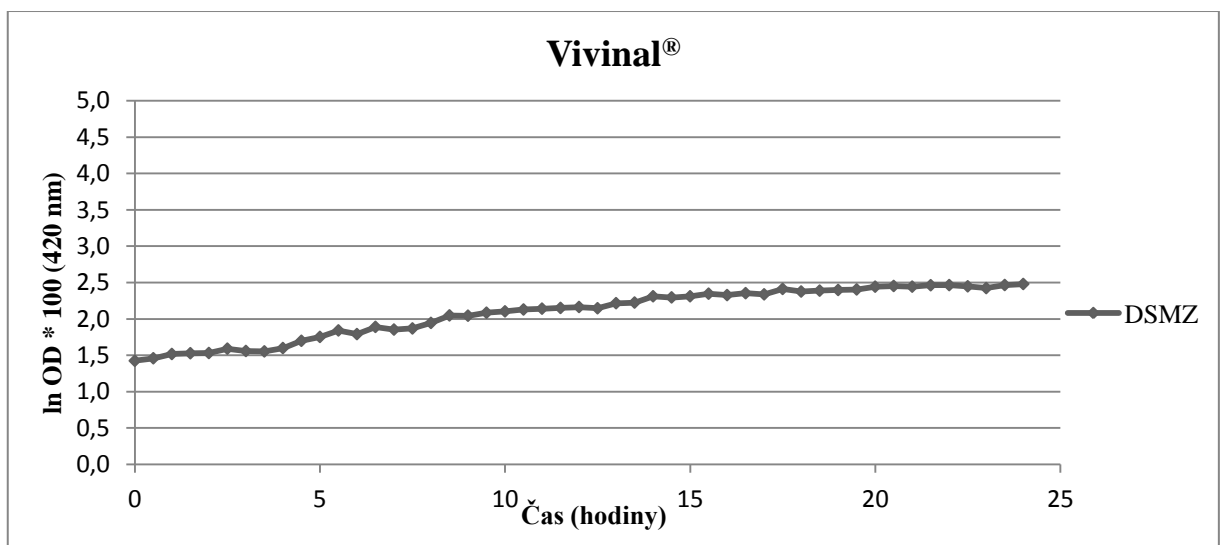
Graf 6 *L. brevis*



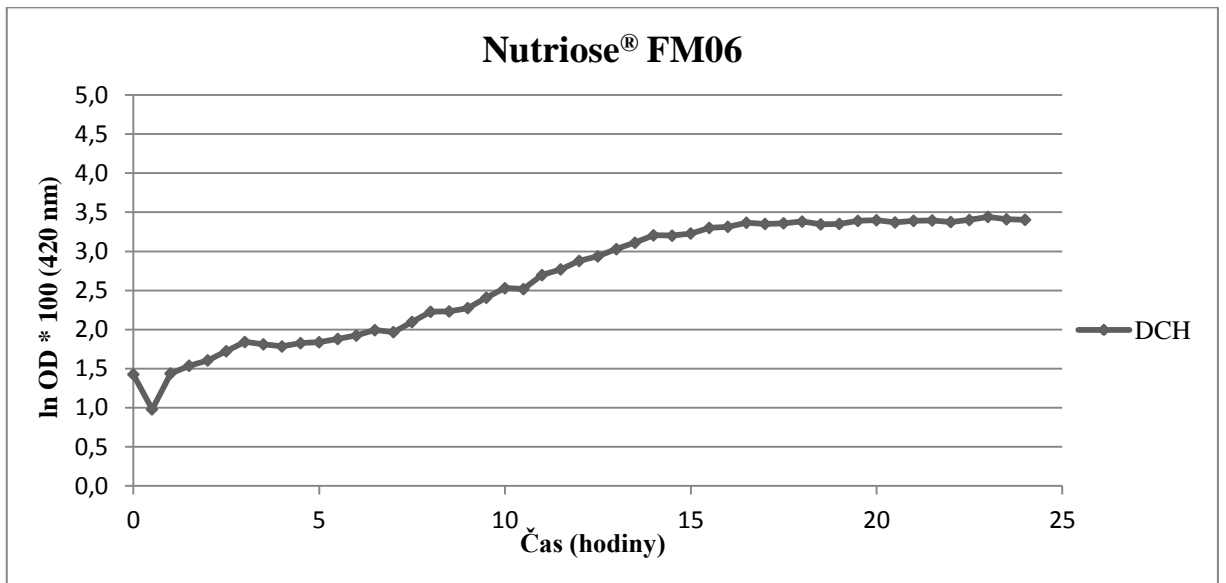
Graf 7 *B. dentium*



Graf 8 *B. animalis* ssp. *animalis*



Graf 9 *B. breve*

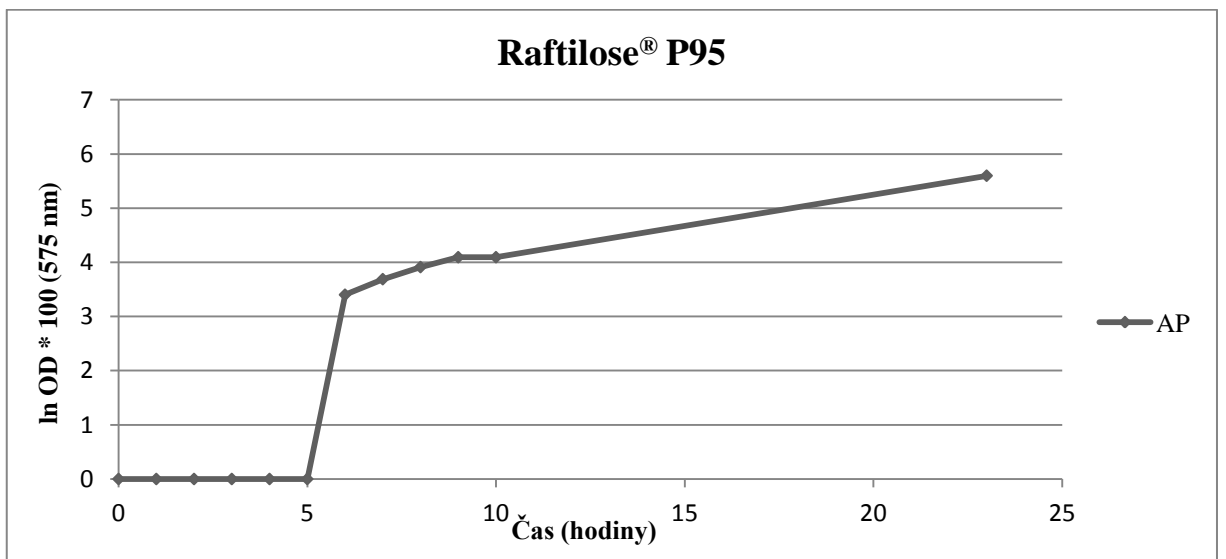


U růstových křivek grafu 8 a 9 se exponenciální část prakticky nevyskytuje, proto jsou označeny jako NG (nerostlo, nespecifický růst).

5.2 Vybrané křivky růstu na zkumavce

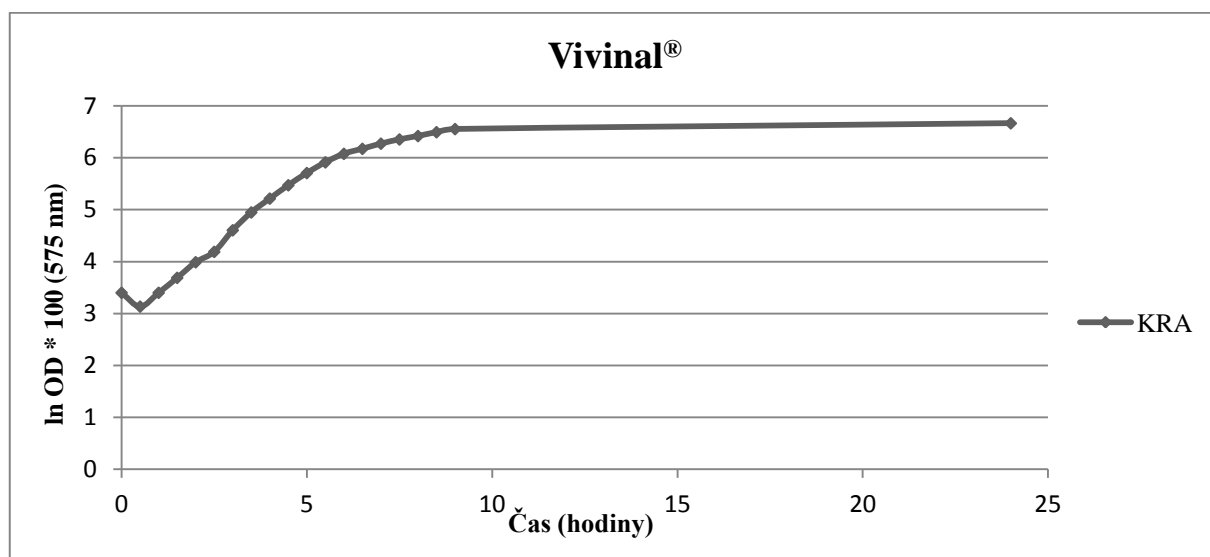
Graf 10 vykazuje nespecifický růst bifidobakterií ve zkumavkách.

Graf 10 *B. dentium*

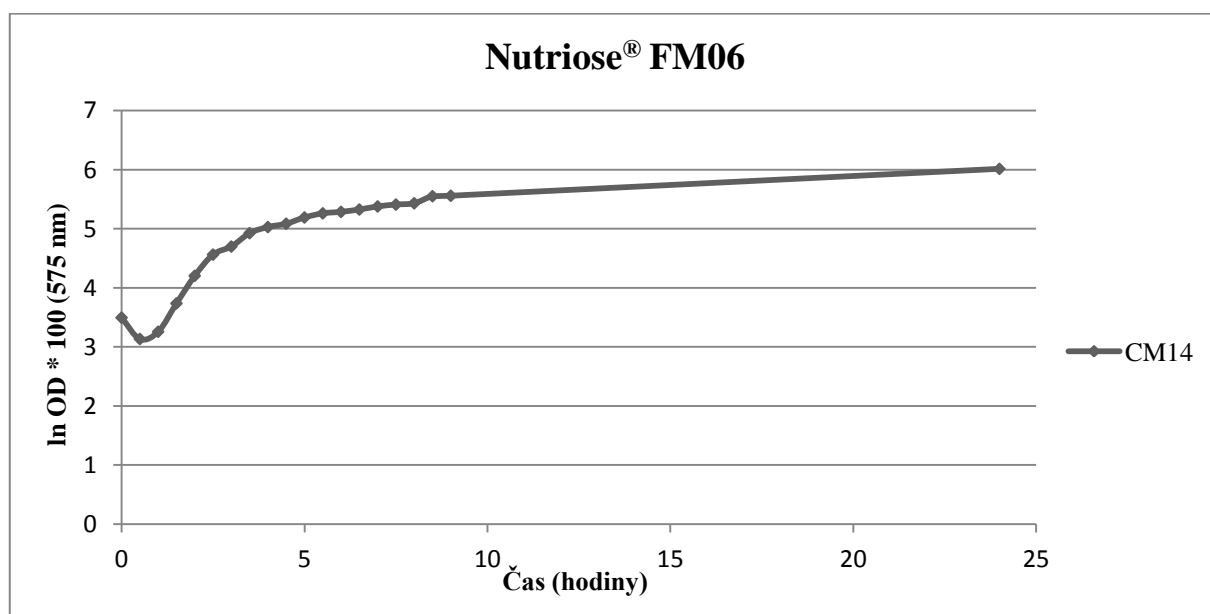


Grafy 11 a 12 zachycují exponenciální průběh růstové křivky laktobacilu a klostridie.

Graf 11 *L. paracasei*



Graf 12 *C. butyricum*



Počáteční koncentrace se u zkumavek pohybovala kolem 3,5. V případě mikrotitračních destiček byla počáteční hodnota více variabilní, většinou se pohybovala kolem 1.

5.3 Specifické růstové rychlosti

Všemi grafy byla proložena přímkou zachycující exponenciální fázi růstu. Následně byla vypočítána specifická růstová rychlost. Vypočtené rychlosti jsou uvedeny v následujících tabulkách spolu s maximálními nárůsty.

Tab. 6 Specifické růstové rychlosti s maximálními nárůsty na Raftilose®

Kmen	FOS			
	Raftilose® P95			
Klostridie	destičky	max.	zkumavky	max.
<i>C. perfringens</i> T2	0,92 ± 0,05	4,21 ± 0,07	1,29 ± 0,02	6,75 ± 0,01
<i>C. perfringens</i> FW2	0,82 ± 0,11	4,18 ± 0,05	1,16 ± 0,13	6,47 ± 0,00
<i>C. perfringens</i> DSMZ 11 778	1,12 ± 0,03	4,53 ± 0,01	1,41 ± 0,06	6,81 ± 0,01
<i>C. butyricum</i> BCA	0,41 ± 0,07	4,14 ± 0,04	1,26 ± 0,10	6,65 ± 0,00
<i>C. butyricum</i> CM14	NG	NG	1,26 ± 0,20	6,80 ± 0,01
<i>C. sp.</i> CM11	NG	NG	0,77 ± 0,08	6,23 ± 0,03
<i>C. difficile</i> KK4	0,45 ± 0,02	4,08 ± 0,07	0,77 ± 0,18	6,33 ± 0,02
<i>C. tertium</i> LAA III	1,32 ± 0,26	4,18 ± 0,03	0,65 ± 0,14	6,50 ± 0,01
<i>C. acetobutylicum</i> L4	1,11 ± 0,05	4,34 ± 0,01	0,89 ± 0,60	6,66 ± 0,06
Klostridie průměr	0,88 ± 0,35	4,24 ± 0,15	1,05 ± 0,28	6,58 ± 0,21
Laktobacily	destičky	max.	zkumavky	max.
<i>L. acidophilus</i> BOV	0,82 ± 0,12	3,26 ± 0,05	0,82 ± 0,16	6,68 ± 0,00
<i>L. acidophilus</i> MR	0,54 ± 0,03	4,67 ± 0,02	0,65 ± 0,06	6,42 ± 0,07
<i>L. brevis</i> DCH	0,91 ± 0,10	3,87 ± 0,11	1,03 ± 0,08	6,71 ± 0,02
<i>L. rhamnosus</i> JP	0,81 ± 0,08	4,42 ± 0,03	0,88 ± 0,12	6,72 ± 0,01
<i>L. rhamnosus</i> A	0,66 ± 0,06	4,59 ± 0,03	0,79 ± 0,05	6,69 ± 0,02
<i>L. delbrueckii</i> JH	0,56 ± 0,12	3,23 ± 0,10	0,44 ± 0,01	5,31 ± 0,05
<i>L. paracasei</i> KRA	0,77 ± 0,09	4,36 ± 0,02	0,62 ± 0,07	6,50 ± 0,01
<i>L. paracasei</i> JA	0,62 ± 0,03	4,14 ± 0,04	0,57 ± 0,03	6,55 ± 0,02
<i>L. fermentum</i> TS	0,99 ± 0,80	4,35 ± 0,02	1,24 ± 0,08	6,60 ± 0,08
Laktobacily průměr	0,74 ± 0,16	4,10 ± 0,54	0,78 ± 0,25	6,55 ± 0,56
Bifidobakterie	destičky	max.	zkumavky	max.
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB12	1,30 ± 0,18	3,57 ± 0,03	NG	5,14 ± 0,23
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> DSMZ 20 104	0,82 ± 0,16	3,62 ± 0,04	NG	5,39 ± 0,00
<i>B. dentium</i> AP	1,23 ± 0,14	3,07 ± 0,03	NG	5,56 ± 0,16
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ATCC 15 707	0,59 ± 0,04	3,50 ± 0,05	0,72 ± 0,02	5,88 ± 0,04
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> J2	0,51 ± 0,03	3,81 ± 0,04	NG	5,29 ± 0,13
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> FE8	0,40 ± 0,11	3,67 ± 0,05	0,69 ± 0,08	6,07 ± 0,02
<i>B. breve</i> ATCC 15 700	0,56 ± 0,08	3,33 ± 0,03	0,46 ± 0,14	5,34 ± 0,18
<i>B. breve</i> DCH	NG	NG	NG	NG
<i>B. breve</i> FB	NG	NG	NG	NG
<i>B. bifidum</i> JKM	NG	NG	NG	4,98 ± 0,05
Bifidobakterie průměr	0,77 ± 0,36	3,51 ± 0,24	0,62 ± 0,14	5,46 ± 0,29

Vysvětlivky: černě - specifické růstové rychlosti na destičkách (420 nm) a zkumavkách (575 nm), modře - max. - maximální nárůst ($\ln OD \cdot 100$), NG - nerostlo, nespecifický růst.

Tab. 6 uvádí růst anaerobních bakterií na FOS Raftilose®. Na Raftilose® nejlépe rostly klostridie kromě vzorků CM11 a CM14, které nerostly na destičkách. Nejvyšší růstová rychlost byla naměřena u sbírkového kmene *C. perfringens* a *C. butyricum* ve zkumavkách. Na destičce rostl nejlépe kmen *C. tertium*.

Poměrně vyrovnané výsledky jsou mezi oběma metodami u laktobacilů, z nichž nejrychleji rostl *L. fermentum* a *L. brevis* a nejhorší růst byl naměřen u *L. delbrueckii*. Nejvyrovnanější růstová rychlost byla naměřena u kmene *L. acidophilus* (BOV).

Z bifidobakterií nerostl na FOS kmen *B. breve* (DCH, FB) na rozdíl od sbírkového kmene *B. breve* ATCC 15 700, u kterého byl patrný růst. Nejrychleji na destičkách rostly kmeny *B. animalis* ssp. *lactis* a *B. dentium*. V případě zkumavek v řadě případů u bifidobakterií nebyla optimálně zachycena růstová křivka pro výpočet rychlostí (NG).

Tab. 7 Specifické růstové rychlosti s maximálními nárůsty na Vivinalu[®]

Kmen	GOS			
	Vivinal [®]			
Klostridie	destičky	max.	zkumavky	max.
<i>C. perfringens</i> T2	0,85 ± 0,04	4,40 ± 0,09	1,24 ± 0,05	6,75 ± 0,01
<i>C. perfringens</i> FW2	1,13 ± 0,22	3,98 ± 0,08	1,21 ± 0,01	6,32 ± 0,00
<i>C. perfringens</i> DSMZ 11 778	1,37 ± 0,08	4,39 ± 0,02	1,47 ± 0,05	6,71 ± 0,02
<i>C. butyricum</i> BCA	0,54 ± 0,07	4,16 ± 0,28	1,42 ± 0,06	6,61 ± 0,02
<i>C. butyricum</i> CM14	NG	NG	1,47 ± 0,09	6,66 ± 0,01
<i>C. sp.</i> CM11	NG	NG	0,77 ± 0,13	6,34 ± 0,03
<i>C. difficile</i> KK4	0,40 ± 0,06	4,06 ± 0,03	0,83 ± 0,06	6,34 ± 0,01
<i>C. tertium</i> LAA III	1,37 ± 0,08	4,13 ± 0,02	0,74 ± 0,06	6,53 ± 0,01
<i>C. acetobutylicum</i> LA	1,11 ± 0,07	4,41 ± 0,04	0,74 ± 0,06	6,70 ± 0,03
Klostridie průměr	0,97 ± 0,38	4,22 ± 0,18	1,10 ± 0,33	6,55 ± 0,18
Laktobacily	destičky	max.	zkumavky	max.
<i>L. acidophilus</i> BOV	0,79 ± 0,11	4,32 ± 0,03	0,83 ± 0,06	6,66 ± 0,06
<i>L. acidophilus</i> MR	0,71 ± 0,04	4,63 ± 0,02	0,71 ± 0,14	6,56 ± 0,24
<i>L. brevis</i> DCH	1,04 ± 0,09	4,29 ± 0,03	1,09 ± 0,09	6,64 ± 0,03
<i>L. rhamnosus</i> JP	0,75 ± 0,09	4,46 ± 0,02	0,89 ± 0,03	6,60 ± 0,04
<i>L. rhamnosus</i> A	0,70 ± 0,12	4,27 ± 0,02	0,71 ± 0,02	6,66 ± 0,03
<i>L. delbrueckii</i> JH	0,29 ± 0,03	3,06 ± 0,11	0,36 ± 0,04	4,30 ± 0,09
<i>L. paracasei</i> KRA	0,52 ± 0,02	4,34 ± 0,03	0,50 ± 0,07	6,65 ± 0,02
<i>L. paracasei</i> JA	0,63 ± 0,07	4,35 ± 0,04	0,65 ± 0,09	6,59 ± 0,04
<i>L. fermentum</i> TS	0,83 ± 0,07	4,23 ± 0,06	0,69 ± 0,60	6,38 ± 0,09
Laktobacily průměr	0,70 ± 0,21	4,22 ± 0,45	0,72 ± 0,21	6,34 ± 0,77
Bifidobakterie	destičky	max.	zkumavky	max.
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB12	0,57 ± 0,01	3,76 ± 0,05	0,26 ± 0,05	5,23 ± 0,08
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> DSMZ 20 104	NG	NG	NG	NG
<i>B. dentium</i> AP	1,57 ± 0,39	3,50 ± 0,03	0,67 ± 0,07	5,98 ± 0,05
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ATCC 15 707	0,46 ± 0,17	3,92 ± 0,02	0,49 ± 0,28	5,59 ± 0,02
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> J2	NG	3,84 ± 0,03	NG	NG
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> FE8	0,62 ± 0,16	3,13 ± 0,04	0,67 ± 0,07	6,17 ± 0,02
<i>B. breve</i> ATCC 15 700	1,02 ± 0,33	3,18 ± 0,05	0,42 ± 0,08	5,24 ± 0,16
<i>B. breve</i> DCH	0,57 ± 0,01	3,32 ± 0,06	0,70 ± 0,10	6,13 ± 0,00
<i>B. breve</i> FB	NG	NG	NG	4,97 ± 0,49
<i>B. bifidum</i> JKM	NG	NG	0,58 ± 0,05	5,60 ± 0,19
Bifidobakterie průměr	0,80 ± 0,43	3,52 ± 0,32	0,56 ± 0,16	5,61 ± 0,45

Vysvětlivky: viz. tab. 6

Tab. 7 udává růst měřených bakterií na GOS Vivinalu[®]. Výsledky klostridií na GOS byly podobné růstu na FOS. Na Vivinalu[®] rostly nejlépe klostridie, konkrétně *C. perfringens*.

Vysoká specifická růstová rychlost byla naměřena také u *C. tertium* na destičce a *C. butyricum* ve zkumavce. Kmeny CM11 a CM14 na destičkách nerostly.

Nejvyrovnanější výsledky získané z obou metod byly naměřeny u řady laktobacilů (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*), čemuž odpovídá i průměrná rychlost laktobacilů na Vivinalu®. Z laktobacilů rostl špatně pouze kmen *L. delbrueckii*. I tyto výsledky jsou podobné růstu na FOS.

Z bifidobakterií byla naměřena nejvyšší růstová rychlost u *B. dentium* na destičce. Kmen *B. animalis* ssp. *animalis* byl jediným kmenem, který v případě obou metod nerostl. Na destičce nerostly také kmeny *B. breve* (FB) a *B. bifidum*. Ve zkumavkách nerostl kmen *B. longum* ssp. *longum*.

Tab. 8 Specifické růstové rychlosti s maximálními nárůsty na Nutriose®

Kmen	MOS			
	Nutriose® FM06			
	destičky	max.	zkumavky	max.
Klostridie				
<i>C. perfringens</i> T2	0,76 ± 0,03	4,23 ± 0,03	1,18 ± 0,03	6,56 ± 0,02
<i>C. perfringens</i> FW2	0,84 ± 0,03	4,22 ± 0,22	1,12 ± 0,13	6,48 ± 0,04
<i>C. perfringens</i> DSMZ 11 778	0,93 ± 0,06	4,15 ± 0,03	0,89 ± 0,05	6,42 ± 0,01
<i>C. butyricum</i> BCA	0,27 ± 0,03	4,14 ± 0,04	1,09 ± 0,08	6,30 ± 0,01
<i>C. butyricum</i> CM14	NG	NG	0,82 ± 0,02	5,98 ± 0,06
<i>C. sp.</i> CM11	NG	NG	0,65 ± 0,04	5,11 ± 0,07
<i>C. difficile</i> KK4	0,25 ± 0,03	2,98 ± 0,11	0,46 ± 0,18	4,78 ± 0,06
<i>C. tertium</i> LAA III	0,99 ± 0,15	2,82 ± 0,04	0,69 ± 0,09	4,97 ± 0,02
<i>C. acetobutylicum</i> L4	1,21 ± 0,11	3,83 ± 0,09	0,57 ± 0,07	6,33 ± 0,02
Klostridie průměr	0,75 ± 0,36	3,77 ± 0,61	0,83 ± 0,26	5,88 ± 0,72
Laktobacily				
<i>L. acidophilus</i> BOV	0,65 ± 0,20	2,59 ± 0,11	0,65 ± 0,13	5,84 ± 0,03
<i>L. acidophilus</i> MR	0,42 ± 0,05	3,38 ± 0,03	0,65 ± 0,05	6,03 ± 0,01
<i>L. brevis</i> DCH	0,80 ± 0,03	3,41 ± 0,03	0,72 ± 0,13	6,12 ± 0,03
<i>L. rhamnosus</i> JP	0,64 ± 0,03	2,97 ± 0,02	0,76 ± 0,01	4,86 ± 0,00
<i>L. rhamnosus</i> A	0,58 ± 0,04	2,91 ± 0,07	0,65 ± 0,11	4,85 ± 0,02
<i>L. delbrueckii</i> JH	0,30 ± 0,07	2,40 ± 0,10	0,38 ± 0,12	3,84 ± 0,18
<i>L. paracasei</i> KRA	0,52 ± 0,06	2,91 ± 0,09	0,52 ± 0,09	4,90 ± 0,07
<i>L. paracasei</i> JA	0,43 ± 0,06	2,75 ± 0,09	0,73 ± 0,12	4,74 ± 0,05
<i>L. fermentum</i> TS	0,46 ± 0,02	2,97 ± 0,05	0,68 ± 0,11	4,89 ± 0,05
Laktobacily průměr	0,53 ± 0,15	2,92 ± 0,33	0,64 ± 0,12	5,12 ± 0,74
Bifidobakterie				
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB12	NG	NG	0,70 ± 0,05	5,12 ± 0,08
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> DSMZ 20 104	NG	NG	0,56 ± 0,04	5,04 ± 0,14
<i>B. dentium</i> AP	NG	NG	0,34 ± 0,10	4,94 ± 0,02
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ATCC 15 707	NG	NG	NG	NG
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> J2	NG	NG	0,59 ± 0,11	5,08 ± 0,02
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> FE8	NG	NG	NG	NG
<i>B. breve</i> ATCC 15 700	NG	NG	0,40 ± 0,09	5,59 ± 0,02
<i>B. breve</i> DCH	NG	3,41 ± 0,01	0,35 ± 0,02	5,82 ± 0,05
<i>B. breve</i> FB	NG	NG	0,46 ± 0,04	5,59 ± 0,05
<i>B. bifidum</i> JKM	NG	NG	NG	NG
Bifidobakterie průměr	NG	NG	0,49 ± 0,13	5,13 ± 0,68

Vysvětlivky: viz. tab. 6

Růst anaerobních bakterií na MOS Nutriose[®] uvádí tab. 8. Vyšších nárůstů na MOS dosahovaly *C. perfringens*, *C. butyricum* a *C. acetobutylicum*. Kmen *C. difficile* rostl nejhůře ze všech klostridií, kmeny CM11 a CM14 na destičce nerostly, podobně jako u FOS a GOS.

Laktobacily rostly na MOS ještě pomaleji než klostridie. Z laktobacilů byl vyšší nárůst u *L. acidophilus* (MR) a *L. brevis*.

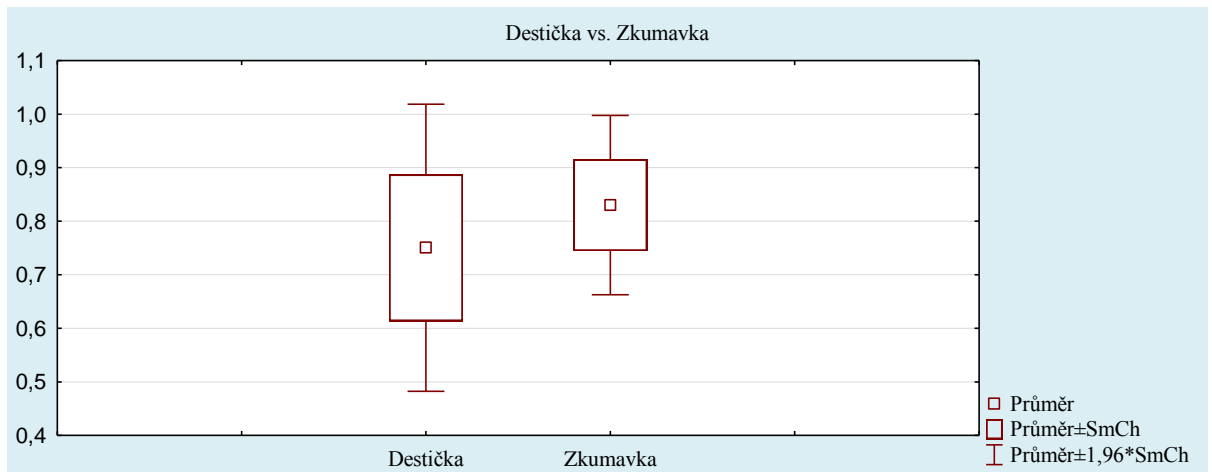
Poněkud horší výsledky na Nutriose[®] byly naměřeny u bifidobakterií, konkrétně na destičce, kde byl zaznamenán růst pouze *B. breve* (DCH). Špatný růst byl i v případě bifidobakterií ve zkumavkách. Kmeny *B. longum* ssp. *longum*, *B. longum* ssp. *infantis* a *B. bifidum* na MOS vůbec nerostly.

Z výše uvedených tabulek 6 - 8 vyplývá, že z hlediska počtu NG rostly anaerobní bakterie hůře v mikrotitračních destičkách. Významný rozdíl je především na Nutriose[®], kde byl zaznamenán růst pouze u kmene *B. breve* (DCH). Na Nutriose[®] rostly nejlépe *C. perfringens*, ale celkový průměr je v případě rychlostí i nárůstu menší, než je tomu u zbylých cukrů. Podobně tomu bylo i u bifidobakterií a laktobacilů.

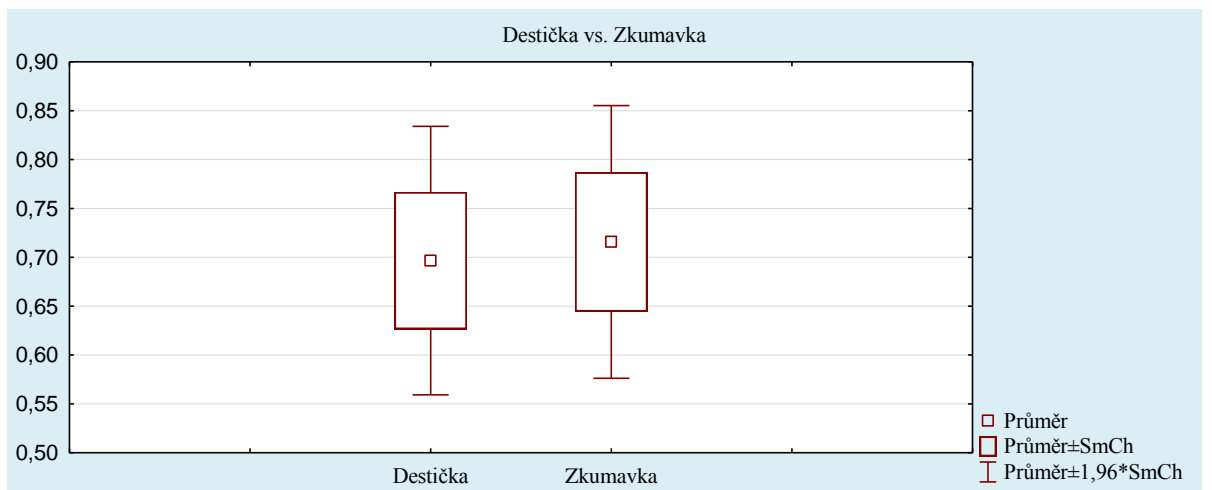
Všechny tři rody rostly podstatně lépe na Raftilose[®] a Vivinalu[®]. Na základě celkových průměrů byl u klostridií lepší růst na použitých oligosacharidech v porovnání s ostatními rody. V případě laktobacilů byly naměřeny nejmenší rychlostní rozdíly v rámci použitých metod. Větší rozdíly ve výsledcích byly naměřeny u bifidobakterií. Oproti laktobacilům a klostridiím byla vyšší růstová rychlost na destičkách než ve zkumavkách.

V programu Statistica 12 byly statisticky T - testem porovnávány průměrné hodnoty specifických růstových rychlostí v rámci metod na jednotlivých cukrech. Na základě zvolené hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) nejsou s 95 % pravděpodobností mezi metodami statisticky významné rozdíly. V případě bifidobakterií na Nutriose[®] nebylo možné hodnoty statisticky porovnávat. Pro přehled jsou uvedeny na následující stránce některé krabicové grafy (13 - 15).

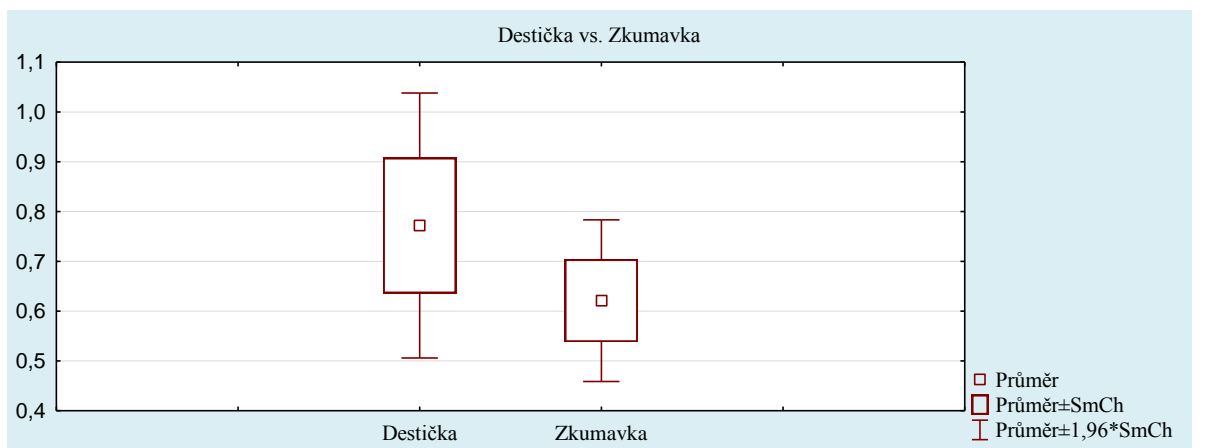
Graf 13 Klostridie na Nutriose® FM06



Graf 14 Laktobacily na Vivinalu®



Graf 15 Bifidobakterie na Raftilose® P95



6. Diskuze

Bakterie jsou přirozenou součástí mikroflóry tlustého střeva, která je z více jak 99 % obligátně anaerobní (Kerckhoffs et al., 2006). Během prvních dní po narození, jsou v tlustém střevě většinou dominantně zastoupeny bifidobakterie, jejichž počet se s časem postupně snižuje (Mitsuoka, 1990). Byl však prokázán vztah mezi nižším počtem bifidobakterií v souvislosti se zvýšeným rizikem infekcí a některými chronickými degenerativními nemocemi (Rowland et Gill, 2008).

Na trhu existuje řada komerčních prebiotik, jež mohou příznivě ovlivnit složení střevní mikroflóry. Pro zjištění bakteriálního růstu na kultivačních médiích obohacených o prebiotika se využívají růstové křivky. Růstové křivky jsou často měřeny v kultivačních zkumavkách, nicméně tento způsob měření je náročný na spotřebu materiálu, a proto spolu s touto metodou byl v této diplomové práci měřen i růst na mikrotitračních destičkách.

Ze zjištěných výsledků v tabulkách 6 - 8 je zřejmé, že na růst anaerobních bakterií měla vliv jak zvolená metoda, tak i použitý cukr.

V případě bifidobakterií na mikrotitračních destičkách (tab. 6) nebyl zaznamenán žádný nebo velmi slabý růst na Nutriose[®]. Podle Crittendena et Playna (1996) MOS obecně nepodporují zvýšení počtu bifidobakterií v tlustém střevě, jelikož jsou hydrolyzovány a absorbovány již ve střevě tenkém. Nelze je tedy považovat dle obecné definice za prebiotika (Collins et Gibson, 1999). Nutriose[®] však podléhá částečné hydrolyze a z větší části se účastní fermentace v tlustém střevě (Lefranc - Millot et al., 2009). V rámci obecných definic se tedy jedná o prebiotickou rozpustnou vlákninu. (Lefranc - Millot et al., 2012). Nicméně hydrolyza MOS již v horní části TT a jejich absence v tlustém střevě by mohla být vysvětlením poněkud horšího růstu bakterií na Nutriose[®] ve srovnání s ostatními cukry.

Podle jedné starší studie Sugawary et al. (1989) konzumace kukuřičného sirupu bohatého na maltotetraosu vede ke snížení počtu hnilobných bakterií, včetně *C. perfringens*. Také Lefranc - Millot et al. (2012) dodávají, že Nutriose[®] inhibuje růst *C. perfringens*. Z našich výsledků je však patrný lepší růst klostridií na MOS, především zmíněné *C. perfringens*. Je tedy sporné, zda by Nutriose[®] měla být podávána k optimalizaci střevní mikroflóry, jelikož kmen *C. perfringens* je grampozitivní patogen, jenž se nachází nejen v ovzduší a půdě, ale také v trávicím traktu lidí a zvířat (Briolat et Reysset, 2002).

Prioritou této práce však bylo porovnat výsledky mezi metodami, a proto je potřeba zdůvodnit příčinu špatného růstu bifidobakterií spolu se vzorky klostridií CM14 a CM11

na mikrotitrační destičce. Protože se bifidobakterie a klostridie řadí mezi anaerobní bakterie předpokládá, že na bakteriální růst přece jenom působila určitá přítomnost kyslíku při měření.

Podle Ventury et al. (2004) jsou některé druhy bifidobakterií schopné tolerovat nízké koncentrace kyslíku, což by mohlo vysvětlovat růst DCH na Nutriose[®], u kterého byl na destičce patrný zákal, viz. graf 9.

V práci Andriantsoaniriny et al. (2013) porovnávali toleranci bifidobakterií vůči oxidačnímu stresu a stresovým faktorům TT (žluč, žaludeční šťávy). Z testovaných kmenů na základě jejich výsledků mají kmeny *B. longum* a *B. breve* nejlepší toleranci vůči těmto stresovým podmínkám. Dále autoři dodávají, že je u těchto kmenů potenciál využití jako lidská probiotika.

Nicméně pokud připustíme podle našich výsledků vliv kyslíku, konkrétně na destičkách, lze předpokládat, že v případě zkumavek měl na růst vliv také zvolený cukr, především MOS, na který zřejmě nejsou bakterie vhodně enzymaticky vybaveny, poněvadž i fakultativně anaerobní laktobacily na nich rostly pomaleji a nedosahovaly takového nárůstu (tab. 8). Pravděpodobně je to dáno již zmíněnou částečnou hydrolyzou MOS v tenkém střevě.

Pro rozpoznání a vyloučení kontaminovaných médií kyslíkem, byl přidán indikátor rezaurin, jež tato média zbarví do růžova. Oproti zkumavkám však práce s mikrotitračními destičkami probíhá v boxu za uměle vytvořených anaerobních podmínek a je potřeba poté destičky překrýt vzduchotěsnou folií. Nelze tedy vyloučit možnou pozdější kontaminaci. Můžeme však polemizovat, zda vzduchotěsná krycí folie je dostatečnou ochranou před vnějším prostředím.

Pokud daný kmen např. DCH a FB nerostl jak na destičce, tak ve zkumavce (viz. tab. 6), můžeme z toho vyvodit, že daný kmen neroste, ať už z hlediska zvoleného substrátu nebo z jiného důvodu, např. zachování původních anaerobních podmínek. Byl - li však patrný růst na destičce, oproti měření ve zkumavce, lze připustit chybu při měření, viz. kmen J2 v tab. 7.

Je třeba také zmínit, že v kultivačních zkumavkách je 9 ml média, zatímco do jamek bylo pipetováno po 0,2 ml, tedy i množství média zde může hrát svůj význam. Vedle běžných destiček existují ještě tzv. Deep Well destičky, kde je možné pipetovat vzorky ve větším množství, což by mohlo být náplní další práce, měřením na tomto typu destiček pro potvrzení či vyvrácení této hypotézy.

Možnou přítomnost kyslíku naznačují také výsledky laktobacilů. Fakultativně anaerobní bakterie mohou růst jak v přítomnosti, tak nepřítomnosti kyslíku (Stieglmeier et al., 2009). Při porovnání obou metod byly v případě laktobacilů specifické růstové rychlosti

poměrně vyrovnané. Nejslabší růst byl zaznamenán u *L. delbrueckii* (JH), jenž rostl špatně v rámci obou metod. Výsledky tedy naznačují možnou náhradu zkumavek pro měření růstových křivek fakultativně anaerobních bakterií na mikrotitračních destičkách.

Z anaerobních bakterií byl z hlediska specifických rychlostí poměrně vyrovnaný růst u *C. perfringens*. Ačkoliv se jedná o striktně anaerobního patogena, jeho buňky mohou přežít krátké vystavení kyslíku a adaptovat se na jeho reaktivní formy. Nicméně tento proces adaptace není zcela objasněn (Jean et al., 2004).

Dalším neobvyklým patogenem u lidí je *C. tertium*, jenž je spojován s řadou nemocí (Ray, 2003). Od ostatních klostridií se odlišuje tím, že neprodukuje toxiny a je aerotolerantní (Miller et al., 2001). Právě u *C. tertium*, v případě destiček na Raftilose[®] v tab. 6, byla naměřena nejvyšší růstová rychlost. V porovnání s druhou metodou (Raftilose[®] et Vivinal[®]) však u tohoto kmene byla zaznamenána téměř poloviční rychlost. Nelze říci, že by *C. tertium* rostl pomaleji ve zkumavkách, ale protože měření pomocí Densitometru probíhalo pouze ve 4 opakováních, ne vždy byla každá křivka vhodná pro výpočet specifické rychlosti. Velkou výhodou destiček, oproti zkumavkám, je možnost zaznamenat více křivek (8) s minimální spotřebou materiálu. Navíc každá jamka je měřena automaticky a měření tak probíhá plynule.

Protože nebylo možné porovnat některé výsledky na základě rychlostí (NG), nelze z toho vyvodit, že daný kmen nerostl. Pouze nešlo grafem optimálně proložit přímkou, která by procházela 3 body, jak je uvedeno u grafu 7 a 10 (AP). Tento problém se týkal především bifidobakterií na Raftilose[®] (*B. animalis*, *B. dentium*), což může zkruslovat průměrný růst bifidobakterií ve zkumavkách, proto byly dodány také hodnoty maximálního nárůstu.

Poměrně dobrý růst měl z bifidobakterií kmen *B. dentium*, který je patogenem ústní dutiny, kde se dokázal adaptovat poněkud odlišným podmínkám, než které se nachází v TT. Jeho schopností zde přežít, využívat široké rozmezí substrátů, a přispívat tak k rozvoji zubního kazu, se ve své studii zabývali Ventura et al. (2009). Schopnost *B. dentium* adaptovat se poněkud odlišným podmínkám by tedy mohla zdůvodnit jeho dobrý růst, konkrétně na Vivinalu[®] (tab. 7), kde byla u tohoto kmene naměřena nejvyšší růstová rychlost. Ve srovnání s *B. dentium* rostl z bifidobakterií rychleji pouze kmen *B. animalis* ssp. *lactis* na Raftilose[®] (tab. 6), který byl jako jediný ze vzorků původně izolován z mléčných výrobků. Právě díky zvýšené rezistenci vůči náročným podmínkám (pH, kyslík), je kmen *B. animalis* průmyslově využíván v kysaných mléčných výrobcích (Yaeshima, 1996; Gomes et Malcata, 1999). Ve své práci Jayamanne et Adams (2006) došli k závěru, že kmen *B. animalis* ssp. *lactis* má výborné schopnosti pro přežití, včetně tolerance vůči oxidačnímu stresu v porovnání

s dalšími kmeny bifidobakterií. Opět se tedy potvrzuje pravděpodobnost možného vlivu kyslíku na růst anaerobních bakterií.

Při porovnání obou metod také můžeme konstatovat, že z hlediska počtu NG u naměřených specifických růstových rychlostí, jsou bifidobakterie obtížně porovnatelné a náročnější na zachování anaerobních podmínek, než je tomu u klostridií. Možnou příčinou lepšího růstu klostridií může být skutečnost, že na rozdíl od bifidobakterií klostridie produkují plyny a mohou tak do jisté míry modifikovat své prostředí.

Přestože mikrotitrační destičky nám velmi usnadňují práci, zdá se, že na zachování anaerobních podmínek jsou přece jenom méně vhodné, ale na základě statistického vyhodnocení celkových průměrných rychlostí u jednotlivých rodů, není mezi metodami statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$). Statisticky významný rozdíl není ani v případě bifidobakterií na komerčních prebiotikách Raftilose[®] a Vivinalu[®].

Podle Rady et al. (2008) je diskutabilní, zda komerčně dostupná prebiotika by měla být podávána kojencům, které trpí deficitem bifidobakterií, jelikož komerční prebiotika podporují také růst klostridií. Podobné výsledky mají Bunešová et al. (2012), že komerčně dostupné FOS a GOS mohou podporovat růst ostatních fekálních bakterií, nejenom tedy bifidobakterií a laktobacilů, jež jsou častým cílem prebiotik (Slavin, 2013). Naše výsledky jsou ve schodě s jejich výsledky a potvrzují tak, že FOS a GOS podporují růst klostridií a na závěr lze dodat, že podobně může být diskutabilní využití MOS.

7. Závěr

Diplomová práce potvrzuje hypotézu, že na růst anaerobních bakterií mají vliv nejenom zvolená prebiotika, ale také vztah bakterií ke kyslíku v závislosti na použité metodě.

Podle statistického vyhodnocení nebyly mezi kultivačními zkumavkami a mikrotitračními destičkami statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$).

Nejlépe na použitých prebiotických oligosacharidech rostly klostridie.

V případě bifidobakterií nebylo možné výsledky na MOS porovnat, jelikož na mikrotitrační destičce prakticky nerostly.

Slabý růst na MOS byl také u bifidobakterií v kultivačních zkumavkách spolu s laktobacily a využití MOS je tedy diskutabilní, jelikož podporovaly spíše *C. perfringens*.

Nicméně na základě naměřených výsledků nejsou mikrotitrační destičky vhodné pro měření růstových křivek anaerobních bakterií.

Poměrně vyrovnané výsledky byly zaznamenány u laktobacilů.

Závěrem lze konstatovat, že anaerobní bakterie nejsou z hlediska specifických růstových rychlostí v rámci použitých metod porovnatelné.

V případě fakultativně anaerobních bakterií by mikrotitrační destičky mohly nahradit kultivační zkumavky.

Dále je možnost na tuto práci navázat měřením na tzv. Deep Well destičkách, kde je možné pipetovat kultivační médium ve větším množství, což může hrát také svou roli.

8. Seznam použité literatury

- Adams, M. R., Moss, M. O. 2008. Food Microbiology. 3th ed. Royal Society of Chemistry. Cambridge. p. 463. ISBN: 9780854042845.
- Ahmed, T., Kanwal, R., Ayub, N. 2006. Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from camel milk. *Biotechnology* 5 (4). 481-488.
- Andereesen, J. R., Bahl, H., Gottschalk, G. 1989. Introduction to the Physiology and Biochemistry of the Genus *Clostridium*. In: Minton, N. P., Clarke, D. J. (eds.). *Biotechnology Handbooks 3. Clostridia*. Plenum Press, New York. p. 27-62. ISBN: 0306432617.
- Andriantsoanirina, V., Allano, S., Butel, M. J., Aires, J. 2013. Tolerance of human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe*. 21. 39-42.
- Ballongue, J. 2004. *Bifidobacteria* and Probiotic Action. In: Salmien, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3th ed. Marcel Dekker, Inc., New York. p. 67-124. ISBN: 0824753321.
- Barille, D., Rastall, R. A. 2013. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology*. 24. 214-219.
- Barinov, A., Bolotin, A., Langella, P., Maguin, E., Van De Guchte, M. 2011. Genomics of The Genus *Lactobacillus*. In: Sonomoto K., Atsushi Y. (eds.). *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria*. Caister Academic Press. Norfolk. p. 91-102. ISBN 9781904455820.
- Blaut, M., Clavel, T. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *The Journal of Nutrition*. 137. 751-755.
- Berezina, O. V., Sineoky, S. P., Velikodvorskaia, G. A., Schwarz, W., Zverlov V. V. 2008. Extracellular glycosyl hydrolase activity of the *Clostridium* strains producing acetone, butanol, ethanol. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44 (1). 42-47.

- Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, Ch., Flourié, B., Brouns, F., Bornet, F. R. 2004. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel - group, dose-response relation study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 80. 1658-1664.
- Briolat, V., Reysset, G. 2002. Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptive response to oxidative stress. *Journal of Bacteriology*. 184 (9). 2333-2343.
- Brioukhanov, A. L., Netrusov, A. I. 2007. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43 (6). 567-582.
- Bronský, J. 2011. Mateřské mléko jako zdroj bakterií s potencionálně probiotickými účinky. *Pediatric pro praxi*. 12 (2). 94-96.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzner, T. A. 2010. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 25th ed. McGraw Hill Medical. New York. p. 832. ISBN: 9780071624961.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Kňazovická, V., Ročková, Š., Geigerová, M., Božik, M. 2012. Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica*. 57. 273-275.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J. 2000. Oxidative stresses in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*. 3. 3-8.
- Collins, M. D., Gibson, G. R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1052-1057.
- Crittenden, R. G., Playne M. J. 1996. Production, properties and applications of food - grade oligosaccharides. *Trends in Foods Science & Technology*. 7. 353-361.

- Cummings, J. H., Englyst, H. N. 1987. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *American Journal of Clinical Nutrition*. 45. 1243-1255
- Darbro, B. W., Petroelje, B. K., Doern, G. V. 2009. *Lactobacillus delbrueckii* as the cause of urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 47 (1). 275-277.
- Deguchi, Y. Morishita, T. Mutai, M. 1985. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49. 13-16.
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., Akkermans, A. D. L. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*. 68. 219-226.
- Fliss, I., Ouwehand, A. C., Kheadr, E., Lahtinen, S., Davids, S. J. 2010. Antimicrobial Activity of the Genus *Bifidobacterium*. In: Mayo, B., Van Sinderen, D. (eds.). *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects*. Caister Academic Press. Norfolk. p. 125-144. ISBN: 9781904455684.
- Forssten, S. D., Lahtinen, S. J., Ouwehand, A. C. 2011. The Intestinal Microbiota and Probiotics. In: Malago, J. J., Koninkx, J. F. J. G., Marinsek - Logar, R. (eds.). *Probiotic Bacteria and Enteric Infections: Cytoprotection by Probiotic Bacteria*. Springer. Dordrecht. p. 41-63. ISBN: 9789400703858.
- Gerardi, M. H. 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Wiley & Sons. New Jersey. p. 192. ISBN: 0471206938.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125 (6). 1401-1412.
- Goderska, K., Stanton, C. 2010. Viability and Stability of Bifidobacteria in Commercial Preparations. In: Mayo, B., Van Sinderen, D. (eds.). *Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects*. Caister Academic Press. Norfolk. p. 217-233. ISBN: 9781904455684.

- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food & Technology*. 10. 139-157.
- González - Rodríguez, I., Ruiz, L., Gueimonde, M., Margolles, A., Sánchez, B. 2013. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*. 340. 1-10.
- Görner, F., Valík, L. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín*. Malé Centrum. Bratislava. 528 s. ISBN: 8096706497.
- Guarner, F., Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 361. 512-519.
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., Barlow, M. 2013. Growth rates made easy. 31 (1). 232-238.
- Ishibashi, N., Yaeshima, T., Hayasawa, H. 1997. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malaysian Journal of Nutrition*. 3. 149-159.
- Jardine, S. 2009. *Prebiotics and Probiotics*. 2nd ed. Wiley - Blackwell. Ames. p. 152. ISBN: 9781905224524.
- Jean, D., Briolat, V., Reysset, G. 2004. Oxidative stress response in *Clostridium perfringens*. *Microbiology*. 150. 1649-1659.
- Jayamanne, V. S., Adams, M. R. 2006. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio - yoghurts. *Letters in Applied Microbiology*. 42. 189-194.
- Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K., Niimura, Y. 2006. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (11). 6854-6858.

Kerckhoffs, A. P. M., Samsom, M., Van Berge Henegouwen, G. P., Akkermans, L. M. A., Nieuwenhuijs, V. B., Visser, M. R. 2006. Sampling Microbiota in the Human Gastrointestinal Tract. In: Ouwenhand, A. C., Vaughan, E. E. (eds.). *Gastrointestinal Microbiology*. Taylor & Francis Group. New York. p. 25-50. ISBN: 0824726413.

Koliba, P. 2012. Probiotika z pohledu gynekologa. *Medicína pro praxi*. 9 (8-9). 354-359.

Kurtz, D. M. 2003. Oxygen and Anaerobes. In: Ljungdahl, L. G., Adams, M. V., Barton, L. L., Ferry, J. G., Johnson, M. K. (eds.). *Biochemistry and Physiology of Anaerobic Bacteria*. Springer. New York. p. 128-142. ISBN: 0387955925.

Kvasničková, A. 2000. Sacharidy pro funkční potraviny probiotika - prebiotika - synbiotika. ÚZPI. Praha. 82 s. ISBN: 807271001X.

Lamsal, B. P. 2012. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92. 2020-2028.

Lata, J., Juránková, J. 2011. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 13 (2). 63-69.

Lefranc - Millot, C., Guérin - Deremaux, L., Wils, D., Neut, C., Miller, L. H., Saniez - Degrave, M. H. 2012. Impact of a resistant dextrin on intestinal ecology: how alternating the digestive ecosystem with Nutriose[®], a soluble fiber with prebiotic properties, may be beneficial for health. *The Journal of International Medical Research*. 40. 211-224.

Lefranc - Millot, C., Wills, D., Roturier, J. M., Le Bihan, C, Saniez - Degrave, M. H. 2009. Nutriose[®] Soluble Fiber. In: Cho, S. S., Samuel, P. (eds.) *Food Applications and Health Benefits*. CRC Press. Boca Raton. p. 19-40. ISBN: 9781420043846.

Linhová, M. 2011. Mikrobiální produkce 1 - butanolu. *Bioprospect*. 21 (4). 78-84.

Lee, Y. K. 2009. Probiotic Microorganisms. In: Lee, Y. K., Salmien, S. (eds.). *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. 2nd ed. John Wiley & Sons. Hoboken. p. 3-176. ISBN: 9780470135440.

Léké, A., Romond, M. B., Mullié, C. 2007. Insights in the human bifidobacterial flora through culture dependent and independent techniques. *Formatex*. 758-765

Macfarlane, G. T., Gibson, G. R. 1997. Carbohydrate Fermentation, Energy Transduction and Gas Metabolism the Human Large Intestine. In: Mackie, R. I., White, B. A. (eds.). *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman and Hall. London. p. 269-318. ISBN: 0412983613.

Manson, J. M., Rauch, M., Gilmore, M. S. 2008. The Commensal Microbiology of the Gastrointestinal Tract. In: Huffnagle, G. B., Noverr, M. C. (eds.). *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*. Springer. New York. p. 15-28. ISBN: 9780387095493.

Maxa, V., Rada, V. 1996. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. *ÚZPI*. Praha. 42 s. ISBN: 8085120577.

McCartney, A. L., Gibson, G. R. 2006. The Normal Microbiota of the Human Gastrointestinal Tract: History of Analysis, Succession, and Dietary Influences. In: Ouwenhand, A. C., Vaughan, E. E. (eds.). *Gastrointestinal Microbiology*. Taylor & Francis Group. New York. p. 51-73. ISBN: 0824726413.

Miller, D. L., Brazer, S., Murdoch, D., Reller, L. B., Corey, G. R. 2001. Significance of *Clostridium tertium* bacteremia in neutropenic and nonneutropenic patients: Review of 32 cases. *Clinical Infectious Diseases*. 32. 975-978.

Mitchell, W. J. 2001. General Biology and Physiology. In: Bahl, H., Dürre, P. (eds.). *Clostridia: Biotechnology and Medical Applications*. Wiley-VCH. Weinheim. p. 49-104. ISBN: 3527600108.

Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology*. 6. 263-268.

Neidhardt, F. C. 2004a. Bacterial Processes. In: Ryan, K. J., Ray, C. G. (eds.). *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. 4th ed. McGraw Hill. New York. p. 27-51. ISBN: 0071502386.

- Neidhardt, F. C. 2004b. Bacterial Structures. In: Ryan, K. J., Ray, C. G. (eds.). Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. 4th ed. McGraw Hill. New York. p. 11-25. ISBN: 0071502386.
- Ohtsuka, K., Benno, Y., Endo, K., Ueda, H., Ozawa, S., Uchida, T., Mitsuoka, T. 1989. Effects of 4'galactosyllactose intake on human fecal microflora. *Bifidus* 2. 143-149.
- Pommerville, J. C. 2010. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. 9th ed. Jones and Barlet Publishers. Sudbury. p. 860. ISBN: 9780763762582.
- Priebe, M. G., Vonk, R. J., Sun, X., He, T., Harmsen, H. J. M., Welling G. W. 2002. The physiology of colonic metabolism: possibilities for interventions with pre - and probiotics. *European Journal of Nutrition*. 41. I/2-I/10.
- Rada, V. 2010. Využití prebiotik, probiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi*. 12 (2). 92-97.
- Rada, V., Nevoral, J., Trojanová, I., Tománková, E., Šmehilová, M., Killer J. 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in *in vitro* conditions. *Anaerobe*. 14. 205-208.
- Ray, P., Das, A., Singh, K., Bhansali, A., Yadav, T. D. 2003. *Clostridium tertium* in nectrotizing fasciitis and gangrene. *Emerging Infectious Diseases*. 9 (10). 1347-1348.
- Reyed, R. M. 2007. The role of bifidobacteria in health. *Research Journal of Medical Sciences*. 2 (1). 14-27.
- Roy, D. 2003. Media for Detection and Enumeration of Bifidobacteria in Food Products. In: Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., Baird, R. M. (eds.). *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. 37. Elsevier Science B. V. Amsterdam. p. 147-160. ISBN: 0444510842.
- Rowland, I., Gill, Ch. 2008. Prebiotics and Nutrition in the Elderly: The Concept of Healthy Ageing. In: Gibson, G. R., Roberfroid M. B. (eds.). *Handbook of Prebiotics*. CRC Press. New York. p. 405-419. ISBN: 0849381711.

- Rudolfová, J., Čurda, L. 2005. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy*. 99. 168-174.
- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. 1999. Recent progress on research and applications of non - digestible galacto - oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 9. 69-80.
- Sanders, M. E., Klaenhammer, T. R. 2001. Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NFCM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science*. 84. 319-331.
- Sedláčková, P., Horáčková, Š., Plocková, M. 2011. Charakteristika laktobacilů izolovaných z trávicího traktu kojenců. *Mlékařské listy*. 129. 2-6.
- Seki, H., Shiohara, M., Matsumura, T., Miyagawa, N., Tanaka, M., Komiyama, A., Kurata, S. 2003. Prevention of antibiotic - associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatrics International*. 45. 86-90.
- Slavin, J. 2013. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 5. 1417-1435.
- Sýkora, J. 2011. Prebiotika a kojenecká výživa. *Praktické lékařství*. 7 (4). 187-190.
- Šilhánková, L. 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vydání. Academia. Praha. 363 s. ISBN: 9788020017031.
- Štern, A. 2006. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 14 (35). 146-151.
- Stieglmeier, M., Wirth, R., Kminek, G., Moissl - Eichinger, Ch. 2009. Cultivation of anaerobic and facultatively anaerobic bacteria from spacecraft - associated clean rooms. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (11). 3484-3491.
- Sugawara, M., Takeuchi, M., Nakakuki, T., Mitsuoka, M. 1989. Effect of maltotetraose - rich corn syrup of the human intestinal microflora. 42 (2). 123 - 127.

- Švestka, T. 2007. Mikroflóra trávicího traktu a probiotika. *Pediatric pro praxi*. 8 (4). 220-221.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, Ch. L. 2010. *Microbiology: An Introduction*. 10th ed. Benjamin Cummings. San Francisco. p. 960. ISBN: 032155007-2.
- Trivedi, P. C., Pandey, S., Bhadauria, S. 2010. *Text Book of Microbiology*. Aavishkar Publishers, Distributors. Jaipur. P. 446. ISBN: 9788179103067.
- Turroni, F., Van Sinderen, D., Ventura, M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 37-44.
- Vandeplass, Y., Devreker, T., Salvatore, S., Hauser, B. 2008. Prebiotics and Infant Nutrition. In: Gibson, G. R., Roberfroid M. B. (eds.). *Handbook of Prebiotics*. CRC Press. New York. p. 393-403. ISBN: 0849381711.
- Vásquez, A., Jakobsson, T., Ahrné, S., Forsum, U., Molin, G. 2002. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (8). 2746-2749.
- Ventura, M., Canchaya, C., Casale A. D., Dellaglio F., Neviani, F., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. 2006. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56. 2783-2792.
- Ventura, M., Turroni, F., O'Connell Motherway, M., MacSharry, J., Van Sinderen, D. 2012. Host - microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends in Microbiology* . 20 (10). 467-476.
- Ventura, M., Turroni, F., Zomer, A., Feroni, E., Giubelliny, V., Bottacini, F., Canchaya, C., Claesson, M. J., He, F., Mantzourani, M., Mulas, L., Ferrariny, A., Gao, B., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Gupta, R. S., Zhang, Z., Beighton, D., Fitzgerald, G. F., O'Toole, P. W., Van Sinderen, D. 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genetics*. 5. e1000785.
- 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.

Watson, D., O'Connell Motherway, M., Shoterman, M. H. C., van Nerven, R. J., Nauta, A., Van Sinderen, D. 2012. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 114. 1132-1146.

Wells, C. L., Wilkins, T. D. Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli [online]. Galveston. University of Texas Medical Branch. 1996 [cit. 2013-11-2]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8219/>>.

Woo, T. D. H., Oka, K., Takahashi, M., Hojo, F., Osaki, T., Hanawa, T., Kurata, S., Yonezawa, H., Kamiya, S. 2011. Inhibition of the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* *in vitro* by *Clostridium butyricum* MIYARI 588 strain. *Journal of Medical Microbiology*. 60. 1617-1625.

Wu, S., Yuan, L., Zhang, Y., Liu, F., Li, G., Wen, K., Kocher, J., Yang, X., Sun, J. 2013. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG mono - association suppresses human rotavirus - induced autophagy in the gnotobiotic piglet intestine. *Gut Pathogens*. 5 (22). 1-8.

Yaeshima, T., Takahashi, S., Ishibashi, N., Shimamura, S. 1996. Identification of bifidobacteria from dairy products and evaluation of a microplate hybridization method. *International Journal of Food Microbiology*. 30. 303-313.

Yamamoto, Y., Gaudu, P., Gruss, A. 2011. Oxidative Stress and Oxygen Metabolism in Lactic Acid Bacteria. In: Sonomoto K., Atsushi Y. (eds.). *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria*. Caister Academic Press. Norfolk. p. 91-102. ISBN 9781904455820.

Yoshioka, H., Fujita, K., Sakata, H., Murono, K., Iseki, K. 1991. Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in infants and children. *Bifidobacteria and Microflora*. 10 (1). 11-17.

Zbořil, V., Prokopová, L., Hertlová, M. 2005. *Mikroflóra trávicího traktu - klinické souvislosti*. Grada Publishing. Praha. 153 s. ISBN: 9788024762104.

9. Seznam použitých zkratek

ATCC - American Type Culture Collection

B. - *Bifidobacterium*

C. - *Clostridium*

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

FOS - frukto - oligosacharidy

GOS - galakto - oligosacharidy

KTJ - kolonie tvořící jednotku

L. - *Lactobacillus*

MOS - malto - oligosacharidy

NG - neroste, nespecifický růst

OD - optická densita

SOD - superoxid dismutáza

spp. - species

ssp. - subspecies

TT - trávicí trakt

10. Samostatné přílohy

Obr. 1: Bug box



<http://www.ruskin.com/products/bugboxplus>

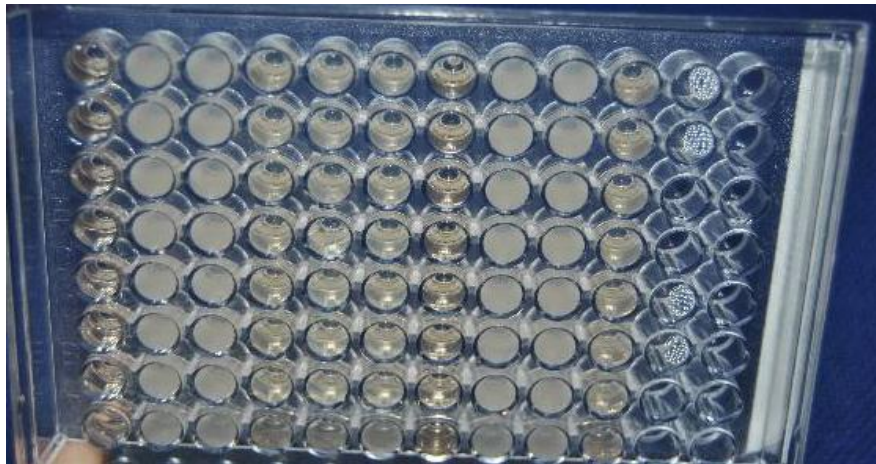
Obr. 2: Pipetování vzorků na mikrotitrační destičku



Obr. 3: Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan)



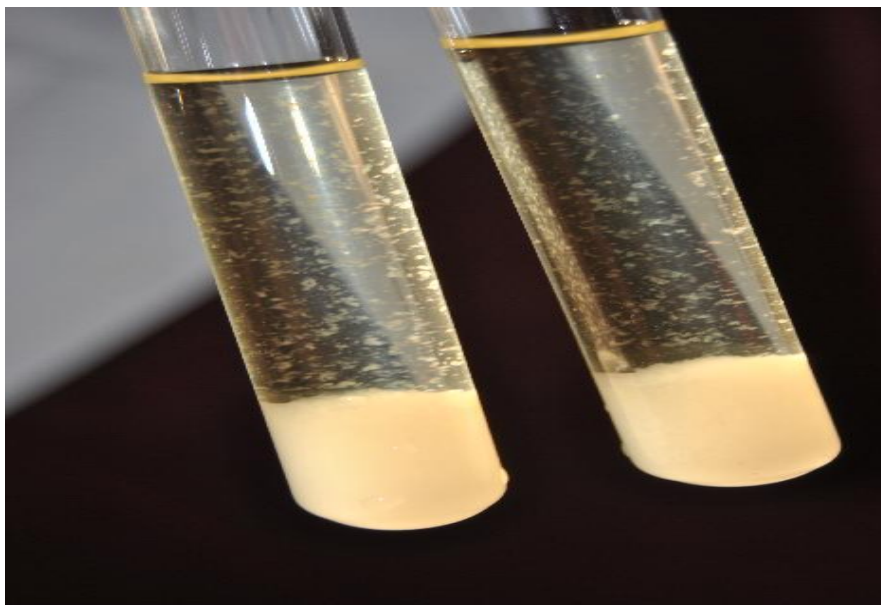
Obr. 4: Mikrotitrační destička po 24h měření ze spodu



Obr. 6: Rozočkované kmeny s cukry ve zkumavkách



Obr. 7: Agregace anaerobních bakterií ve zkumavkách při měření



Obr. 5: Densitometr DEN - 1B

