

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Norfloxacin jako selektivní faktor v kultivačních médiích pro
bifidobakterie**

Bakalářská práce

Autor práce: Hana Salmonová

2012

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „Norfloxacin jako selektivní faktor v kultivačních médiích pro bifidobakterie“ vypracovala samostatně a použila pouze pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze, dne 10.4.2012

Podpis autora práce:

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala všem lidem, kteří mě učili, vedli a pomáhali mi v průběhu celého studia a při tvorbě této bakalářské práce. Především bych ráda poděkovala paní doc. Ing. Evě Vlkové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za pomoc při vypracování, předané vědomosti, praktické zkušenosti, vypůjčené materiály, čas, trpělivost, motivaci a vždy příjemnou spolupráci. Dále bych ráda poděkovala svým kamarádům a spolužákům, kteří mi byli podporou. Závěrem bych chtěla ze srdce poděkovat svým rodičům, kteří mi byli největší oporou a motivací, nejen při studiu.

Souhrn

V současné době existuje řada médií pro bifidobakterie, ale žádné není spolehlivé pro izolaci ze všech prostředí. Běžně používané médium s mupirocinem nepotlačuje růst klostridií běžně se vyskytujících v trávicím traktu. Proto je cílem bakalářské práce ověřit, zda je norfloxacin vhodnou selektivní látkou do médií pro izolaci bifidobakterií, tedy zda jsou klostridie na toto antibiotikum citlivé, zatímco bifidobakterie jsou rezistentní.

Při testování bylo použito 61 kmenů rodu *Bifidobacterium* a 62 kmenů rodu *Clostridium*, z toho 22 kmenů ze sbírek typových kultur. Testované kmeny bakterií byly izolovány převážně ze stolice lidí a výkalů zvířat. Dále byly použity kmeny izolované z japonského mléčného výrobku a volete slepic. Testování citlivosti vybraných kmenů na norfloxacin a mupirocin bylo provedeno pomocí diskové difúzní metody na Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid) s přídatkem sojového peptonu, L-cysteinu a tweenu 80. Po kultivaci se citlivost projevila inhibiční zónou a její průměr byl měřen v celých mm. Kmeny, které vytvořily v okolí antibiotického disku inhibiční zónu 10 mm a více, byly považovány za citlivé. Kmeny se zónami 6 až 10 mm, byly považovány za mírně citlivé a kmeny se zónami 6 mm, za rezistentní. Testované kmeny bifidobakterií byly na norfloxacin vesměs rezistentní. Pouze 2 ze 61 kmenů projevily na toto antibiotikum citlivost a to průměrnými inhibičními zónami 13,33 mm a 18,33 mm. Naopak 58 ze 62 testovaných kmenů klostridií bylo na norfloxacin citlivých, 4 kmeny byly mírně citlivé a žádný kmen nebyl rezistentní.

Dále byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) norfloxacinu a směsi norfloxacinu s mupirocinem (100 mg/l). Růst 12 kmenů bifidobakterií nebyl omezen ani při koncentraci 300 mg/l norfloxacinu. Růst 20 kmenů klostridií byl inhibován při různých koncentracích norfloxacinu: 10 mg/l 6 kmenů, 30 mg/l 2 kmeny, 50 mg/l 3 kmeny, 80 mg/l 1 kmen, 150 mg/l 2 kmeny, 200 mg/l 4 kmeny a růst 2 kmenů nebyl limitován ani při koncentraci 300 mg/l. Směs s mupirocinem (100 mg/l) ovlivnila koncentraci norfloxacinu inhibujícího růst bakterií u 1 ze 32 kmenů, ze 30 mg/l na 10 mg/l norfloxacinu.

Z bakalářské práce vyplývá, že norfloxacin je vhodnou selektivní látkou, která potlačuje růst klostridií a zároveň neomezuje rozvoj bifidobakterií, lze ho tedy testovat pro využití do kultivačních médií pro bifidobakterie v koncentraci 200 mg/l.

Klíčová slova: bifidobakterie, klostridie, norfloxacin, mupirocin, disková difúzní metoda, minimální inhibiční koncentrace.

Summary

Currently, there are a number of media for bifidobacteria, but none are reliable for the isolation from all environments. Commonly used media with mupirocin does not suppress the growth of clostridia commonly occurring in the digestive tract. Therefore, the aim of this thesis is to verify if norfloxacin is suitable selective agent for media used for isolation of bifidobacteria, in other words, whether clostridia are sensitive to this antibiotic, while bifidobacteria are resistant.

There were 61 strains of *Bifidobacterium* and 62 strains of *Clostridium* used in the tests, including 22 strains from the collections of type cultures. The tested strains were isolated mainly from human and animal faeces. Strains isolated from Japanese dairy product and chicken crop were also used. Norfloxacin and mupirocin susceptibility testing of selected strains were performed using the disk-diffusion method on Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) containing soybean peptone, L-cysteine and Tween 80. After cultivation, the sensitivity manifested itself with inhibition zone, which diameter was measured in whole millimetres. The strains that formed an inhibition zone of 10 mm or more around the antibiotic disk were considered sensitive. Strains forming zones of 6-10 mm, were considered moderately sensitive and strains forming zones of 6 mm were considered resistant. Bifidobacteria strains tested were generally resistant to norfloxacin. Only 2 of 61 strains showed sensitivity to this antibiotic and formed the average zones of inhibition of 13.33 mm and 18.33 mm. On the contrary, 58 of the 62 clostridia strains tested were sensitive to norfloxacin, 4 strains were moderately sensitive and no strain was resistant.

Further, the minimum inhibitory concentration (MIC) of norfloxacin and norfloxacin mixed with mupirocin (100 mg/l) has been determined. The growth of 12 bifidobacteria strains wasn't limited even at norfloxacin concentration of 300 mg/l. The growth of 20 clostridia strains was inhibited at different concentrations of norfloxacin: 6 strains at 10 mg/l, 2 strains at 30 mg/l, 3 strains at 50 mg/l, 1 strain at 80 mg/l, 2 strains at 150 mg/l, 4 strains at 200 mg/l and growth of two strains was not limited even at a concentration of 300 mg/l. Mixture with mupirocin (100 mg/l) affected the concentration of norfloxacin inhibiting bacterial growth of 1 of 32 strains from 30 mg/l to 10 mg/l of norfloxacin.

The results show that norfloxacin is a suitable selective agent that inhibits the growth of clostridia and simultaneously does not limit the development of bifidobacteria. Thus it can

be tested as a supplement into the culture media for bifidobacteria at concentration of 200 mg/l.

Keywords: bifidobacteria, clostridia, norfloxacin, mupirocin, disk-diffusion method, minimum inhibitory concentration

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Literární rešerše.....	9
2.1 Charakteristika rodu <i>Bifidobacterium</i>	9
2.1.1 Výskyt.....	11
2.1.2 Požadavky na živiny.....	13
2.1.3 Metabolismus.....	13
2.1.4 Citlivost k antibiotikům.....	14
2.2 Probiotika a prebiotika.....	15
2.2.1 Probiotika.....	15
2.2.2 Prebiotika.....	17
2.2.3 Terapeutické účinky probiotik.....	19
2.2.3.1 Hypocholesterolemický účinek.....	19
2.2.3.2 Antimikrobiální aktivita.....	20
2.2.3.3 Vliv na laktózovou intoleranci.....	20
2.2.3.4 Antikancerogenní účinek.....	21
2.3 Charakteristika rodu <i>Clostridium</i>	22
2.4 Selektivní média pro izolaci rodu <i>Bifidobacterium</i>	24
2.4.1 Selektivní média bez antibiotik.....	25
2.4.1 Selektivní média s antibiotiky.....	26
2.5 Norfloxacin a mupirocin.....	27
2.5.1 Mupirocin.....	27

2.5.2 Norfloxacin.....	28
3. Vědecká hypotéza a cíl práce.....	29
3.1 Vědecká hypotéza.....	29
3.2 Cíl práce.....	29
4. Materiál a metody.....	30
4.1 Testování citlivosti bakterií k antibiotikům norfloxacin a mupirocin.....	35
4.1.1 Diskový difúzní test.....	35
4.1.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).....	36
5. Výsledky.....	38
5.1 Citlivost bifidobakterií na norfloxacin.....	38
5.2 Citlivost klostridií na norfloxacin a mupirocin.....	40
5.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).....	42
6. Diskuse.....	44
7. Závěr.....	48
8. Seznam literatury.....	49

1. Úvod

V moderní době je velkým trendem zdravý životní styl, k němuž neodmyslitelně patří pravidelný pohyb a především vyvážená strava. Stejně tak jsou předmětem zájmu prebiotické a probiotické preparáty, které napomáhají tělu především modulací střevní mikroflóry. Jednou z hlavních složek probiotických preparátů jsou i bifidobakterie, které se staly také předmětem mnoha mezinárodních výzkumů a to hned z několika důvodů.

Probiotika vytvářejí optimální složení střevní mikroflóry, optimální pH, mají příznivý vliv na laktózovou intoleranci, působí jako prevence před vznikem alergií, napomáhají předcházet zažívacím problémům a střevním infekcím. Působí antikancerogenně, mají hypocholesterolický účinek a pozitivně stimulují imunitní systém. Hrají také důležitou roli při výrobě fermentovaných a funkčních potravin a v neposlední řadě jsou ceněny pro schopnost produkovat antimikrobiální látky.

Bifidobakterie jsou striktně anaerobní grampozitivní nepravidelné tyčinky, které netvoří spory a jsou nepohyblivé. Jsou sacharolytické, štěpí sacharidy na kyselinu octovou a kyselinu mléčnou. Popsány byly poprvé v roce 1990 a od té doby jim byl přisouzen velký význam. Jsou součástí přirozené mikroflóry jak lidí, tak zvířat.

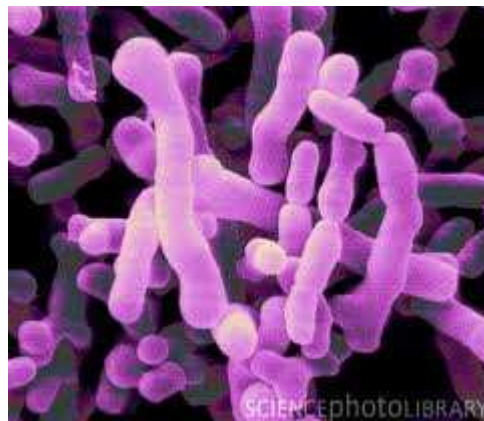
Jak již bylo zmíněno, využití bifidobakterií má nespočet možností: Od probiotických preparátů, jogurtů, fermentovaných výrobků, funkčních potravin až po mezinárodní výzkumy zabývající se vlivem těchto bakterií na nádorová onemocnění, antimikrobiální látky apod. Pro získávání čistých kultur bifidobakterií se v laboratořích používají selektivní média, která již nemusejí být zcela spolehlivá. V potravinářském průmyslu je podstatné, aby byly výrobky zdravotně nezávadné, a proto je kladen vysoký nárok na kvalitu a čistotu získaných kultur. Z tohoto důvodu je podstatné najít spolehlivé selektivní médium.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Charakteristika rodu *Bifidobacterium*

Bifidobakterie byly poprvé popsány v roce 1990 francouzským pediatrem Henry Tissierem a pojmenovány jako *Bacillus bifidus*. Izolovány byly ze stolice kojenců a můžeme říci, že jsou dnes nejpoužívanějšími probiotickými bakteriemi. Na základě jejich morfologických, kultivačních a biochemických charakteristik byl vytvořen samostatný rod *Bifidobacterium*, dle návrhu dánského mikrobiologa Orla-Jensena (1924) (Mitsuoka, 1990). Podle Garrity et al. (2004) náleží rod *Bifidobacterium* do kmene *Actinobacteria*, třída *Actinobacteria*, podtřída *Actinobacteriia*, řád *Bifidobacteriales*, čeleď *Bifidobacteriaceae*. Další rody patřící do této čeledi jsou: *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardarella*, *Parascardovia* a *Scardovia*. Dnes rod *Bifidobacterium* zahrnuje více než 35 druhů viz. tabulka č. 1.

Obr. č. 1. *Bifidobacterium adolescentis*



zdroj: <http://sciensephoto.com>

Bifidobakterie jsou grampozitivní pleomorfní rozvětvené tyčinky, které se mohou vyskytovat jednotlivě, v řetězcích nebo ve shlucích. Jejich tvar může být relativně pravidelný nebo až rozvětvený do písmen Y a V (Leahy et al., 2005). Bifidobakterie jsou striktně

anaerobní, některé druhy ovšem mohou tolerovat přítomnost kyslíku, a to za přítomnosti CO₂ (Simpson et al., 2004a). Jedná se o organotrofní organismy, které mají fermentativní typ metabolismu. V průběhu fermentace nedochází ke tvorbě plynu. Nemají enzym katalázu, až na výjimky: *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides* mají aktivní katalázu pokud jsou kultivovány za přítomnosti kyslíku (Biavati et Mattarelli, 2001). Aktivita dalšího enzymu ureázy byla testována na 414 kmenech reprezentujících 21 druhů rodu *Bifidobacterium*. Bylo prokázáno, že kmeny s nejsilnější aktivitou tohoto enzymu patří většinou do druhu *B. longum* ssp. *suis*, ve kterém byla pozitivní reakce u 80 % testovaných kmenů. Enzym ureáza byl nalezen u všech druhů s výjimkou *B. cuniculi*. Ureáza zřejmě není adaptivním enzymem: močovina ani organický dusík neindukují její syntézu. U *B. breve* a *B. longum* ssp. *longum* (lidské druhy) má tento enzym méně než 10 % kmenů. *B. bifidum* má ureázu aktivní jen slabě (Crociani et Matteuzi, 1982).

Teplotní optimum pro růst bifidobakterií se pohybuje v rozmezí 37 až 41 °C. Optimální hodnota pH pro počáteční růst je 6,5-7,0 naopak při pH pod 4,5-5,0 nebo zásadité nad pH 8,0-8,5 je pro růst bifidobakterií nevyhovující (Scardovi, 1984).

Buněčná stěna je tvořena peptinoglykanovou vrstvou obohacenou o polysacharidy, proteiny a kyselinu teichoovou (Gomes et Malcata, 1999). Aminokyselinové složení základního tetrapeptidu se může lišit mezi jednotlivými druhy i mezi kmeny stejného druhu, proto se analýza peptidoglykanu používá pro identifikaci (Lauer et Kandler, 1983). Nejrozsáhlejší studie o stavbě buněčné stěny a mureinové struktury byla sepsána O. Kandlerem a jeho spolupracovníky (Scardovi, 1984). Na základě mureinové struktury bylo prokázáno, že jsou bifidobakterie blíže příbuzné čeledi *Lactobacillaceae* nežli čeledi *Actinomycetaceae* (Kandler et Lauer, 1974).

Již přes 20 let jsou bifidobakterie předmětem intenzivního mezinárodního výzkumu díky svým významným probiotickým vlastnostem, a zejména pro schopnost produkovat různé antimikrobiální látky (Yildirin et Johnson, 1998).

2.1.1 Výskyt

Bifidobakterie obývají především trávicí trakt lidí a zvířat, kde koexistují s širokou škálou různých anaerobních mikroorganismů (Vaughan et al., 2000). Složení této mikroflóry se liší v různých oblastech traktu. Studie o výskytu bifidobakterií ve stolici dětí (Biavati et al., 1984) a dospělých (Biavati et al., 1986), v pochvě (Crociani et al., 1973) a zubním kazu (Crociani et al., 1996) poukazují na rozdíly v adaptaci druhů bifidobakterií lidského původu na různá stanoviště. *B. breve* a *B. longum* ssp. *infantis* jsou typické pro kojence, proto mohou být přidávány do kojenecké výživy, zatímco *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* ssp. *longum*, *B. pseudocatenulatum* jsou přítomny ve stolici jak novorozenců, tak dospělých lidí. *B. adolescentis* byl izolován u dospělého člověka. V pochvě byly popsány druhy *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* ssp. *longum*. V zubním kazu se vyskytují *B. denticolens*, *B. dentium* a *B. inopinatum*. U zvířat jsou některé druhy bifidobakterií specifické podle hostitele: *B. magnum* a *B. cuniculi* byly nalezeny ve vzorku králíčích výkalů, *B. pullorum* a *B. gallinarum* pouze ve střevě kuřete a *B. longum* ssp. *suis* pouze ve výkalech selat. Dvanáct druhů bifidobakterií bylo izolováno z odpadních vod a mezi nimi i *B. minimum* a *B. subtile*, které zatím nebyly nalezeny v žádném jiném prostředí. Airag známější jako kumys, lehce alkoholický nápoj z fermentovaného kobyliho mléka původem z Mongolska, je místem výskytu *B. mongoliense* (Watanabe et al. 2009). Do mléčných výrobků se nejčastěji přidává *B. animalis* ssp. *lactis*. *B. thermacidophilum* ssp. *thermacidophilum* byl izolován z anaerobního fermentoru (Biavati et al., 2000). Killer et al. (2009b) byl první, kdo izoloval bifidobakterie ze zažívacího traktu čmeláka. Tato studie předpokládá, že bifidobakterie tvoří významnou část střevní mikroflóry tohoto hmyzu. Navíc, protože byly všechny druhy izolované v této studii odlišné od druhů rodu *Bifidobacterium* již dříve izolovaných z trávicího traktu včel (*B. asteroides*, *B. coryneforme*, a *B. indicum*), byl předložen návrh, aby patřily do nového samostatného druhu v rámci čeledi *Bifidobacteriaceae* (Killer et al., 2009b). Celkově byly ze zažívacího traktu čmeláků izolovány 4 skupiny bifidobakterií. První z nich byla navržena jako samostatný druh *Bifidobacterium bombi* sp. nov., (Killer et al. 2009b). Dalšími byly *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov., *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov. (Killer et al., 2010a) a *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov. (Killer et al. 2010b). Přehled platných názvů bifidobakterií a místo výskytu v tabulce č. 1.

Tab. č. 1. Stanoviště a přehled druhů rodu *Bifidobacterium* (Russel et al. 2011)

Druh	Izolováno z	Odkaz
<i>B. actinocoloniiforme</i>	střeva čmeláka	Killer et al. (2010a)
<i>B. adolescentis</i>	stolice dospělého člověka, bachor skotu, odpadní voda a vagina	Reuter (1963)
<i>B. angulatum</i>	odpadní voda, stolice dospělého člověka	Scardovi a Crociani (1974)
<i>B. animalis</i>		
<i>subsp. animalis</i>	zvířecí výkaly	Scardovi a Trovatelli (1974)
<i>subsp. lactis</i>	jogurt	Meile et al. (1997)
<i>B. asteroides</i>	střeva včely	Scardovi a Trovatelli (1969)
<i>B. bifidum</i>	stolice dospělého člověka a dítěte, výkaly telete a vagina	Orla-Jeans (1924)
<i>B. bohemicum</i>	střeva čmeláka	Killer et al. (2010a)
<i>B. boum</i>	bachor skotu, výkaly selete	Scardovi et al. (1979)
<i>B. bombi</i>	střeva čmeláka	Killer et al. (2009b)
<i>B. breve</i>	stolice dítěte, výkaly telete, vagina a odpadní voda	Reuter (1963)
<i>B. catenulatum</i>	stolice dospělého člověka a dítěte, odpadní voda	Scardovi a Crociani (1974)
<i>B. choerinum</i>	výkaly selete, odpadní voda	Scardovi et al. (1979)
<i>B. coryneforme</i>	střeva včely	Biavati et al. (1982)
<i>B. crudilactis</i>	syrové mléko a sýry	Delcenserie et al. (2007)
<i>B. cuniculi</i>	výkaly králíka	Scardovi et al. (1979)
<i>B. dentium</i>	zubní kaz, dutina ústní, stolice dospělého člověka, slepé střevo	Scardovi a Crociani (1974)
<i>B. gallicum</i>	lidská stolice	Lauer (1990)
<i>B. gallinarum</i>	slepé střevo kuřete	Watabe et al. (1983)
<i>B. indicum</i>	střeva včely	Scardovi a Trovatelli (1969)
<i>B. longum</i>		
<i>subsp. longum</i>	stolice dospělého člověka	Reuter (1963)
<i>subsp. infantis</i>	stolice dítěte	Reuter (1963)
<i>subsp. suis</i>	výkaly selete	Matteuzzi et al. (1971)
<i>B. magnum</i>	výkaly králíka	Scardovi a Zani (1974)
<i>B. merycicum</i>	bachor skotu	Biavati a Mattarelli (1991)
<i>B. minimum</i>	odpadní voda	Biavati et al. (1982)
<i>B. mongoliense</i>	fermentovaný mléčný produkt z kobyliho mléka, Mongolsko	Watanabe et al. (2009)
<i>B. pseudocatenulatum</i>	trávicí trakt člověka	Scardovi et al. (1979)
<i>B. pseudolongum</i>		Yaeshima a Fujisawa (1992)
<i>subsp. pseudolongum</i>	stolice dítěte, výkaly telete, odpadní voda	Ex Mitsuoka (1969)
<i>subsp. globosum</i>	výkaly prasete, kuřete, býka, telete, krysy a morčete	Ex Biavati et al. (1982)
<i>B. psychroaerophilum</i>	výkaly telete, králíka, jehněte, odpadní voda, bachor skotu	Simpson et al. (2004)
<i>B. pollorum</i>	výkaly prasete	Trovatelli et al. (1974)
<i>B. ruminantium</i>	výkaly kuřete	Biavati a Mattarelli (1991)
<i>B. saeculare</i>	bachor skotu	Biavati et al. (1991)
<i>B. scardovii</i>	výkaly králíka	Hoyles et al. (2002)
<i>B. stercoris</i>	lidská krev	Kim et al. (2010)
<i>B. subtile</i>	lidská stolice	Biavati et al. (1982)
<i>B. thermacidophilum</i>	odpadní voda	Dong et al. (2000)
<i>subsp. porcinum</i>	výkaly selete	Zhu et al. (2003)
<i>thermacidophilum</i>	odpadní voda z anaerobního fermentoru	
<i>B. thermophilum</i>	stolice dítěte	Mitsuoka (1969)
<i>B. tsurumiense</i>	zubní plak křečka	Okamoto et al. (2008)

2.1.2 Požadavky na živiny

Bifidobakterie jsou sacharolytické organismy, které fermentují zejména jednoduché cukry a oligosacharidy. Jejich růst, stimulovaný mateřským mlékem, se stal objektem mnoha nutričních studií, které jsou koncipované buď k osvětlení charakteru "bifidogenního faktoru" v mateřském mléce, nebo k nalezení jeho náhrady. Jako zdroj dusíku využívají bifidobakterie hlavně jeho organickou formu: aminokyseliny a peptidy. Bylo ovšem prokázáno, že jsou schopné využít jako jediný zdroj dusíku amonnou sůl. To platí pro většinu zástupců rodu *Bifidobacterium*, ovšem druhy *B. longum* ssp. *suis*, *B. magnum*, *B. choerinum* a *B. cuniculi* se bez organického dusíku nemnoží. Druhy, které využívají anorganického dusíku, vylučují do média značné množství aminokyselin. V největším množství jsou z aminokyselin produkovány alanin, valin a kyselina asparagová. Druh *B. thermophilum* vykazuje zvýšenou produkci izoleucinu a valinu (Scardovi, 1984).

2.1.3 Metabolismus

Bifidobakterie jsou sacharolytické organismy. Jejich metabolismus sacharidů se od homofermentativních a heterofermentativních bakterií mléčného kvašení liší především díky enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza, který je odpovědný za degradaci glukózy. Enzym fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza je pro bifidobakterie typickým, proto se jeho stanovení stalo rozhodujícím testem pro identifikaci rodu *Bifidobacterium* (Scardovi, 1984).

Dalším důvodem, proč bifidobakterie metabolizují sacharidy odlišným způsobem než bakterie mléčného kvašení je, že postrádají enzymy glukózo-6-fosfát dehydrogenázu a aldolázu. Téměř všechny kmeny jsou schopné metabolizovat sacharidy glukózu, galaktózu, fruktózu, sacharózu a laktózu (Crociani et al. 1996). Výslednými produkty kvašení sacharidů jsou kyselina octová a kyselina mléčná v poměru 3:2 (Scardovi, 1984).

Na kmenech *B. longum* ssp. *infantis* bylo prokázáno, že vylučování polysacharidů umožňuje přilnavost (adhezy) na buňky střevního epitelu. Díky tomu, že přilnou na stěnu střeva a jsou metabolicky aktivní, napomáhají bifidobakterie zachovat mikrobiální rovnováhu nezbytnou pro udržení dobrého zdravotního stavu hostitele. Bifidobakterie jsou schopné syntetizovat aminokyseliny (k. asparagovou a k. glutamovou), riboflavin a thiamin. Některé kmeny mohou produkovat i vitamin B₂, B₆ a biotin (Zinedine et Faid, 2007).

2.1.4 Citlivost k antibiotikům

Bifidobakterie jsou citlivé na cefalosporiny, bacitracin, erythromycin, penicilin, ampicilin, novobiocin, klindamycin, dicloxacilin a rifampicin (v rozmezí 0,01 až 4 mg/l). Rezistentní jsou na aztreonam, cycloserin, kanamycin, polymyxin B a na spectinomycin (D'aimmo et al., 2007).

Dle Kheadr et al. (2007) jsou bifidobakterie také velmi citlivé na nisin, méně citlivé na cloxacilin, chloramphenicol a tetracyklin. Odolné jsou vůči aminoglykosidům a vankomycinu.

Charteris et al. (1998) testovali citlivost ke 44 různým antibiotikům na 16 kmenech rodu *Bifidobacterium* z lidského zažívacího traktu. Pro kultivaci byl použit TPY agar. Izoláty byly rezistentní na cefoxitin (30 µg), aztreonam (30 µg), vancomycin (30 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (10 µg), kyselinu fusidovou (10 µg), trimethoprim (5 µg), norfloxacin (10 µg), kyselinu nalidixovou (30 µg), metrodinazole (5 µg), polymyxin B (300 µg) a na colistin sulfát (10 µg). Citlivé byly na cephalothin (30 µg), cefuroxime (30 µg), cefaclor (30 µg), ceftizoxime (30 µg), bacitracin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin, (15 µg), clindamycin (2 µg), rifampicin (5 µg) a na nitrofurantion (300 µg). Jejich citlivost byla odlišná na antibiotika cepharidine (30 µg), cephalozin (30 µg), cefoperazone, (75 µg), ceftriaxone (30 µg), ofloxacin (5 µg) a na furazolidone (15 µg). Rezistentní nebo mírně citlivé byly na ceftazidime (30 µg), netilmicin (10 µg), sulphamethoxazole (100 µg), cotrimoxazole (25 µg) a ciprofloxacin (5 µg). Citlivé nebo mírně citlivé pak byly na tetracycline (30 µg). Všechny izoláty *B. bifidum* byly citlivé na cefixime (5 µg).

2.2 Probiotika a prebiotika

S užíváním probiotik a prebiotik jsou spojeny zdraví prospěšné účinky, které byly potvrzeny mnoha studiemi, zabývajícími se lidskou výživou. Jsou hojně využívány k přípravě potravinových doplňků, které se staly populární hlavně Evropě a v Japonsku. Příznivě působí na zažívání a na střevní mikroflóru. Mezi přínosy můžeme zařadit i prevenci proti průjmům nebo posílení imunitního systému (Robertfroid, 2000).

2.2.1 Probiotika

Probiotika jsou mono- nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které po aplikaci prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikroflóry (FAO/WHO, 2001). Doposud nejlépe prostudované probiotické organismy jsou *Bifidobacterium* sp. a bakterie mléčného kvašení, zejména *Lactobacillus* sp. Další organismy, které se běžně používají jako probiotika u lidí jsou *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Bacillus* sp., *Propionibacterium* sp. a některé houby (Rolfe, 2000). Více viz. tabulka č. 2. Zejména bifidobakterie jsou celosvětově používané jako probiotika v mnoha potravinářských výrobcích, jako jsou jogurty, fermentované mléko, dětská výživa, sýry a doplňky stravy (Russel et al., 2011). Probiotika byla testována a shledána účinnými při prevenci a léčbě širokého spektra onemocnění trávicího traktu jako je: průjem spojený s užíváním antibiotik (způsobený přemnožením *Clostridium difficile*), infekční bakteriální a virový průjem (včetně průjmů vyvolaných rotaviry, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., enterogenní *E. coli*, *Vibrio cholerae* a *Helicobacter pylori*), zánětlivé střevní onemocnění, syndrom dráždivého střeva, přemnožení bakterií v tenkém střevu, laktózová intolerance atd. Bylo zjištěno, že inhibují enzymy bakterií, které se zapojují do syntézy karcinogenů v tlustém střevě. Existuje mnoho mechanismů, kterými probiotika příznivě ovlivňují zdraví hostitele: stimulují imunitu, konkurují v boji o omezené množství živin, obsazují epitel střeva, čímž zabraňují adhezi patogenních mikroorganismů, produkují nejrůznější antimikrobiální látky atd. (Rolfe, 2000).

Nicméně probiotika mohou mít některé vedlejší účinky jako je: výskyt bakteriémie nebo endokarditidy, produkce toxických metabolitů, nebo přenos rezistence vůči antibiotikům na gastrointestinální mikroflóru. I když jsou případy bakteriémie nebo fungémie

velmi vzácné, použití probiotik by mělo být v klinických studiích doprovázeno bezpečnostními radami a poznatky týkajícími se citlivosti na antimikrobiální látky (Snydman, 2008).

U vnímavějších jedinců by mohla být nežádoucí nadměrná stimulace imunitního systému a přenos genů. Zdokumentovaných souvislostí mezi infekcí a užíváním probiotik je jen několik a objevily se pouze u pacientů se základním onemocněním. U rodu *Bifidobacterium* žádné případy nákazy reportované nebyly (FAO/WHO, 2002).

Tabulka č. 2. Nejčastěji používaná probiotika (Nevoral, 2005)

Lactobacily	Grampozitivní koky
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis ssp. cremonis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>L. brevis</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. cellobiosu</i>	Bifidobakterie
<i>L. curvatu</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. animalis ssp. lactis</i>
Kvasinkovité mikroorganizmy	<i>B. longum ssp. infantis</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>B. longum ssp. longum</i>
	<i>B. thermophilum</i>
	<i>B. breve</i>

2.2.2 Prebiotika

Prebiotika jsou definována jako nestravitelná složka potravy, která příznivě ovlivňuje růst a/nebo aktivitu pozitivně působících bakterií v tlustém střevě, čímž zlepšuje zdravotní stav svého hostitele (Gibson et Roberfroid, 1995). Selektivně stimulují růst komensálních probiotických kultur, a to díky fermentativnímu metabolismu těchto bakterií. Stávají se hlavním zdrojem uhlíku a energie především pro bifidobakterie (Gibson et al., 1995). Lze je rozdělit podle chemického složení na fruktooligosacharidy, inulin, laktulózu, galaktooligosacharidy, oligosacharidy rafinózové řady, izomaltooligosacharidy a xylooligosacharidy (Collins et Gibbon, 1999).

Laktulóza: Je to syntetický disacharid ve formě Gal beta 1-4 Fru. Laktulóza je využívána jako laxativum, není hydrolyzována ani absorbována v tenkém střevě.

Inulin a fruktooligosacharidy (FOS): Inulin je polysacharid, který je složený z jednotek fruktózy (>20) navzájem spojených β (1,2) glykosidickou vazbou a zakončený molekulou glukózy. Fruktooligosacharidy jsou stejně jako inulin polymery D-fruktózy, zakončené glukózou, ale mají menší molekulovou hmotnost. Počet jednotek fruktózy je obvykle do 10. Průmyslově se vyrábějí buď syntézou sacharózy pomocí enzymu transfruktosylázy, nebo hydrolýzou inulinu extrahovaného z čekanky. Takto vytvořené fruktooligosacharidy jsou dvojího typu: GF_n a Fn, v závislosti na tom, jestli je v řetězci přítomná glukóza nebo jen fruktóza. Bifidobakteriemi jsou lépe využívány FOS s nižším stupněm polymerace (2-7). V řadě zemí jsou přidávány do potravin, jako jsou sušenky, nápoje, jogurty, cereálie, pomazánky a sladidla.

Galaktooligosacharidy (GOS): Galaktooligosacharidy jsou oligosacharidy, obsahující galaktózu ve formě Glu α 1-4(beta Gal 1-6)_n, kde n=2-5. Vznikají z laktózového sirupu pomocí trans-galaktosylázové aktivity enzymu beta-galaktosidázy.

Oligosacharidy ze sóji: V podstatě se také jedná o galaktooligosacharidy. Hlavními oligosacharidy, které pocházejí ze sóji, jsou rafinóza (n=1), stachyóza (n=2) a verbaskóza (n=3).

Laktosacharóza: Laktosacharóza vzniká jako směs laktózy a sacharózy pomocí enzymu beta-fruktofuranosidázy, a je bifidogenní.

Isomaltooligosacharidy: Isomaltooligosacharidy (IMO) jsou tvořeny monomery glukózy, spojenými alfa 1-6 glykosidickými můstky.

Zdrojem oligosacharidů jsou potraviny, jako zelenina, ovoce, cereálie a luštěniny. Inulin je zásobní látkou oddenkových rostlin jako jsou čekanka, slunečnice a jiřiny (Bláha et Vášek, 2011).

Střevní mikroflóra se stabilizuje již krátce po narození. Šíření bifidobakterií do dolní části gastrointestinálního traktu je stimulováno glykoproteinovými komponenty κ -kaseinu z mléka a oligosacharidy z mateřského mléka. S přibývajícím věkem se mění počet i druhy bifidobakterií obývajících trávicí trakt: *B. longum* ssp. *infantis*, *B. bifidum* a *B. breve* jsou nahrazeny spíše *B. adolescentis*, zatímco *B. longum* ssp. *longum* přetrvává po celý život. Tato změna profilu může být spojena s příjmem bifidogenních (prebiotických) faktorů (Modler, 1993). Potrava většiny lidí a zvířat obsahuje nedostatek látek podporujících výživu probiotických kultur, proto jsou v dnešní době k dispozici komerční doplňky s již výše zmíněnými polysacharidy a oligosacharidy, které jsou bifidobakteriemi, a některými bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou, snadno metabolizovány. Jejich rozkladem vznikají organické kyseliny, čímž snižují střevní pH (Modler, 1993).

Komerční prebiotika by měla po vzoru mateřského mléka selektivně podporovat růst probiotických kultur. Z výsledků výzkumu ovšem vyplývá, že většina dostupných a běžně používaných prebiotických preparátů může podporovat, jak růst pozitivních komensálních bakterií, jako jsou bifidobakterie a laktobacily, tak i ostatních bakterií přítomných v trávicím traktu, jako jsou klostridie (Rada et al., 2008).

2.2.3 Terapeutické účinky probiotik

V posledních desetiletích je stále větší poptávka po funkčních potravinách. Termín funkční potraviny se používá pro potraviny s obsahem živin, které mají vliv na fyziologické procesy, které se liší od své ustálené funkce ve výživě, a mají příznivý vliv na zdravotní stav konzumenta. Probiotika a prebiotika představují funkční potraviny, které se používají již po staletí (Duggan et al., 2002).

Probiotika a prebiotika se projevují hned několika účinky, které se podílejí na zlepšení zdravotního stavu. Patří mezi ně například snížení rizika rotavirových průjmů a vzniku rakoviny tlustého střeva, zmírnění laktóзовé intolerance, zlepšení imunity, potlačení průjmů, snížení rizika osteoporózy a kardiovaskulárního onemocnění (Robertfroid, 2000).

2.2.3.1 Hypocholesterolemický účinek

Hypercholesterolemie je nejvýznamnější rizikový faktor pro vznik kardiovaskulárních onemocnění. Na řízení hladiny cholesterolu v krvi mají zásadní vliv především stravovací návyky společně s dalšími faktory životního stylu. Vliv živých mikroorganismů v potravinách, zejména bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení, na lidské zdraví, byl znám již v době před naším letopočtem. Mann a Spoerry byli prvními vědci, kteří prokázali hypocholesterolemický efekt fermentovaného mléka. Jednalo se o původní kysané mléko kmene Masajů (Ataie-Jafari et al., 2009).

Andrade a Borges (2009) provedli studii, ve které hodnotily vliv kysaného mléka, obsahujícího *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, na sérové lipidy, ve vzorcích krve dospělých žen. U všech testovaných žen, ve věkovém rozmezí od 18 do 65 let, bylo prokázáno snížení LDL i HDL cholesterolu po konzumaci mléka prokysaného uvedenými bakteriemi.

2.2.3.2 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita je důsledkem produkce bakteriocinů a látek jim podobným, což jsou látky bílkovinné povahy vylučované mikroorganismy. Bylo zjištěno, že mají silnou antimikrobiální aktivitu vůči blízké příbuzným mikroorganismům. Antimikrobiální aktivita těchto látek je rodově specifická. Jsou velmi užitečné v oblasti konzervace potravin, péče o zdraví nebo ve farmaceutickém průmyslu. Díky produkci antimikrobiálních proteinů mohou bifidobakterie dominovat ve střevní mikroflóře a docílit tak své probiotické funkce. Antimikrobiální aktivita je také důsledkem produkce organických kyselin a konkurencí o živiny a místo (Pagori et al., 2008).

2.2.3.3 Vliv na laktózovou intoleranci

Špatné trávení laktózy a laktózová intolerance byla poprvé popsána na začátku roku 1960. V roce 1962 byla poprvé zjištěna souvislost mezi snížením hladiny enzymu laktázy a příznaky připomínajícími syndrom dráždivého střeva (Szilagyi, 2002).

Laktózová intolerance je způsobena nedostatečnou koncentrací enzymu β -galaktosidázy, ve sliznici tenkého střeva. To způsobuje nedostatečné trávení disacharidu laktózy. Špatné trávení laktózy je provázeno zvýšenou koncentrací glukózy v krvi nebo vodíku při výdechu. Většina lidí s poruchou trávení laktózy může požit laktózu bez nepříznivých příznaků jen v omezeném množství. Přesné mechanismy, kterými nestrávená nebo neabsorbovaná laktóza způsobuje příznaky intolerance, nejsou doposud plně objasněny. Je všeobecně známo, že kysané mléčné výrobky, jako je jogurt, mohou zlepšit trávení laktózy a proto jsou většinou dobře snášeny i osobami trpícími laktózovou intolerancí. Jsou proto dva důvody. Laktóza je strávená mikrobiálními enzymy již v průběhu kysání, nebo mikrobiální enzymy působí na laktózu v tenkém střevu po průchodu žaludkem (de Vrese et al., 2001).

2.2.3.4 Antikancerogenní účinek

Rakovina tlustého střeva je jednou z hlavních příčin úmrtí, v rozvinutých zemích. Například v USA, podle odhadů z roku 1996, podlehllo rakovině tlustého střeva 50 000 ze 133 500 nemocných. Za nejdůležitější faktory pro snížení počtu onemocnění a úmrtí je primární prevence, včasná detekce a léčba. Experimentální studie prokázaly, že vysoký příjem tuků v potravě a nedostatečný příjem vlákniny, zvyšují riziko vzniku rakoviny tlustého střeva (Singh et al., 1997).

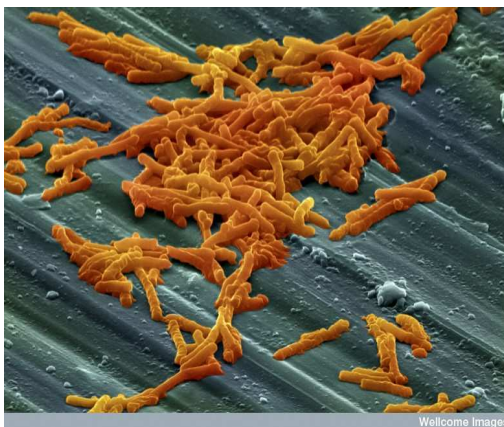
Bylo dokázáno, že střevní mikroorganismy jsou schopné ovlivnit onemocnění a poruchy zažívacího traktu, dokonce i rakovinu tlustého střeva. Přesné mechanismy, které mají za následek antikancerogenní účinek, nejsou zcela objasněné. Příčinou by mohla být modifikace střevního pH, produkce krátkých řetězců mastných kyselin (acetát, propionát, butyrát), antagonismus vůči patogenním mikroorganismům skrze produkci antimikrobiálních a antibakteriálních látek (např. bakteriociny, cytokiny a butyrát), stimulace inuomodulačních buněk, konkurence patogenním organismů o dostupné živiny, receptorové a růstové vlastnosti nebo potlačení bakterií, které z prokancerogenních látek produkují kancerogeny. Prebiotika mohou uplatnit své ochranné vlivy skrze modulaci procesu kvašení, případně zvýšení produkce krátkých řetězců mastných kyselin, změnu střevní mikroflóry na výhodnější složení, nebo změnu důsledků biologických procesů spojených se vznikem rakoviny, jako je apoptóza (programovaná buněčná smrt) a buněčná poliferace (hojné množení, bujení buněk) (Le Leu et al., 2010).

Jedna ze studií zabývající se problematikou rakoviny navrhuje, aby byl *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* používán, jako stabilní vektor pro přepravu proti nádorových genů, v kombinaci s nízkými dávkami chemoterapeutických léčiv (dle studie nemají na *B. longum* ssp. *longum* biologický efekt). Do *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* byl vpraven gen, který způsobil, že bakterie začaly produkovat endostatiny, které brání rozvoji cév vyživujících nádory. Test provedený na myši prokázal selektivní umístění bakterie v nádoru a protinádorový efekt na osteosarkom, primární kostní nádor (Hu et al., 2009).

2.3 Charakteristika rodu *Clostridium*

Klostridie jsou striktně anaerobní grampozitivní tyčinky. Většina druhů tvoří endospory oválného nebo kulovitého tvaru. Ačkoliv jsou obligátně anaerobní může se jejich tolerance vůči vzdušnému kyslíku velmi lišit: některé druhy za přítomnosti vzduchu porostou, ale nevytvoří spory. Jsou chemoorganotrofní, chemoautotrofní nebo chemolitotrofní. Hlavním metabolickým produktem je kyselina máselná, dále produkují směsi organických kyselin a alkoholů ze sacharidů nebo z peptonů (Rainey et al, 2009). Na 4 testovaných kmenech, kvasících glukózu, bylo prokázáno, že klostridie mohou snížit průměrnou hodnotu pH ve střevu ze 7,2 na hodnotu mezi 4,6 až 5,0, a jako primární rozpustné metabolity produkují butyrát (0,37-0,67 mmol/mmol glukózy) a acetát (0,34-0,42 mmol/mmol glukózy). V průběhu degradace glukózy a produkce kyselin vzniklo také značné množství vodíku (Lin et al., 2007). Některé druhy jsou schopné fixovat vzdušný dusík. Pro většinu druhů platí, že optimální podmínky pro množení jsou při pH 6,5-7,0 a při teplotě v rozmezí 30 až 37 °C. Nemají enzym katalázu, ale u některých kmenů může být detekováno minimální množství tohoto enzymu (Rainey et al, 2009).

Obr. č. 2 *Clostridium difficile*



zdroj: <http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/page/Prices.html>

Klostridie jsou bakterie přirozeně se vyskytující v trávicím traktu člověka i zvířat. Některé druhy jsou však pro člověka patogenní. Například *Clostridium perfringens* je bakterie běžně se vyskytující v půdě, sedimentech a trávicím ústrojí člověka. Tento druh je

zodpovědný za široké spektrum chorob včetně otravy jídlem, plynaté sněti (clostridial myonecrosis), nekrotizující enteritidy (enteritis necroticans) a infekce trávicího traktu (Myers et al., 2006). Původcem botulismu je bakterie *Clostridium botulinum*, která produkuje velmi silný neurotoxin. Poprvé byla izolována již v roce 1897 ze syrové solené šunky v Belgii. Bylo prokázáno, že různé kmeny mohou produkovat toxiny, které se od sebe liší antigeny, proto bylo rozlišeno 7 základních typů těchto toxinů (A-G). *Clostridium botulinum* se hojně vyskytuje v životním prostředí, proto bylo vypuknutí botulismu způsobeno již mnoha druhy tepelně neopracovaných potravin. Pravidla hygieny a kontroly potravin, které mají minimalizovat riziko alimentárního botulismu, byly popsány velmi jasně, přesto má mnoho případů onemocnění příčinu v nedbalém provedení těchto kontrol nebo v jejich úplné ignoraci (Lund et Peck, 2001). Jedním z celosvětově nejrozšířenějších a nejdramatičtějších onemocnění je tetanus, který je známý již přes 24 století. Původcem nemoci je bakterie *Clostridium tetani*, která se přirozeně vyskytuje v půdách, prachu a zažívacím traktu různých živočichů. Projev této choroby, spastická obrna, je způsobena druhou nejtoxičtější známou látkou „tetanus“ toxinem. Smrtelná dávka tohoto toxinu pro člověka je asi 1ng/kg. Toto onemocnění je regulované díky očkování, nicméně, podle Světové zdravotnické organizace dochází odhadem každý rok ke 400 000 případů, a to především z novorozeneckého tetanu (Brüggemann et al., 2003). Léčba infekce způsobená bakterií *Clostridium sordellii* představuje pro lékaře těžký úkol, který obvykle končí úmrtím. Nejčastěji se tyto infekce vyskytují po úrazu, porodu a běžných gynekologických procedurách, ale v poslední době jsou spojovány především s uměle přerušným těhotenstvím a nitrožilním užíváním drog (Aldape et al., 2006).

Některé druhy se negativně projevují při výrobě potravin. Pozdní duření sýrů (produkce kyseliny máselné a plynů), je důsledek přítomnosti spor *Clostridium tyrobutyricum* v syrovém mléce, a vytváří tak četné ztráty při výrobě sýrů (Klijn et al., 1995).

2.4 Selektivní média pro izolaci rodu *Bifidobacterium*

Bifidobakterie, jedna z nejpočetnějších bakteriálních populací v lidském zažívacím traktu, byly ve vysokém počtu zaznamenány i ve stolici. Díky této skutečnosti bylo navrženo, aby byly bifidobakterie používány, jako indikátor fekálního znečištění. Jak již bylo několikrát výše zmíněno, některé druhy bifidobakterií jsou díky svým prospěšným vlastnostem začleňovány do fermentovaných mléčných výrobků. Proto je dostupnost snadných a levných metod detekce, identifikace, a stanovení počtu bifidobakterií důležitá jak v oblasti životního prostředí, tak v potravinářské mikrobiologii (Nebra et Blanch, 1999).

Živná média pro bifidobakterie lze rozdělit na základní, elektivní, diferenciatní a selektivní. Základní média jsou užitečná pro rutinní stanovení počtu bifidobakterií, pokud se nacházejí jako čistá kultura, Reinforced Clostridial Agar a De Man Rogosa Sharpe (MRS) s cysteinem jsou média zvolená do průmyslových laboratoří kontroly kvality. Již dříve byla popsána některá média pro selektivní nebo diferenciatní izolaci bifidobakterií od bakterií mléčného kvašení. Vědci tehdy dospěli k závěru, že z velkého počtu dostupných selektivních médií, neexistuje pro izolaci bifidobakterií žádné standardní médium (Roy, 2001). Talwalkar a Kailasapathy (2003) hodnotily různá selektivní nebo diferenciatní média, aby zajistily spolehlivé stanovení počtů *Bifidobacterium* ssp., *Lactobacillus acidophilus* a *L. casei* z devíti různých komerčních probiotických jogurtů. Žádné selektivní ani diferenciatní médium, neposkytlo spolehlivé výsledky. ISO norma pro bifidobakterie je platná a uvedena níže. Z výzkumu tedy jasně vyplývá, že je nezbytně nutné vyvinout spolehlivé médium k přesnému vyčíslení probiotických bakterií v komerčních fermentovaných výrobcích. Některá selektivní média jsou uvedena níže.

2.4.1 Selektivní média bez antibiotik

Jako selektivní faktory jsou v médiu RB, podle původního anglického názvu "Raffinose-Bifidobacterium agar", propionát (15g/l) a chlorid lithný (3g/l). Rafinóza (7,5g/l) obsažená v tomto médiu slouží jako selektivní zdroj uhlíku a kasein (5g/l) je používán jako zdroj proteinů, což má za následek zónu srážení kolem kolonie bifidobakterií. Bifidobakterie rostoucí na RB agaru se vykazují žlutými koloniemi, se žlutou aureolou a zónou srážení. Na RB agaru rostou velmi dobře všechny lidské a mléčné druhy bifidobakterií, s výjimkou některých kmenů *Bifidobacterium bifidum*. Některé zvířecí nebo méně časté druhy, *B. gallicum*, *B. asteroides*, *B. animalis* ssp. *animalis*, *B. pullorum* a některé kmeny *B. bifidum* buď nenarostly, nebo nevykázaly charakteristické reakce. Ovšem toto médium není plně selektivní, protože dobrý růst prokázaly i některé další bakterie trávicího traktu: byly mezi nimi kmeny rodu *Actinomyces*, kmeny *Clostridium perfringens* a některé laktobacily živočišného původu (Hartemink et al., 1996).

Selektivita RB agaru byla porovnávána s Wilkins-Chalgren agarem modifikovaným přidavkem mupirocinu (MW agar) a s Beerens agarem s ohledem na stanovení počtu bifidobakterií ze vzorků výkalů sajících selat. Ani jeden z těchto agarů nebyl pro bifidobakterie ze vzorků výkalů selektivní. Nejvyšší nárůst a rozmanitost bifidobakterií byly získány z MW agaru (Mikkelsen et al., 2003).

Nebra et Blanch (1999) testovaly další selektivní médium, BFM (*Bifidobacterium* médium) médium. Selektivně v tomto médiu působí methylenová modř, kyselina propionová a chlorid lithný. Jako hlavní zdroj uhlíku byla použita laktulóza. Nízké pH média přispívá k inhibici růstu *Enterobacteriaceae*. Pozitivem je i jeho jednoduché složení. Toto médium by mohlo být používáno pro rutinní analýzy v oblasti životního prostředí a potravinářské mikrobiologie.

Pro selektivní stanovení počtu bifidobakterií ve fermentovaném mléce, kterých by měl výrobek obsahovat přes 10^6 bifidobakterií/g, lze doporučit Columbia agar, doplněný o chlorid lithný a propionát sodný, a MRS médium obohacené o neomycin, paromomycin, kyselinu nalidixovou a chlorid lithný (Roy, 2001).

2.4.2 Selektivní média s antibiotiky

Rada et Petr (2000) použili pro stanovení bifidobakterií ve vzorcích obsahu střev slepic dvě selektivní média. Prvním byl Wilkins-Chalgren agar s ledovou k. octovou (1 ml/l) a mupirocinem (100 mg/l) a TPY agar s ledovou k. octovou (1 ml/l) a mupirocinem (100mg/l), neboli MTPY. Oba Avary byly pro bifidobakterie selektivní, ale MTPY vykazoval vyšší počet narostlých bifidobakterií v 1 g. Většina kmenů izolovaných z tohoto média kvasila melibiózu, sacharózu a rafinózu, ale žádné nekvasily glukózu. Výsledky svědčí o tom, že média pro selektivní výčet a izolaci bifidobakterií ze střev drůbeže, nesmí obsahovat glukózu jako jediný zdroj uhlíku. Dospěly k závěru, že MTPY médium je vysoce selektivní a umožňuje růst jak glukózu fermentujících, tak nefermentujících bifidobakterií a to především proto, že obsahuje oligosacharidy rafinózové řady, které mají velmi dobrý vliv na růst bifidobakterií.

O mupirocin je obohaceno i MRS médium s cysteinem, nazvané BSM médium. Bylo zjištěno, že toto selektivní médium podporuje růst bifidobakterií, ale inhibuje širokou škálu nebifidobakteriálních kmenů. Bacily, laktobacily a streptokoky v BSM médiu nedokázaly vytvořit kolonie. Enterokoky, pediokoky a propionové bakterie vytvořily kolonie o průměru menším než 0.5 mm, zatímco bifidobakterie vytvořily kolonie o průměru vyšším než 1 mm, a byly tak snadno odlišitelné. Přidáním nystaninu do BSM média bylo dosaženo i inhibice *Saccharomyces cerevisiae*. BSM se doporučuje pro stanovení počtu bifidobakterií z krmiv pro zvířata (Simpson et. al, 2004b).

MRS médium s přidaným neomycinem paromomycinem, kyselinou nalidixovou (první syntetické chinolonové antibiotikum) a chloridem lithným, se používá ke stanovení počtu bifidobakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích (Roy, 2001).

Norma ISO 29981:2010(E) popisuje stanovení bifidobakterií v mléčných výrobcích pomocí TOS-MUP média. TOS (směs transgalaktosilovaných oligosacharidů) je směs získaná enzymatickou hydrolýzou laktózy pomocí enzymu β -galaktosidázy z *Aspergillus oryzae*. Další přísady jsou pepton, kvasniční extrakt, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SAO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, cystein, propionát sodný, agar a voda. Mupirocin (mupirocin lithium salt) obsažený v tomto médiu inhibuje růst bakterií mléčného kvašení běžně přidávaných do mléčných výrobků, jako jsou: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* atd. Bifidobakterie jsou vůči mupirocinu rezistentní.

2.5 Mupirocin a norfloxacin

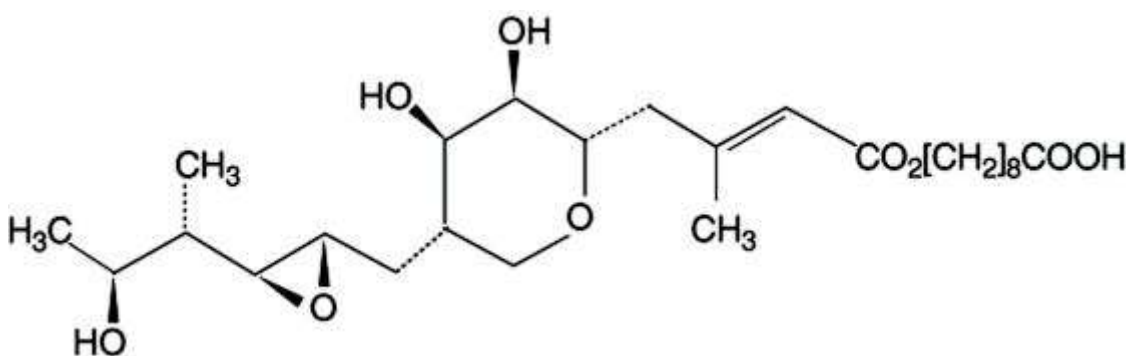
Mupirocin je antibiotikum hojně využívané do izolačních médií pro bifidobakterie, nemusí však působit zcela selektivně. Norfloxacin by se mohl stát vhodnou selektivní látkou do kultivačních médií pro izolaci bifidobakterií.

2.5.1 Mupirocin

Mupirocin je produkován *Pseudomonas fluorescens* a je vysoce aktivní proti stafylokokům, streptokokům a některým gramnegativním bakteriím, včetně *Haemophilus influenzae* a *Neisseria gonorrhoeae*. Méně aktivní je proti většině anaerobních gramnegativních tyčinek (Sutherland et al., 1985).

Do klinické praxe byl mupirocin zaveden ve Velké Británii v roce 1985 a následně registrovaný pro použití ve více než 90 dalších zemích. Osvědčil se především při léčbě kožních infekcí a stal se jedním z nejúspěšnějších lokálních antibiotik při léčbě *Staphylococcus aureus* v dutině nosní, a to i u kmenů rezistentních na meticilin. Bohužel byla popsána rezistence vůči mupirocinu, krátkou dobu po jeho uvedení do praxe (Cookson, 1998).

Obr. č. 3 Chemická struktura mupirocinu

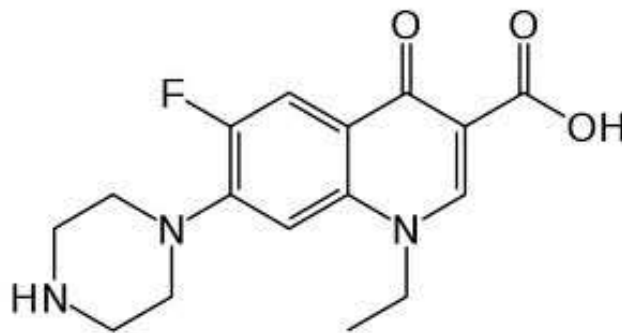


zdroj: medicineonline.com

2.5.2 Norfloxacin

Norfloxacin patří mezi fluorochinolonové antimikrobiální látky druhé generace, je to substituovaný protějšek kyseliny nalidixové (nalidixic acid). Projevuje se mnohem širším antimikrobiálním spektrem účinnosti než mateřská látka. Na rozdíl od kyseliny nalidixové, je norfloxacin účinný také proti *Pseudomonas aeruginosa* a některým gram pozitivním mikroorganismům (Holmes et al., 1985).

Obr. č. 4 Chemická struktura norfloxacinu



zdroj: arzneistoffe.net

3. Vědecká hypotéza a cíl práce

3.1 Vědecká hypotéza

Pro získávání nových kmenů bifidobakterií je nutné používat selektivní pěstební prostředí. Do kultivačních médií pro bifidobakterie se používá celá řada antimikrobiálních látek, přesto ještě nebylo vyvinuto žádné médium, které by bylo vhodné pro izolaci ze všech prostředí. V současnosti se hojně používají pro stanovení bifidobakterií média, která mají jako hlavní selektivní složku mupirocin. Bylo ovšem prokázáno, že mupirocin již nemusí působit zcela selektivně, a to především na klostridie.

Předpokládáme, že norfloxacin bude působit na klostridie inhibičně, zatímco bifidobakterie budou rezistentní. Bude tedy možné využívat norfloxacin jako selektivní faktor v kultivačních médiích pro bifidobakterie.

3.2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo testování citlivosti bifidobakterií a klostridií na antibiotikum norfloxacin a zjistit tak, zda je norfloxacin vhodnou antimikrobiální látkou do kultivačních médií pro izolaci bifidobakterií.

4. Materiál a metody

V bakalářské práci bylo použito 61 kmenů rodu *Bifidobacterium*, izolovaných ze stolice kojenců a dospělého člověka, z výkalů telat, selat, králíků, makaků, včely, jehněte a slepic. U slepic byly použity i kmeny bifidobakterií izolované ze slepého střeva a z volete. Dále byl použit kmen izolovaný z japonského mléčného výrobku. Byly také testovány kmeny ze sbírky DSMZ (Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury). *B. pseudolongum* ssp. *globosum* DSMZ 20092, *B. coryneforme* DSMZ 20216, *B. thermophilum* DSMZ 20212, *B. gallinarum* DSMZ 20670, *B. boum* DSMZ 20432, *B. thermacidophilum* ssp. *thermacidophilum* DSMZ 15837, *B. thermophilum* DSMZ 20210, *B. indicum* DSMZ 20214, *B. porcinum* DSMZ 17755, *B. choerinum* DSMZ 20434, *B. animalis* ssp. *lactis* DSMZ 10140, *B. pseudolognum* ssp. *pseudolongum* DSMZ 20099 a *B. pullorum* DSMZ 20433. Jejich seznam a taxonomické zařazení jsou zobrazeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Testované kmeny rodu *Bifidobacterium*

Taxonomické zařazení	Původ
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> DSMZ 20092	sbírkový kmen
<i>B. coryneforme</i> DSMZ 20216	sbírkový kmen
<i>B. thermophilum</i> DSMZ 20212	sbírkový kmen
<i>B. gallinarum</i> DSMZ 20670	sbírkový kmen
<i>B. boum</i> DSMZ 20432	sbírkový kmen
<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>thermacidophilum</i> DSMZ 15837	sbírkový kmen
<i>B. thermophilum</i> DSMZ 20210	sbírkový kmen
<i>B. indicum</i> DSMZ 20214	sbírkový kmen
<i>B. porcinum</i> DSMZ 17755	sbírkový kmen
<i>B. choerinum</i> DSMZ 20434	sbírkový kmen
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSMZ 10140	sbírkový kmen
<i>B. pseudolognum</i> ssp. <i>pseudolongum</i> DSMZ 20099	sbírkový kmen
<i>B. pullorum</i> DSMZ 20433	sbírkový kmen

Taxonomické zařazení	Označení kmene	Původ
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	A1.2	stolice kojence
<i>B. adolescentis</i>	H1.1	stolice kojence
<i>B. bifidum</i>	Ja8.1	stolice kojence
<i>B. bifidum</i>	OD2	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	MJ B2	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	AP	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	JV6	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	FJ3	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	JB1	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	KUA	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	ELIZ	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	ART	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	KU1	stolice kojence
<i>B. adolescentis</i>	VP3	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	LB3	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	TEREZKA	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	BA	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	B1	stolice kojence
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	T	stolice kojence
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	017III1	výkaly telete
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	012II1	výkaly telete
<i>B. thermophilum</i>	025II	výkaly telete
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i>	022II1	výkaly telete
<i>B. thermophilum</i>	017III2	výkaly telete
<i>B. thermophilum</i>	PR4	výkaly selete
<i>B. thermophilum</i>	PRA4	výkaly selete
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	P/AG	výkaly selete
<i>Bifidobacterium</i>	P2	výkaly selete
<i>Bifidobacterium</i>	PR3	výkaly selete
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>	PG	výkaly selete
<i>Bifidobacterium</i>	G	výkaly selete
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	MA5	slepé střevo slepice
<i>Bifidobacterium</i>	MN2	slepé střevo slepice
<i>Bifidobacterium</i>	MA1	slepé střevo slepice
<i>Bifidobacterium</i>	MC	výkaly slepice
<i>Bifidobacterium</i>	MA3	výkaly slepice
<i>Bifidobacterium</i>	NI3	výkaly slepice
<i>Bifidobacterium</i>	VO2	vole slepice
<i>Bifidobacterium</i>	MV3	vole slepice

<i>Bifidobacterium</i>	M5	výkaly makaka
<i>Bifidobacterium</i>	M6	výkaly makaka
<i>Bifidobacterium</i>	M7	výkaly makaka
<i>B. pseudolongum</i>	G1	výkaly králíka
<i>Bifidobacterium</i>	G4	výkaly králíka
<i>Bifidobacterium</i>	2K	výkaly jehně
<i>B. asteroides</i>	VV41	výkaly včely
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	R37	stolice dospělého člověka
<i>Bifidobacterium</i>	B5	japonský mléčný výrobek

Z rodu *Clostridium* bylo použito 62 kmenů, které byly izolované ze stolice kojenců a výkalů telat a jehňat. Byly použity i sbírkové kmeny DSMZ (Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury), CCM (Česká sbírka mikroorganismů) a CNCTC (Česká národní sbírka typových kultur). *Cl. perfringens* CCM 4435, *Cl. perfringens* DSMZ 11778, *Cl. tertium* DSMZ 2485, *Cl. paraputrificum* DSMZ 2630, *Cl. perfringens* CNCTC 5467, *Cl. clostridiiforme* DSMZ 933, *Cl. butyricum* DSMZ 10702 a *Cl. acetobutylicum* DSMZ 792. Jejich seznam a taxonomické zařazení jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4. Testované kmeny rodu *Clostridium* sbírkové kmeny

Taxonomické zařazení	Původ
<i>Cl. perfringens</i> CCM 4435	sbírkový kmen
<i>Cl. perfringens</i> DSMZ 11778	sbírkový kmen
<i>Cl. ramosum</i> DSMZ 1402	sbírkový kmen
<i>Cl. tertium</i> DSMZ 2485	sbírkový kmen
<i>Cl. paraputrificum</i> DSMZ 2630	sbírkový kmen
<i>Cl. perfringens</i> CNCTC 5467	sbírkový kmen
<i>Cl. clostridiiforme</i> DSMZ 933	sbírkový kmen
<i>Cl. butyricum</i> DSMZ 10702	sbírkový kmen
<i>Cl. acetobutylicum</i> DSMZ 792	sbírkový kmen

Taxonomické zařazení	Označení kmenu	Původ
<i>Cl. acetobutylicum</i>	L4	stolice kojence
<i>Cl. butyricum</i>	BCA	stolice kojence
<i>Cl. butyricum</i>	T1	stolice kojence
<i>Cl. butyricum</i>	M5	stolice kojence
<i>Cl. clostridioforme</i>	KA	stolice kojence
<i>Cl. clostridioforme</i>	MAM	stolice kojence
<i>Cl. perfringens</i>	KOR1	stolice kojence
<i>Cl. perfringens</i>	KRH	stolice kojence
<i>Cl. perfringens</i>	VOK	stolice kojence
<i>Cl. perfringens</i>	T2	stolice kojence
<i>Cl. perfringens</i>	FW2	stolice kojence
<i>Cl. perfringens</i>	BJA	stolice kojence
<i>Cl. perfringens</i>	TDF	stolice kojence
<i>Cl. perfringens</i>	CM14	stolice kojence
<i>Cl. ramosum</i>	HH3	stolice kojence
<i>Cl. tertium</i>	LAIII	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 1	šš	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 2	TP	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 3	KAKY	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 4	DS1	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 5	BEN	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 6	CED	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 7	HKT	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 8	KRA	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 9	HF	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 10	IVZ	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 11	CM11	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 12	STV	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 13	PAIII Cl.	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 14	ERL IV	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 15	VCHII	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 16	SCB	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 17	CM7	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 18	CM 23A	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 19	CM22	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 20	VEVII	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 21	GAV	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 22	SJAI	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 23	ADAM	stolice kojence
<i>Clostridium</i> sp. 24	FJYW2	stolice kojence

<i>Cl. clostridioforme</i>	J 5IIB	výkaly jehněte
<i>Cl. perfringens</i>	J 9I	výkaly jehněte
<i>Cl. perfringens</i>	J 5I	výkaly jehněte
<i>Clostridium</i> sp. 27	1 V	výkaly jehněte
<i>Clostridium</i> sp. 28	J 7IA	výkaly jehněte
<i>Clostridium</i> sp. 29	J 9IIB	výkaly jehněte
<i>Clostridium</i> sp. 30	J 8IIB	výkaly jehněte
<i>Clostridium</i> sp. 31	J 7II	výkaly jehněte
<i>Clostridium</i> sp. 32	J 4V	výkaly jehněte
<i>Cl. perfringens</i>	tele	výkaly telete
<i>Clostridium</i> sp. 25	35/2	výkaly telete
<i>Clostridium</i> sp. 26	12 II	výkaly telete
<i>Clostridium</i> sp. 33	20	výkaly telete

4.1 Testování citlivosti bakterií k antibiotikům norfloxacin a mupirocin

4.1.1 Diskový difúzní test

Diskový difúzní test je standardní metoda pro stanovení citlivosti bakterií k antibiotikům. Podle toho, jestli vyšetřovaná bakterie na agaru vytvoří nebo nevytvoří inhibiční zónu kolem ATB disku, je bakterie buď citlivá, nebo rezistentní k příslušnému ATB. Průměr zóny inhibice se obvykle porovnává s referenčními hodnotami pro citlivé kmeny. Pokud testovaný kmen vytvoří inhibiční zónu o průměru stejném nebo větším než je hraniční hodnota, pokládá se za citlivý k danému antibiotiku. Pokud testovaný kmen vytvoří inhibiční zónu o menším průměru než je hraniční hodnota, považuje se za rezistentní (Urbášková, 1997) viz. obrázek č. 5.

Obr. č. 5 Inhibiční zóna růstu



Antibiotický test

Pro stanovní citlivosti byl použit Wilkins -Chalgren agar (Oxoid) obohacený o cystein (0,5 g/l), sojový pepton (5 g/l) a tween 80 (1 ml/l), který byl sterilován v tlakovém hrnci 45 min, a následně vytemperován ve vodní lázni na 48 °C. Do Petriho misky byl naočkován 1 ml narostlé kultury a zalit 20 ml agaru pomocí sklopné pipety. Agar byl se zaočkovanou kulturou promíchán jemným krouživým pohybem, aby byl nárůst rovnoměrný a vložen do lednice na několik minut zatuhnout. Když agar vytvořil tuhou strukturu, byly pomocí dispensoru (Oxoid) aplikovány papírové disky o průměru 6 mm napuštěné příslušným antibiotikem. Stlačením dispensoru a následným nárazem na povrch tuhého média došlo k uvolnění a rovnoměrnému umístění disků. Jedním stlačením bylo aplikováno 6 disků, polovina NOR (norfloxacin 10 µg/disk) a druhá polovina MUP (mupirocin 200 µg/disk). Petriho misky připravené ke kultivaci byly umístěny do anaerostatu s paladiovým katalyzátorem. Anaerostat byl naplněn plyny CO₂ a H₂ v poměru 10%:90%. Kultivace probíhala anaerobně v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Následně byly změřeny inhibiční zóny v mm vzniklé kolem disků a z nich pak vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

Obr. č. 6 Dispensor (Oxoid)



4.1.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Aby bylo možné zjistit optimální koncentraci norfloxacinu do kultivačních médií, byla stanovena minimální inhibiční koncentrace. MIC byla testována na 12 kmenech rodu *Bifidobacterium* a na 21 kmenech rodu *Clostridium*. Do řádně označených penicilinek s 9 ml bujónu Wilkins-Chalgren (Oxoid) byl injekční stříkačkou aplikován roztok norfloxacinu o koncentraci 300 mg/l, 250 mg/l, 200 mg/l, 150 mg/l, 100 mg/l, 80 mg/l, 50 mg/l, 30 mg/l a 10mg/l. Test byl proveden ve dvou variantách. Pouze s norfloxacinem, a s norfloxacinem a mupirocinem. Do varianty s mupirocinem bylo přidáno 100 mg tohoto antibiotika na litr média. Nakonec bylo do každé penicilinky přidáno 0,3 ml narostlé kultury. Kultivace probíhala v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Následně byl hodnocen nárůst kultury při jednotlivých koncentracích buď znaménkem mínus, pokud kultura nenarostla vůbec nebo znaménkem plus, v závislosti na intenzitě nárůstu. Při minimálním nárůstu bylo použito znaménko plus pouze jednou, při středním nárůstu dvakrát a při intenzivním nárůstu kultury třikrát.

5. Výsledky

Výsledky testování citlivosti 61 kmenů bifidobakterií na norfloxacin jsou uvedeny v tabulce č. 5. a výsledky testování citlivosti 62 kmenů klostridií na norfloxacin a mupirocin v tabulce č. 6. Bifidobakterie byly testovány na mupirocin a jsou všechny rezistentní. Testování citlivosti na ATB bylo provedeno ve třech opakováních a následně vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Kmeny bakterií, které vytvořily inhibiční zónu 10 mm a více, považujeme za citlivé (v tabulce označeny světle žlutou barvou). Kmeny, které vytvořily inhibiční zónu 6 - 10 mm považujeme za mírně citlivé (v tabulce označeny světle zelenou barvou) a kmeny s inhibiční zónou 6 mm za rezistentní (barevně neoznačené).

5.1 Citlivost bifidobakterií na norfloxacin

Všechny testované sbírkové kmeny, kmeny izolované z výkalů telat, selat, slepic (včetně izolátů z volete a slepého střeva), makaků, králíků, jehněte a včely i kmen izolovaný ze stolice dospělého člověka a japonského mléčného výrobku, byly na norfoxacin rezistentní. Pouze u kmenů izolovaných ze stolice kojenců byla prokázána rezistence u 2 z 19 testovaných kmenů. *Bifidobacterium bifidum* OD2 a *Bifidobacterium adolescentis* VP3 projevíly na norfloxacin citlivost průměrnými inhibičními zónami 18,33 mm a 13,33 mm. Výsledky testování jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5. Citlivost bifidobakterií na norfloxacin 10 µg/disk (vyjádřeno jako aritmetický průměr inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka, stanovení bylo provedeno ve třech opakováních)

Kmen	Ø inh. zóny ± SD	Kmen	Ø inh. zóny ± SD
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> DSMZ 20092	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> A 1.2	6,00 ± 0,00
<i>B. coryneforme</i> DSMZ 20216	6,00 ± 0,00	<i>B. adolescentis</i> H 1.1	6,00 ± 0,00
<i>B. thermophilum</i> DSMZ 20212	6,00 ± 0,00	<i>B. bifidum</i> Ja 8.1	6,00 ± 0,00
<i>B. gallinarum</i> DSMZ 20670	6,00 ± 0,00	<i>B. bifidum</i> OD2	18.33 ± 0.47
<i>B. boum</i> DSMZ 20432	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> MJ B2	6,00 ± 0,00
<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>thermacidophilum</i> DSMZ 15837	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> AP	6,00 ± 0,00
<i>B. thermophilum</i> DSMZ 20210	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> JV 6	6,00 ± 0,00
<i>B. indicum</i> DSMZ 20214	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> FJ3	6,00 ± 0,00
<i>B. porcinum</i> DSMZ 17755	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> JB1	6,00 ± 0,00
<i>B. choerinum</i> DSMZ 20434	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> KUA	6,00 ± 0,00
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSMZ 10140	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ELIZ	6,00 ± 0,00
<i>B. pseudolognum</i> ssp. <i>pseudolongum</i> DSMZ 20099	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ART	6,00 ± 0,00
<i>B. pullorum</i> DSMZ 20433	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> KU1	6,00 ± 0,00
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> O17III1	6,00 ± 0,00	<i>B. adolescentis</i> VP3	13.33 ± 0.47
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> O12II1	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> LB3	6,00 ± 0,00
<i>B. thermophilum</i> O25II	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> TE	6,00 ± 0,00
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> O22II1	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> BA	6,00 ± 0,00
<i>B. thermophilum</i> O17III2	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> B1	6,00 ± 0,00
<i>B. thermophilum</i> PR4	6,00 ± 0,00	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> T	6,00 ± 0,00
<i>B. thermophilum</i> PRA4	6,00 ± 0,00	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> MA5	6,00 ± 0,00
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> P/AG	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> MN2	6,00 ± 0,00
<i>Bifidobacterium</i> P2	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> MA1	6,00 ± 0,00
<i>Bifidobacterium</i> PR3	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> MC	6,00 ± 0,00
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i> PG	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> MA3	6,00 ± 0,00
<i>Bifidobacterium</i> G	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> NI 3	6,00 ± 0,00
<i>B. pseudolongum</i> G1	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> VO2	6,00 ± 0,00
<i>Bifidobacterium</i> G4	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> MV3	6,00 ± 0,00
<i>Bifidobacterium</i> 2K	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> M5	6,00 ± 0,00
<i>B. asteroides</i> VV41	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> M6	6,00 ± 0,00
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> R37	6,00 ± 0,00	<i>Bifidobacterium</i> M7	6,00 ± 0,00
<i>Bifidobacterium</i> B5	6,00 ± 0,00		

Barevné označení a původ

sbírkový kmen	výkaly telete	výkaly selete	různé	stolice kojenců	výkaly slepice, slepé střevo, vole	výkaly makaka
---------------	---------------	---------------	-------	-----------------	------------------------------------	---------------

5.2 Citlivost klostridií k norfloxacinu a mupirocinu

Na antibiotikum norfloxacin bylo citlivých 58 ze 62 (93,5 %) testovaných kmenů klostridií, 4 kmeny (6,5 %) byly na toto antibiotikum mírně citlivé a žádný z kmenů nebyl rezistentní. Citlivé byly všechny sbírkové kmeny a kmeny pocházející z výkalů jehňat a telat. Mírnou citlivost projevilo na norfloxacin 10 % kmenů izolovaných ze stolice kojenců. Nejvyšší aritmetický průměr všech inhibičních zón byl naměřen u sbírkových kmenů a to 19,13 mm, u kmenů izolovaných z výkalů telat byly naměřené inhibiční zóny o průměru 17,46 mm, u kmenů kojeneckého původu 16,32 mm a nejmenší inhibiční zóny byly naměřené u kmenů pocházejících z výkalů jehňat, průměrně 14,89 mm.

Na antibiotikum mupirocin bylo ze všech testovaných kmenů klostridií citlivých 38,5 %, mírně citlivých 17,3 % a 44,2 % bylo rezistentních. Z testovaných sbírkových kmenů je na mupirocin citlivých pouze 16,7 %, žádný z kmenů nebyl mírně citlivý a zbylých 83,3 % kmenů bylo rezistentních. U kmenů izolovaných z výkalů jehňat bylo naměřeno 66,7 % citlivých, 11,1 % mírně citlivých a 22,2 % rezistentních kmenů. Kmeny izolované z výkalů telat projevily na mupirocin 75% citlivost, žádný z kmenů nebyl mírně citlivý a 25 % kmenů bylo rezistentních. Kmeny izolované ze stolice kojenců byly citlivé ze 33,3 %, z 24,2 % byly mírně citlivé a ze 45,5 % byly testované kmeny na mupirocin rezistentní. Nejvyšší aritmetický průměr všech inhibičních zón byl naměřen u kmenů izolovaných z výkalů jehňat a to 11,22 mm, u kmenů izolovaných z výkalů telat byly naměřeny inhibiční zóny o průměru 10,67 mm, u kmenů izolovaných ze stolice kojenců 9,73 mm a nejmenší velikost inhibičních zón byla u sbírkových kmenů, průměrně 6,78 mm. Výsledky testování jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6. Citlivost klostridií na norfloxacin 10 µg/disk a mupirocin 200 µg/disk (vyjádřeno jako aritmetický průměr inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka, stanovení bylo provedeno ve třech opakováních). NT - netestováno

Kmen	Norfloxacin Ø inh. zóny ± SD	Mupirocin Ø inh. zóny ± SD	Kmen	Norfloxacin Ø inh. zóny ± SD	Mupirocin Ø inh. zóny ± SD
<i>Cl. perfringens</i> CCM 4435	21.17 ± 0.85	6,00 ± 0,00	<i>Cl. acetobutylicum</i> L4	16,33 ± 0,58	NT
<i>Cl. perfringens</i> DSMZ 11778	20,00 ± 0,82	10,67 ± 0,94	<i>Cl. butyricum</i> BCA	17,00 ± 0,00	NT
<i>Cl. ramosum</i> DSMZ 1402	20,00 ± 0,82	6,00 ± 0,00	<i>Cl. butyricum</i> T1	18,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
<i>Cl. tertium</i> DSMZ 2485	24,00 ± 0,82	6,00 ± 0,00	<i>Cl. butyricum</i> M5	18,33 ± 0,47	6,00 ± 0,00
<i>Cl. paraputrificum</i> DSMZ 2630	18,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00	<i>Cl. clostridioforme</i> KA	16,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00
<i>Cl. perfringens</i> CNCTC 5467	19,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00	<i>Cl. clostridioforme</i> MAM	17,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00
<i>Cl. clostridiiforme</i> DSMZ 933	16,00 ± 0,00	NT	<i>Cl. perfringens</i> KOR1	15,00 ± 0,00	9,33 ± 0,47
<i>Cl. butyricum</i> DSMZ 10702	19,67 ± 0,58	NT	<i>Cl. perfringens</i> KRH	19,67 ± 0,47	8,33 ± 0,47
<i>Cl. acetobutylicum</i> DSMZ 792	13,00 ± 1,73	NT	<i>Cl. perfringens</i> VOK	10,67 ± 0,47	7,33 ± 0,47
<i>Cl. clostridioforme</i> J5IIB	13,67 ± 0,47	8,00 ± 0,00	<i>Cl. perfringens</i> T2	18,00 ± 0,00	8,33 ± 0,47
<i>Cl. perfringens</i> J9I	15,67 ± 0,47	10,67 ± 0,47	<i>Cl. perfringens</i> FW2	18,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00
<i>Cl. perfringens</i> J5I	14,67 ± 0,47	10,67 ± 0,47	<i>Cl. perfringens</i> BJA	17,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00
<i>Clostridium</i> sp. 271V	12,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00	<i>Cl. perfringens</i> TDF	19,00 ± 0,00	18,67 ± 0,47
<i>Clostridium</i> sp. 28J7IA	16,33 ± 0,47	6,00 ± 0,00	<i>Cl. perfringens</i> CM14	18,33 ± 0,47	6,00 ± 0,00
<i>Clostridium</i> sp. 29J9IIB	13,67 ± 0,47	17,00 ± 0,82	<i>Cl. ramosum</i> HH3	20,00 ± 1,00	NT
<i>Clostridium</i> sp. 30J8IIB	15,00 ± 0,00	16,33 ± 0,47	<i>Cl. tertium</i> LAIII	9,33 ± 0,47	22,67 ± 0,47
<i>Clostridium</i> sp. 31J7II	14,67 ± 0,47	10,67 ± 0,47	<i>Clostridium</i> sp. 1 šš	9,67 ± 0,58	NT
<i>Clostridium</i> sp. 32J4V	17,67 ± 0,47	15,67 ± 0,47	<i>Clostridium</i> sp. 2TP	8,67 ± 0,58	NT
<i>Cl. perfringens</i> tele	21,33 ± 0,47	10,33 ± 0,47	<i>Clostridium</i> sp. 3KAKY	17,33 ± 0,58	NT
<i>Clostridium</i> sp. 2535/2	14,50 ± 0,71	10,00 ± 0,00	<i>Clostridium</i> sp. 4DS1	15,67 ± 0,58	NT
<i>Clostridium</i> sp. 2612II	19,33 ± 0,47	16,33 ± 0,47	<i>Clostridium</i> sp. 5BEK	14,33 ± 0,47	9,33 ± 0,47
<i>Clostridium</i> sp. 3320	14,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00	<i>Clostridium</i> sp. 6CED	15,67 ± 0,47	8,67 ± 0,47
<i>Clostridium</i> sp. 16SCB	20,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	<i>Clostridium</i> sp. 7HKT	15,67 ± 0,47	12,67 ± 0,47
<i>Clostridium</i> sp. 17CM7	23,67 ± 0,94	7,33 ± 0,47	<i>Clostridium</i> sp. 8KRA	10,00 ± 0,00	21,00 ± 0,82
<i>Clostridium</i> sp. 18CM23A	19,33 ± 0,94	6,00 ± 0,00	<i>Clostridium</i> sp. 9HF	15,67 ± 0,47	8,67 ± 0,47
<i>Clostridium</i> sp. 19CM22	17,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00	<i>Clostridium</i> sp. 10IVZ	15,67 ± 0,47	17,67 ± 0,47
<i>Clostridium</i> sp. 20VEVII	24,33 ± 0,47	6,00 ± 0,00	<i>Clostridium</i> sp. 11CM11	18,67 ± 0,47	6,00 ± 0,00
<i>Clostridium</i> sp. 21GAV	11,67 ± 0,47	11,67 ± 0,47	<i>Clostridium</i> sp. 12STV	16,67 ± 0,47	10,00 ± 0,00
<i>Clostridium</i> sp. 22SJAII	21,33 ± 0,47	18,67 ± 0,47	<i>Clostridium</i> sp. 13PAIII	13,33 ± 0,47	6,00 ± 0,00
<i>Clostridium</i> sp. 23ADAM	20,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	<i>Clostridium</i> sp. 14 ERL IV	13,33 ± 0,47	16,00 ± 0,00
<i>Clostridium</i> sp. 24FJYW2	16,00 ± 0,00	14,67 ± 0,00	<i>Clostridium</i> sp. 15VCHII	8,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00

Barevné označení a původ

sbírkový kmen	výkaly jehněte	výkaly telete	stolice kojenice
---------------	----------------	---------------	------------------

hodnoty označené žlutě = citlivé, hodnoty označené zeleně = mírně citlivé, hodnoty barevně neoznačené = rezistentní

5.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Růst testovaných kmenů bifidobakterií nebyl inhibován ani při koncentraci norfloxacinu 300 mg/l. Při koncentraci 300 mg/l vykázal jeden kmen (8,33 %) *Bifidobacterium* JKM pouze minimální nárůst, 4 kmeny (33,33 %) *Bifidobacterium* BV, *B. pullorum* DSMZ 20433, *B. indicum* DSMZ 20214 a *B. animalis* ssp. *animalis* se projevily střední intenzitou nárůstu a všechny ostatní testované kmeny (58,33 %) vykázaly intenzivní nárůst bakterií. Směs s mupirocinem (100 mg/l) neměla na minimální inhibiční koncentraci norfloxacinu vliv. Testování směsi bylo provedeno jen u omezeného množství kmenů, abychom zjistili zda ovlivní MIC norfloxacinu, což se nestalo.

MIC norfloxacinu, tedy koncentrace při které dojde k potlačení růstu bakterií, se u testovaných kmenů klostridií lišila. Pro 6 testovaných kmenů (28,57 %) *Cl. tertium* DSMZ 2485, *Cl. butyricum* DSMZ 10702, *Cl. paraputrificum* DSMZ 2630, *Clostridium* sp. 11CM11, *Clostridium* sp. 24FJYW2 a *Clostridium* sp. 20VEVII byla stanovena inhibiční koncentrace 10 mg/l. Pro 2 testované kmeny (9,52 %) *Cl. perfringens* KRH a *Clostridium* sp. 17CM7 byla stanovena minimální inhibiční koncentrace 30 mg/l. 50 mg/l bylo inhibiční koncentrací pro 3 kmeny (14,29 %) *Cl. perfringens* FW2, *Clostridium* sp. T2 a *Cl. perfringens* CM14. Kmen *Clostridium* sp. 15 VCHII (4,76 %) nerostl při koncentraci norfloxacinu 80 mg/l. Pro další 2 testované kmeny (9,52 %) *Clostridium perfringens* T2 a *Clostridium* sp. 7 HKT byla stanovena MIC 150 mg/l. Pro 3 kmeny (14,29 %) *Clostridium perfringens* J5I, *Clostridium* sp. 28J7IA a *Clostridium perfringens* J9I byla stanovena MIC 200 mg/l, jeden kmen (4,76 %) *Cl. ramosum* DSMZ 1402 se projevilo při koncentraci 200 mg/l nízkým nárůstem. Růst posledních 2 (9,52 %) testovaných kmenů *Clostridium* sp. 35BEK a *Cl. perfringens* KOR1 nebyl inhibován ani při koncentraci 300 mg/l. Směs s mupirocinem (100 mg/l) ovlivnila koncentraci norfloxacinu inhibujícího růst 1 kmene (9,09 %) *Clostridium* sp. 17CM7 ze 30 mg/l na 10 mg/l norfloxacinu.

Tabulka č. 7. Stanovení minimální inhibiční koncentrace (uvedeno v mg/l), NT - netestováno

Kmen	MIC pro norfloxacin	MIC pro norfloxacin + mupirocin (100 mg/l)
<i>Bifidobacterium</i> JKM	>300	NT
<i>Bifidobacterium</i> BV	>300	NT
<i>B. pullorum</i> DSMZ 20433	>300	NT
<i>B. indicum</i> DSMZ 20214	>300	NT
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 012III1	>300	>300
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> 022III1	>300	NT
<i>B. thermophilum</i> 017III1	>300	NT
<i>Bifidobacterium</i> P5	>300	NT
<i>B. gallinarum</i> DSMZ 20670	>300	NT
<i>B. thermophilum</i> DSMZ 20210	>300	NT
<i>B. thermophilum</i> PR4	>300	>300
<i>B. asteroides</i> VV41	>300	>300
<i>Cl. tertium</i> DSMZ 2485	10	NT
<i>Cl. butyricum</i> DSMZ 10702	10	NT
<i>Cl. paraputrificum</i> DSMZ 2630	10	NT
<i>Clostridium</i> sp. 11CM11	10	10
<i>Clostridium</i> sp. 24FJYW2	10	10
<i>Clostridium</i> sp. 20VEVII	10	10
<i>Cl. perfringens</i> KRH	30	NT
<i>Clostridium</i> sp. 17CM7	30	10
<i>Cl. perfringens</i> FW2	50	NT
<i>Clostridium</i> sp. 2TP	50	NT
<i>Cl. perfringens</i> CM14	50	50
<i>Clostridium</i> sp. 15VCHII	80	80
<i>Cl. perfringens</i> T2	150	NT
<i>Clostridium</i> sp. 7HKT	150	150
<i>Cl. perfringens</i> J5I	200	200
<i>Clostridium</i> sp. 28J7IA	200	200
<i>Cl. perfringens</i> J9I	200	200
<i>Cl. ramosum</i> DSMZ 1402	200	NT
<i>Clostridium</i> sp. 5BEN	>300	NT
<i>Cl. perfringens</i> KOR1	>300	>300

6. Diskuse

Bifidobakterie jsou stejně jako klostridie, a řada dalších anaerobních bakterií přirozenou součástí trávicího traktu lidí a zvířat. Jsou to nepatogenní, komensální bakterie, které mají pověst stimulantů zdraví. To vedlo k hojnému používání bifidobakterií do probiotických doplňků stravy, při prevenci a léčbě gastrointestinálních infekcí a průjmů spojených s užíváním antibiotik. Díky jejich vysokému počtu v trávicím traktu je také možné využít bifidobakterie jako indikátory fekálního znečištění. Pro izolaci těchto bakterií z různých prostředí je nezbytné používat spolehlivá selektivní média, která neomezují růst bifidobakterií, ale inhibují růst nežádoucích bakterií. Tato selektivní média obsahují kromě antibiotik i jiné antimikrobiální látky, na které jsou bifidobakterie rezistentní a ostatní bakterie potlačují. Ovšem ani takové agary nemusí být plně selektivní.

Pro izolaci bifidobakterií z trávicího traktu se běžně používá TPY agar s mupirocinem (100 mg/l) a ledovou kyselinou octovou (1 ml/l), dále jen MTPY (Rada et Petr, 2000). Na MTPY agaru jsou schopné růstu všechny čisté kultury bifidobakterií (Rada et Petr, 2002) To odpovídá i výsledkům této práce, podle kterých byly na mupirocin rezistentní všechny testované kmeny bifidobakterií. Podle Vlková et al. (2005) však rostou na tomto médiu i některé klostridie. Bylo zjištěno, že 35 % testovaných dětí nemělo ve vzorcích stolice bifidobakterie a na použitém MTPY agaru rostly právě klostridie. Toto tvrzení podporují výsledky ATB testu provedené pomocí deskové difúzní metody na Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid), uvedené v tabulce č. 7., kde bylo na mupirocin citlivých pouze 38,5 % ze všech testovaných kmenů klostridií, 17,3 % bylo mírně citlivých a 44,2 % kmenů bylo na toto antibiotikum rezistentních. Nejméně citlivé byly kmeny izolované z výkalů jehňat pouze 11,1 % citlivých kmenů a 66,7 % kmenů rezistentních, a sbírkové kmeny 16,7 % citlivých kmenů a 83,3 % rezistentních. Naopak nejvíce citlivé kmeny byly izolované z výkalů telat, a to ze 75 %. Izoláty kojeneckého původu byly citlivé ze 33,3 %, 24,2 % kmenů bylo mírně citlivých a 45,5 % rezistentních.

Charteris et al. (1998) testovali citlivost 15 kmenů bifidobakterií lidského původu (převážně ze stolice kojenců a dospělého člověka) a 1 kmen z výkalů krysy. Zjistili, že všechny kmeny jsou rezistentní na norfloxacin. Testované kmeny patřily do druhů *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. longum* ssp. *longum* a *B. longum* ssp. *animalis*. Citlivost 10 kmenů bifidobakterií testoval Jinghong (2008) a dospěl k závěru, že kmeny druhů *B. catenulatum*, *B. adolescentis* a *B. choerinum* nejsou na norfloxacin citlivé.

Naopak Shao-yingla et al. (2008) uvádějí, že se 7 kmenů bifidobakterií druhů *B. choerinum*, *B. catenulatum* a *B. adolescentis* projevilo rozdílnou citlivostí na norfloxacin. V této práci projevily citlivost jeden ze dvou kmenů druhově identifikovaných jako *B. bifidum* a jeden ze dvou kmenů identifikovaných jako *B. adolescentis*, z celkového počtu 61 testovaných kmenů. Oba citlivé kmeny byly izolovány ze stolice kojence. Lze tedy usoudit, že citlivost bifidobakterií na norfloxacin není druhově specifická vlastnost a projevuje se spíše ojediněle.

Obecně se uvádí, že na antibiotikum norfloxacin jsou citlivé bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus faecalis* a *Staphylococcus*. Shungu et al. (1983) provedli studii zabývající se aktivitou norfloxacinu proti různým patogenům trávicího traktu a uveřejnili, že norfloxacin byl velmi účinný proti kmenům *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., a *E. coli*. Dále uvádí, že norfloxacin prokázal lepší aktivitu vůči testovaným organismům, než jeho substituovaný protějšek kyselina nalidixová. Abraham et Wamisho (2009) uvádějí, že norfloxacin je jednou z nejefektivnějších látek proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím izolovaných z otevřených fraktur v Etiopii, kde dominovaly *Staphylococcus aureus* a *Actinobacter* spp. Z výsledků této práce vyplývá, že na norfloxacin jsou citlivé i bakterie rodu *Clostridium*. Ze 62 kmenů testovaných v této práci nebyl žádný na norfloxacin rezistentní. Mírnou citlivost vykazaly 4 kmeny kojeneckého původu, a to průměrnými inhibičními zónami: *Cl. tertium* LAIII 9,33 mm, *Clostridium* sp. 1šš 9,67 mm, *Clostridium* sp. 2TP 8,67 mm a *Clostridium* sp. 15VCHII průměrnými 8 mm. Největší průměr inhibičních zón byl naměřen u sbírkových kmenů a to 19,13 mm, zatímco nejmenší průměr inhibičních zón byl zjištěn u kmenů pocházejících z trávicího traktu jehňat a to 11,22 mm. Rahman et al. (2009) uvádějí, že na norfloxacin byl citlivý bakteriální kmen zodpovědný za myonekrózu a smrt slona indického (*Elephas maximus*), identifikovaný jako *Clostridium perfringens* typu A. Shome et al. (2006) také zjistili citlivost *Clostridium perfringens* typu A na norfloxacin, bakterie byla příčinou fatální myonekrózy u dobytka v Manipuru, Indie. To odpovídá výsledkům bakalářské práce, kde bylo ze 62 testovaných kmenů 14 identifikováno jako *Cl. perfringens*, a žádný z nich nebyl na toto antibiotikum citlivý. V Zimbabwe byla testována citlivost na norfloxacin bakterií druhu *Cl. difficile* izolovaných z výkalů brojlerů a z půdy. Všechny testované kmeny byly na norfloxacin rezistentní (Simango et Mwakurudza, 2008). Výsledky měření není možné potvrdit ani vyvrátit, protože tato bakterie není pravidelnou součástí trávicího traktu a žádný z kmenů použitých v této práci nebyl identifikován jako *Clostridium difficile*. Problematikou týkající se citlivostí bakterií *Cl. difficile* se zabývali belgičtí vědci Delmee a Avesani (1985). Citlivost k

7 chynolinovým antibiotikům testovali na 100 kmenech těchto bakterií, izolovaných převážně z klinických případů průjmů spojených s užíváním antibiotik, z trávicího traktu dětí bez příznaků a ze životního prostředí. Podle jejich výsledků byla prokázána nízká aktivita norfloxacinu proti všem testovaným kmenům. Agnoletti et al. (2009) ve svém článku uvádějí, že byla zjištěna buď jen mírná citlivost nebo rezistence k norfloxacinu *in vitro* u 60 toxických kmenů *Clostridium spiriforme*, stejně jako u *Clostridium difficile*. Jak *Cl. difficile*, tak *Cl. spiriforme* jsou významnými původci spontánních nebo s užíváním antibiotik spojených průjmů a enteritid. Lze tedy předpokládat, že u zdravých jedinců budou tyto bakterie přirozeně potlačovány probiotickou mikroflórou a neprojeví se při izolaci bifidobakterií z trávicího traktu. Z dostupných informací nejsou k dispozici výsledky testování citlivosti všech druhů rodu *Clostridium*, zejména těch nepatogenních. Z výsledků diplomové práce (Bazgierová, 2011) zabývající se vývojem selektivního média pro izolaci bifidobakterií vyplývá, že norfloxacin potlačuje bakterie rodu *Clostridium*, izolovaných ze stolice kojenců. Ze 13 testovaných kmenů byl 1 kmen na norfloxacin rezistentní, 2 kmeny mírně citlivé a 10 kmenů citlivých. Mírnou citlivost projevily kmeny *Clostridium* sp. 1šš a *Clostridium* sp. 2TP, inhibičními zónami 9,67 mm a 8,67 mm. Oba zmíněné kmeny byly testovány i v této bakalářské práci a rovněž se vykazaly mírnou citlivostí, tedy průměrnou inhibiční zónou v rozmezí 6 - 10 mm. Rezistentní byl podle Bazgierová (2011) sbírkový kmen *Clostridium clostridiiforme* DSMZ 933, který byl také testován v této práci a projevil se průměrnou inhibiční zónou 16 mm, je tedy na norfloxacin citlivý.

Minimální inhibiční koncentrace norfloxacinu pro bifidobakterie nebyla stanovena. Žádný z testovaných kmenů nebyl inhibován ani koncentrací 300 mg/l norfloxacinu. Při této koncentraci se jeden kmen *Bifidobacterium* JKM projevil nízkým nárůstem. U 4 kmenů *Bifidobacterium* BV, *B. pullorum* DSMZ 20433, *B. indicum* DSMZ 20214 a *B. animalis* ssp. *animalis* 012III1 byla naměřena střední intenzita nárůstu a všechny ostatní testované kmeny se projevíly intenzivním nárůstem. Minimální inhibiční koncentrace norfloxacinu byla stanovena pro 6 kmenů klostridií 10 mg/l, dva kmeny byly inhibovány koncentrací 30 mg/l, 3 kmeny 50 mg/l, 1 kmen 80 mg/l, 2 kmeny 150 mg/l a 4 kmeny byly inhibovány koncentrací 200 mg/l. Nárůst dvou kmenů *Clostridium* sp. BEK a *Cl. perfringens* KOR1 nebyl inhibován ani koncentrací 300 mg/l. Celkově bylo 90 % testovaných kmenů klostridií inhibováno při koncentraci 200 mg/l a nižší. Tuto koncentraci tedy lze doporučit pro další testování. Aspinall et Hutchinson (1992) uvádějí ve své práci, zabývající se selektivním médiem pro izolaci *Clostridium difficile*, že koncentrace norfloxacinu 16 mg/l není efektivní ani proti *Cl. difficile*,

ani proti méně citlivým kmenům *Clostridium* sp. (jiné než *Cl. difficile*). Tato koncentrace však inhibovala všechny testované kmeny streptokoků a *enterobacteriaceae* fekálního původu. Agnoletti et al. (2009) určily minimální inhibiční koncentraci norfloxacinu pro *Cl. spiriforme* 32 mg/l a došli k závěru, že jsou tyto bakterie na norfloxacin rezistentní nebo jen málo citlivé.

Z výsledků této bakalářské práce a ostatních uvedených autorů lze usoudit, že norfloxacin by mohl být vhodnou selektivní látkou, na kterou jsou bifidobakterie rezistentní a klostridie citlivé. Jak uvádí Vlková et al. (2005), pokud ve vzorcích stolice dominují klostridie a nikoliv bifidobakterie, je dosud hojně využívané médium s mupirocinem a ledovou kyselinou octovou (Rada et Petr, 2000) nedostačující a umožňuje růst i klostridiím. Bylo prokázáno, že na mupirocin bylo citlivých pouze 38,5 %, tedy 20 z 52 testovaných kmenů klostridií, zatím co na norfloxacin bylo citlivých 93,5 %, tedy 58 ze 62 kmenů, a žádný nebyl rezistentní. Lze ho tedy doporučit pro testování do kultivačních médií pro selektivní stanovení bifidobakterií v trávicím traktu, v koncentraci 200 mg/.

7. Závěr

Byla testována citlivost kmenů rodu *Bifidobacterium* a *Clostridium* k antibiotiku norfloxacin. Úkolem bylo ověřit, zda jsou bifidobakterie na norfloxacin rezistentní a klostridie citlivé. Taková látka by mohla být používána do selektivních médií pro bifidobakterie. Bylo zjištěno, že norfloxacin byl při potlačení klostridií velmi účinný a zároveň byly bifidobakterie rezistentní. Doporučená minimální inhibiční koncentrace norfloxacinu byla stanovena na 200 mg/l. Norfloxacin je tedy vhodná látka pro další testování do selektivních kultivačních médií pro stanovení a izolaci bifidobakterií.

8. SEZNAM LITERATURY

Abraham, Y., Wamisho, B.L., 2009. Microbial susceptibility of bacteria isolated from open fracture wounds presenting to the err of black-lion hospital, Addis Ababa University, Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*. 3, 939-951.

Aldape, M.J., Bryant, A.E., Stevens, D.L., 2006. *Clostridium sordellii* infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment. *Oxford Journals of Medicine and Clinical Infectious*. 43, 1436-1446.

Andrade, S., Borges, N., 2009. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* on plasma lipids of women with normal or moderately elevated cholesterol. *Journal of Dairy Research*. 76, 469-474

Aspinall, S.T., Hutchinson, D.N., 1992. New selective medium for isolation *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*. 45, 812-814.

Ataie-Jafari, A., Larijani, B., Majd, H.A., Tahbaz, F., 2009. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Annals of Nutrition Metabolism*. 54, 22–27.

Bazgierová, R., 2011. Vývoj selektivního média pro izolaci bifidobakterií. Diplomová práce. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. ČZU v Praze, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky.

Biavati, B., Mattarelli, P., 2001. The family *Bifidobacteriaceae*. In: *The Prokaryotes*. 3, 322-382, 2006.

Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Botazzi, V., 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annal Microbiology*. 50, 117-131.

Biavati, B., Castagnoli, P., Trovatelli, L.D., 1986. Species of the genus *Bifidobacterium* in the faeces of human adults. *Microbiologica* 9, 39-45

Biavati, B., Castagnoli, P., Crociani, F., Trovatelli, L.D., 1984. Species of the *Bifidobacterium* in the faeces of infants. *Microbiologica* 7, 341-345

Bláha, V., Vášek, J., 2011. Význam prebiotik v potravě. *practicus* 8/2011.

Brüggemann, H., Bäumer, S., Ficke, W.F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, CH., Martinez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A., Gottschalk, G., 2003. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *PNAS*. 100, 1316-1321

Collins, M.D., Gibbon, G.R., 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approach for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*. 69 (5). 1052S-1057S

Cookson, B.D., 1998. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practise. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 11-18.

Crociani, Matteuzi, 1982 in Scardovi, V., 1984. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Kreig, N.R., Holt, J.G., (ed). Baltimore. 1, 1418-1434.

Crociani et al., 1973, in Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Botazzi, V., 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annal Microbiology*. 50, 117-131

Crociani et al., 1996 in Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Botazzi, V., 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annal Microbiology*. 50, 117-131

Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C., Scardovi, V., 1996. *Bacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 46, 654-571.

D'aimmo, M.R., Modesto, M., Biavati, B., 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*. 115, 135-42.

- Delmee, M., Avesani, V.,** 1985. Comparative in vitro activity of seven chilonones against 100 clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Feb 1986. 29, 374-375.
- FAO/WHO,** 2002. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluations of probiotics in food. Dostupné z: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Guggan, Ch., Gannon, J., Walker, W.A.,** 2002. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*. 75, 789-808.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G.,** 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York
- Gibson,G.R., Roberfroid, M.B.,**1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutrition*. 125, 1401-1412
- Gibson,G.R., Beatty, E.R., Wang, X., and Cummings, J.H.,** 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterol*. 108, 975-982.
- Gomes, A.M., Malcata, F.X.,** 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Food Science and Technology*. 10, 139-157
- Hartemink, R., Kok, B.J., Weenk, G.H, Rombouts, F.M.,** 1996. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 27, 33-43.
- Holmes, B., Brogden, R.N., Richards, D.M.,** 1985. Norfloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *UK Pub met Central, Drugs*. 30, 482-513.
- Hu, B., Kou, L., Li, C., Zhu, L.P., Fan, Y.R., Wu, Z.W., Wang, J.J., Xu, G.X.,** 2009. *Bifidobacterium longum* as a delivery system of TRAIL and endostatic cooperates with chemotherapeutic drugs to inhibit hypoxic tumor growth TRAIL in *B. longum* inhibit tumor growth. *Cancer Gene Therapy*. 16, 655-663.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potential probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 333-337.

ISO 29981, IDF 220, Milk products - Enumeration of presumptive bifidobacteria - Colony count technique at 37°C. International Standard, First edition 2010-02-01.

Jinghong, S. 2008. The sensitivity of *Bifidobacterium* to 12 antibiotics. *Journal of Hetao University*. 371, S852.6.

Kandler, Lauer, 1974 in Scardovi, V., 1984. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Kreig, N.R., Holt, J.G., (ed). Baltimore. 1, 1418-1434.

Kheadr, E., Dabour, N., Le Lay, C., Lacroix, C., Fliss, I., 2007. Antibiotic susceptibility profile of bifidobacteria as affected by ox gall, acid, and hydrogen peroxide stress. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 51, 169-174.

Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, L., Havlík, J., Koppová, I., Benada, O., Rada, V., Kofroňová, O., 2010a *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from digestive tract of bumblebees. *Systematic and Applied Microbiology*. 33, 359-366.

Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, J., Koppová, I., Havlík, J., Benada, O., Kott, T., 2010b. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., two new bifidobacteria from the bumblebee digestive tracts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, 1315-1321.

Killer, J., Kopečný, J., Rada, V., Dubna, S., Marounek, M., 2009b. Bifidobacteria in the digestive tract of bumblebees. *Anaerobe*. 16, 165-170.

Klijn, N., Nieuwenhof, F.J., Hoolwerf, J.D., van der Waals, C.B., Weerkamp, A.H., 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. 61, 2919- 2924. Dostupné z [www: <http://aem.asm.org/content/61/8/2919>](http://aem.asm.org/content/61/8/2919)

Lauer, E., Kandler, O., 1983. DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *System of Application Microbiology*. 4, 42-64.

- Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2005.** Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 1303-1315.
- Le Leu, R.K., Hu, Y., Brown, I.L., Woodman, R.J., Young, G.P., 2010.** Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protect against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*. 31, 246-251.
- Lin, P., Whang, L., Wu, Y., Ren, W., Hsiao, Ch., Li, S., Chang, J., 2007.** Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen energy*. 32, 1728-1735.
- Lund, B.M., Peck, M.W., 2001.** *Clostridium botulinum*, guide to food borne pathogens. Edited by Ronald G. Labbé and Santos García. John Wiley and Sons, Inc. 69-85.
- Mann, G.V., Spoerry A., 1974:** Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Maasai. *A J Clin Nutrition*. 27, 464-469.
- Mikkelsen, L.L., Bendixen, Ch., Jakobsen, M., Jensen, B.B., 2003.** Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Applied Environmental Microbiology*. 69, 654- 658.
- Mitsuoka, T., 1990.** Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of industrial microbiology*. 6, 263-268.
- Moodler, H.W., 1993.** Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. *International Dairy Journal*. 383-407.
- Myers, G.S.A., Rasko, D.A., Cheung, J.K., Ravel, J., Seshadri, R., DeBoy, R.T., Ren. G., Varga, J., Awad, M.M., Brinkac, L.M., et al., 2006.** Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Research*. 16, 1031-1040.
- Nebra, Y., Blanch, A.R., 1999.** A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 65, 5173-5176.
- Nevoral, J., 2005.** Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatr. pro Praxi*. 2, 59-65.

- Pagori, N., Cheikhyoussef, A., Chen, W., Zhang, H.,** 2008. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 215-222.
- Rada, V., Nevoral, J., Trojanová, I., Tomanková, E., Šmehilová, M., Killer, J.,** 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in *in vitro* conditions. *Anaerob.* 14, 205-208. Homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe.
- Rada, V., Petr, J.,** 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Vet. Med. - Czech*, 47, 1-4.
- Rada, V., Petr, J.,** 2000. A new selective medium for isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*. 43, 127-132.
- Rahman, H., Chakraborty, A., Rahman, T., Sharma, R., Shorme, B.R., Shakuntala, I.,** 2009. Clostridial myonecrosis clinically resembling black quarter in an Indian elephant (*Elephas maximus*). *Revue scientifique et technique-office international des epizooties*. 28, 1069-1075.
- Rainey, F.A., Hollen, B.J., Small, A.,** 2009. Genus I. *Clostridium* Prazmowski 1880, 23, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 3, The Firmicutes
- Robertfroid, M.B.,** 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 1682S-1687S.
- Rolfe R.D.,** 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*. 130, 396S-402S.
- Roy, D.,** 2001. Media for isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 69, 167-182.
- Russell, D.A., et al.,** 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria, *International Journal of Food Microbiology*. 149, 88-105.
- Scardovi, V.,** 1984. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Kreig, N.R., Holt, J.G., (ed). Baltimore. 1, 1418-1434.

- Shao-yingla, L., et al., 2008.** Isolations of the *Bifidobacterium* from cows and their resistance characteristics to given antibacterial drugs. China dairy industry. S852.6.
- Shome, B.R., et al., 2006.** Atypical blackleg caused by *Clostridium perfringens* type A in cattle in Manipur, India. Indian Journal of Animal Sciences. 76, 353-357.
- Shungu, D.L., Weinberg, E., Gadebusch, H.H., 1983.** In vitro antibacterial activity of norfloxacin (MK-0366, AM-715) and other agents against gastrointestinal tract pathogens. Antimicrobial Agents Chemotherapy 23, 86-90.
- Schroeder, O.B., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wahkamp, J., 2011.** Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. Nature. 469, 419–423.
- Simango, C., Mwakurudza, S., 2008.** *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. International Journal of Food microbiology. 124, 268-270.
- Simpson, P.J., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2004a.** *Bifidobacterium psychroaerophilum* sp. nov., and *Aeriscardovia aerophila* gen., sp. nov., isolated from a porcine caecum. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54, 401-406.
- Simpson, P.J., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., 2004b.** The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal food. Journal of Microbiological Methods. 57, 9-16.
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N., Reddy, B.S., 1997.** *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis. 18, 833–841.
- Snydman, D.R., 2008.** The Safety of Probiotics. Oxford Journals. 46, S104-S111.
- Sutherland, R., Boon, R.J., Griffin, K.E., Masters, P.J., Slocombe, B., White, A.R., 1985.** Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 27, 495-498.

- Szilágyi, A.**, 2002. Lactose -a potential prebiotic. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 16, 1591–1602.
- Talwalkar, A., Kailasapathaty, K.**, 2003. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International dairy Journal*. 14, 143-149.
- Urbášková, P.**, 1997. Rezistence bakterií k antibiotikům-vybrané metody. Nakladatelství Trios. Praha.
- Vaughan, E.E., Heiling, H., Ben-Amor, K., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L.**, 2000. A molecular view of the Intestinal Ecosystems. *Current Issues in Molecular Biology*. 1, 1-12.
- Vlková, E., Nevoral, J., Jenčíková, B., Kopečný, J., Godefrooij, J., Trojanová, I., Rada, V.**, 2005. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. *Journal of microbiological Methods*. 60, 363-373.
- de Vrese, M., Stegalsmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, Ch., Schrezenmeir, J.**, 2001. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 421S-429S.
- Yildirin, Z., Johnson, M.G.**, 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection*. 61, 47-51.
- Zinedine, A., Faid, M.**, 2007. Isolation and Characterization of Strains of Bifidobacteria with Probiotic Proprieties In vitro. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 2, 28-34.