

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Výskyt bifidobakterií v zubním plaku**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Barbora Kliková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

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

**Konzultant: Ing. Hana Salmonová, Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Výskyt bifidobakterií v zubním plaku" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2019 \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala paní prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za odborné vedení při zpracovávání této diplomové práce a paní Ing. Haně Salmonové, Ph.D. za cenné rady a organizaci experimentů v laboratoři. Nemohu však nezmínit ani své rodiče a pana Mgr. Josefa Maška, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali a tímto jim patří moje poděkování. Také bych chtěla zavzpomínat na pana Bc. Jakuba Novotného a ráda bych mu tuto diplomovou práci věnovala.

# Výskyt bifidobakterií v zubním plaku

## Souhrn

Mikrobiota ústní dutiny tvoří její běžnou součást. Je složena zejména z bakteriálních druhů. Její funkce je nezbytná, protože při rovnováze brání kolonizaci vnějších patogenů. Během života může docházet k poruchám nebo změnám mikrobioty ústní dutiny v závislosti na vzniku některých onemocnění. Mikrobiota se začíná rozvíjet během porodu především z porodních cest, mohou ji tak ovlivnit i různé způsoby porodu. Následně dutinu ústní osidlují různé rody jako například *Bifidobacterium*, který produkcí organických kyselin přispívá ke vzniku zubního kazu.

V diplomové práci byla testována hypotéza, zda konzumace fermentovaných mléčných výrobků s obsahem bifidobakterií má vliv na počet laktobacilů a bifidobakterií v zubním plaku. Pro experiment bylo vybráno deset dobrovolníků starších 18 let, z nichž 5 dobrovolníkům byly podávány probiotické kapsle 1krát denně po dobu jednoho týdne. Dalších 5 dobrovolníků konzumovalo 120 g jogurtu s bakteriálním druhem *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM I-2494 1krát denně po dobu jednoho týdne. Vzorky pro analýzu byly odebírány před ranní ústní hygienou. Kultivační metodou byly stanoveny hodnoty bifidobakterií, laktobacilů a celkové počty anaerobních bakterií v zubním plaku před konzumací i po ní.

Po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků s obsahem bifidobakterií byl pozorován větší výskyt průměrných počtů laktobacilů a bifidobakterií v zubním plaku oproti přijímání probiotických kapslí, ale jen u bifidobakterií dosáhl tento nárůst statistické významnosti. Změny v počtech sledovaných skupin bakterií byly u zkoumaných osob velice individuální. V literárních zdrojích se uvádí, že podávání probiotik může přispívat k zlepšení zdraví ústní dutiny. Otázkou zůstává, zda pozitivní účinek probiotik při potlačování patogenů skutečně převažuje nad škodlivostí produkovaných kyselin.

**Klíčová slova:** probiotika; bifidobakterie; mikrobiota ústní dutiny; zubní plak; zubní kaz

# Occurrence of bifidobacteria in dental plaque

## Summary

Microorganisms are commonly found in the oral cavity. Bacteria constitute most of these microorganisms. The presence of microorganisms is necessary, due to the fact that it protects the oral cavity from colonisation of pathogenic mikroorganisms, when it is in balance. Disbalance or changes of microbiota can be caused by some diseases. Microbiota starts to develop during the birth and different ways of birth can influence it. After the birth the oral cavity is collonised by different classes and genera of bacteria, for example by *Bifidobacterium*, which can cause dental plaque due to it's production of acids.

The aim of this diploma thesis was to test how the form of probiotic application influence their counts in dental plaque. Ten adult volunteers participated in the experiment. Five of them consumed probiotic capsules once per day for the time of one week. The other five volunteers consumed 120 g of yoghurt including *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* CNCM I-2494 also once a day for a week. The samples for the analysis were taken in the morning before the dental hygiene. The numbers of bifidobacteria, lactobacilli and the total nubur of bacteria were determined after the cultivation on selective agars. The samples were taken before the consumption, during it and after consumption.

After the consumption of yoghurt containing bifidobacteria the occurance of lactobacilli and bifidobacteria in the dental plaque was higher in comparison to group with probiotic capsules. Differences were significant only for bifidobacteria. The changes of numbers of the observated groups of bacteria were very individual. It can be found in the literary sources, that the consumption of probiotics may improve the health of the oral cavity. The question is, if the positive influence of probiotics caused by reducing the numbers of pathogenic microbiota prevails the harmful effect caused by production of acids by probiotics.

**Keywords:** probiotics; bifidobacteria; microbiota of the oral cavity; dental plaque; dental caries

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Zubní plak</b>	<b>2</b>
2.1.1	Mikrobiota ústní dutiny	2
2.1.1.1	Vývoj mikrobioty	3
2.1.1.2	Bakteriální složení	4
2.1.1.3	Nebakteriální složení	9
<b>2.2</b>	<b>Zubní kaz</b>	<b>10</b>
2.2.1	Sacharidy	11
2.2.2	Čas	11
2.2.3	Zub	12
2.2.4	Ostatní faktory	12
2.2.5	Určení rizika vzniku zubního kazu	13
<b>2.3</b>	<b>Rod <i>Bifidobacterium</i></b>	<b>14</b>
2.3.1	Historie rodu	14
2.3.2	Charakteristika	15
2.3.3	Výskyt	15
<b>2.4</b>	<b>Rod <i>Lactobacillus</i></b>	<b>16</b>
2.4.1	Charakteristika	16
2.4.2	Výskyt	17
<b>2.5</b>	<b>Probiotika</b>	<b>18</b>
2.5.1	Využívané probiotické mikroorganismy	18
2.5.2	Zdravotní přínosy	19
<b>3</b>	<b>Hypotéza</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>23</b>
<b>5.1</b>	<b>Probiotické kapsle</b>	<b>23</b>
<b>5.2</b>	<b>Jogurt s bifidokulturou</b>	<b>23</b>
<b>5.3</b>	<b>Kultivační média</b>	<b>24</b>
<b>5.4</b>	<b>Stanovení bakterií v zubním plaku</b>	<b>25</b>
5.4.1	Před konzumací probiotik	25
5.4.2	Po konzumaci probiotik	27
5.4.3	Kultivace	28
<b>5.5</b>	<b>Vyhodnocení</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Výsledky</b>	<b>29</b>

<b>6.1</b>	<b>Počty bakterií v zubním plaku .....</b>	<b>29</b>
6.1.1	Probiotické kapsle .....	29
6.1.2	Jogurt s bifidokulturou .....	32
6.1.3	Porovnání počtů bakterií.....	34
<b>7</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>41</b>
<b>9</b>	<b>Citovaná literatura.....</b>	<b>42</b>
<b>10</b>	<b>Seznam příloh .....</b>	<b>50</b>

# 1 Úvod

Mikrobiota ústní dutiny představuje bohaté společenství nejen bakteriálních druhů, ale i kvasinek, mikroskopických hub, virů nebo bakteriofágů. Pokud je mikrobiota v rovnováze, dochází k symbióze mezi hostitelem a mikroorganismy, která vede k ochraně lidské ústní dutiny před invazí nežádoucích patogenů.

Naopak poruchy v mikrobiotě způsobují rozvoj orálního onemocnění, kdy může docházet i k tvorbě zubního kazu. Na jehož vzniku nebo progresi se prostřednictvím produkce organických kyselin podílí především rody jako *Streptococcus*, *Lactobacillus* nebo *Bifidobacterium*, přičemž některé druhy těchto rodů jsou často využívány jako probiotické mikroorganismy.



## 2 Literární rešerše

### 2.1 Zubní plak

Na zubech dochází k hromadění velkého množství mikroorganismů a umožňují tak vzniku zubního plaku. Dle Kiliana a kol. (1999) lze zubní plak obecně charakterizovat jako: „*vysoce organizovanou ekologickou jednotku sestávající z velkého množství bakterií usazených v makromolekulární matrix bakteriálního a slinného původu.*“

Zubní plak pevně lpí na povrchu zubu a vytváří žlutobílý mikrobiální povlak, který se často usazuje na místech se sníženou samočisticí schopností chrupu. Nutné je odlišit povrchovou vrstvu od hlubších bakteriálních vrstev. Povrchová vrstva (materia alba) má krémovitou konzistenci bílé barvy v oblasti dásně, krčku zubu a na drsném povrchu zubního kamene. Tvořena je především zbytky potravy, buňkami či mikroorganismy a lze ji odstranit proudem vody (Mutschelknauss, 2002). Naopak hlubší vrstvy zubního plaku nelze odstranit vodou. Pro jejich eliminaci je nutné využít mechanické odstranění. Zubní plak se nemusí usazovat jen na zubním povrchu, ale také může být přítomen na sliznicích nebo na ploškách zubních náhrad (Kilian a kol., 1999).

Bakterie vyskytující se v zubním plaku patří k základním příčinám vzniku zubního kazu nebo parodontitidy (tj. zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubů) (Kilian a kol., 1999). Odhaduje se, že přibližně 20 % až 25 % světové populace trpí onemocněními parodontu, tzn. tkáně obklopující zub, nebo těžkými záněty dásní. Je prokázáno, že zubní kaz je běžný u téměř poloviny světové populace. Na základě zprávy Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2015 většina dospělých a školních dětí je postižena zubním kazem a 5 % až 15 % populace trpí těžkou parodontitidou (Ghaffari et al., 2018).

#### 2.1.1 Mikrobiota ústní dutiny

V 17. století Antoni van Leeuwenhoek provedl výzkum zabývající se přítomností bakterií ve vzorku z ústní dutiny. Pojmenoval mikroby „Dierken“, což v překladu znamená malé živé objekty. Tento objev byl začátkem dalšího zkoumání mikroorganismů (Gao et al., 2018).

Lidská ústní dutina poskytuje přirozené prostředí pro kolonizaci mikroorganismy (Gao et al., 2018). Normální mikrobiota ústní dutiny se skládá především z těch mikroorganismů, které mají schopnost se přichytit na povrch dásní nebo zubů a odolávat tak jejich odstranění.

Neaderentní mikroorganismy jsou odstraněny z úst mechanicky díky žvýkání nebo mluvení a poté jsou zničeny v žaludku. Kolonizaci mikroorganismů v ústní dutině napomáhá snadná dostupnost živin, vhodná teplota a pH (Sharma et al., 2018).

U zdravých jedinců se správnými stravovacími a hygienickými návyky je mikrobiota ústní dutiny v symbióze s hostitelem, zabraňuje kolonizaci cizích patogenů a přispívá k hostitelské fyziologii. Poruchy v mikrobiotě způsobené určitými stresovými faktory např. nadměrnou konzumací sacharidů nebo akumulací zubního plaku, mohou vést k rozvoji orálního onemocnění jako je zubní kaz, periodontitida (tj. zánět v okolí kořene zubu) nebo záněty ústní sliznice (Rosier et al., 2018).

#### 2.1.1.1 Vývoj mikrobioty

Orální prostředí je nejbohatší a nejrozmanitější z hlediska přítomnosti mikroorganismů. V ústní dutině existuje několik odlišných prostředí, ve kterých jsou mikrobiální komunity přítomny. Nedávno publikované zprávy naznačují, že v ústní dutině bylo identifikováno více než 700 druhů a více než 250 z nich bylo popsáno a pojmenováno. Je však zjištěno, že mikrobiota ústní dutiny se skládá nejen z mnoha druhů bakterií, ale také z jiných druhů mikroorganismů včetně bakteriofágů i jiných virů a kvasinek (Mystkowska et al., 2018).

Před narozením dítěte v dutině ústní nebývají přítomny mikroorganismy (Kilian a kol., 1999). Ke kolonizaci dochází během porodu zejména z porodních cest (Li et al., 2018). Existují i studie, že plod obsahuje mikroorganismy (Martin et al., 2016).

Dutinu ústní postupně osidlují druhy jako *Streptococcus salivarius* nebo *Lactobacillus acidophilus*, avšak některé bakteriální druhy se vyskytují pouze přechodně (Kilian a kol., 1999). Existuje totiž konstantní a přechodná mikrobiota, jejíž kvantitativní a kvalitativní složení závisí na mnoha faktorech, jako je ústní hygiena, výživa (včetně složení a konzistence stravy), extrakce zubů, protetické náhrady, zubní a periodontální onemocnění, metabolické nebo rakovinové onemocnění (Mystkowska et al., 2018).

Před prořezáním zubů není mikrobiota ústní dutiny příliš významná, jelikož se mikroorganismy mohou hromadit pouze na epitelu ústní sliznice. Tudíž změna mikrobioty ústní dutiny souvisí s prořezáváním zubů, kdy dochází ke kolonizaci zubního povrchu mikroorganismy, které mohou být potenciálně kariogenní (vyvolávající kaz) (Kilian a kol.,

1999). V tabulce 1 jsou uvedeny změny mikrobioty ústní dutiny v souvislosti s prořezáním zubů.

**Tabulka 1 – Změny mikrobioty ústní dutiny v souvislosti s prořezáním zubů (Kilian a kol., 1999)**

<b>Druh</b>	<b>Kultivace u dítěte bez zubů</b>	<b>Kultivace u dítěte se zuby</b>
<i>Streptococcus mutans</i>	Nezjištěn	Velmi často
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Nezjištěn	Vždy
<i>Bacteroides</i> spp.	Zřídka	Často
<i>Fusobacterium</i> spp.	Zřídka	Často
<i>Actinomyces</i> spp.	Zřídka	Často
<i>Actinomyces viscosus</i>	Nezjištěn	Často

V období puberty přibývá potencionálně patogenních kmenů, což může souviset s hormonálními změnami. Složení mikrobioty ústní dutiny ovlivňuje dostatek ploch pro kolonizaci, které poskytují vhodné podmínky např. pro spirochéty nebo veilonely. Naopak při ztrátě zubů nedochází k osidlování některých kmenů, které předtím byly přítomny (Kilian a kol., 1999).

#### 2.1.1.2 Bakteriální složení

Bakteriální složení v ústní dutině je velmi rozmanité a individuální, přičemž některé bakterie vyskytující se ve slinách přilnou k zubnímu povrchu a iniciují tvorbu zubního biofilmu (Larsen and Fiehn, 2017).

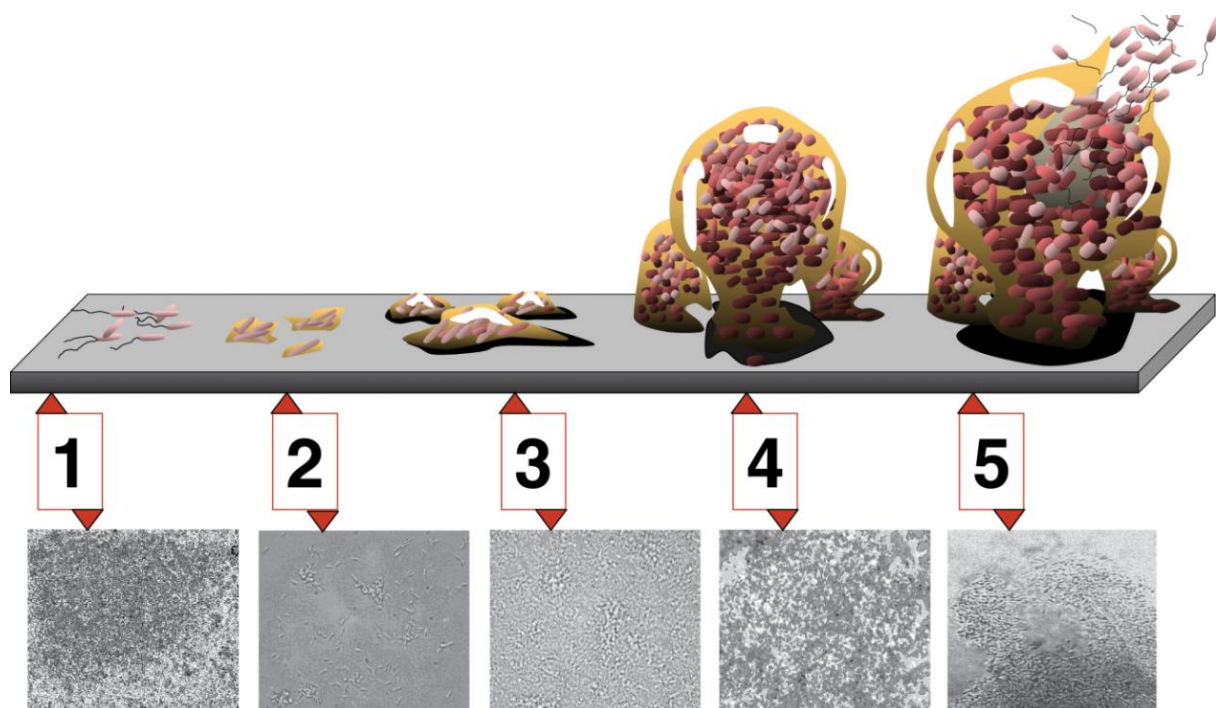
##### 2.1.1.2.1 Biofilm

Zubní biofilm je obecně podobný biofilmům jinde v těle, kde bakterie kolonizují tkáňové povrchy nebo umělé implantáty a jsou zakotveny v jimi produkované extracelulární matrix exopolymerů (polysacharidů a bílkovin) a DNA (Larsen and Fiehn, 2017). Tato matrix je nezbytná pro strukturu, integritu a podílí se na charakteristických vlastnostech biofilmů včetně zvýšené tolerance k antimikrobiálním sloučeninám (Valen and Scheie, 2018).

Zralý zubní biofilm je polymikrobiální povahy, jelikož se může skládat až ze 100 různých druhů mikrobů. V biofilmu dominují bakterie, ale může také obsahovat kvasinky, Protozoa, Archaea a viry. Podle současných poznatků jsou bakterie biofilmu primární příčinou zubních onemocnění (Do et al., 2013).

Přilnutí bakterií na zubní povrch předchází tvorba kondicionačního filmu na čistých zubních površích sestávajících se převážně ze slinných glykoproteinů tzv. získaná pelikula. Poté se první bakterie přichytí na pelikulu zpočátku distančními silami fyzikálně-chemické povahy mezi nabitými molekulami. Následně dochází k silnější adhezenci bakterií k pelikule prostřednictvím receptorů mezi bakteriálními povrchovými adheziny a glykoproteinovými receptory v získané pelikule. Převládající počáteční kolonizátoři jsou orální streptokoky, především *Streptococcus mitis* následovaný grampozitivními bakteriemi, zejména *Actinomyces* spp. Postupně grampozitivní a gramnegativní koky a tyčinky přilnou k ranému grampozitivnímu biofilmu. Tyto bakterie jsou také přítomny ve slinách a mohou pocházet z prohlubní mandlí nebo z papil jazyka. *Fusobacterium* hraje důležitou roli při tvorbě zralého zubního biofilmu, protože tyto bakterie koagují s počátečními grampozitivními bakteriemi a následujícími kolonizátory včetně většiny gramnegativních a pohyblivých bakterií. Složení vyvíjejícího se biofilmu je určeno ekologickými faktory v místě kolonizace, který se výrazně mění na různých površích, a to i u stejného zubu. Pokud je biofilm ponechán nenarušený, vzniká velmi různorodý biofilm. Během vývoje biofilmu jsou bakterie metabolicky aktivní především pomocí endogenních živin ze slin. To vede k tvorbě extracelulární matrix, která přispívá k soudržnosti bakterií na povrchu zubů a poskytuje ochranu biofilmu (Larsen and Fiehn, 2017). Některé bakterie se z biofilmu na určitý impulz odlučují a kolonizují další části dutiny ústní (Schindler, 2001). Na obrázku 1 jsou vyobrazeny fáze vzniku biofilmu.

**Obrázek 1 – 5 fází vzniku biofilmu: 1. Iniciální přilnutí, 2. Ireverzibilní přilnutí, 3. Zrání I, 4. Zrání II, 5. Odlučování bakterií a šíření kolonie (Monroe, 2007)**



Dosavadní znalosti o mikrobiotě zubního biofilmu jsou založeny na studiích provedených kultivačními metodami a molekulárně biologickými metodami. Molekulárně biologické analýzy ukazují, že až dosud bylo detekováno pouze asi 50 % přítomných mikroorganismů v zubním biofilmu za použití tradičních metod kultivace. Bylo prokázáno, že složení zubního biofilmu se liší nejen mezi různými místy v ústní dutině ale také mezi jednotlivci (Larsen and Fiehn, 2017).

Bylo zjištěno, že bakterie jsou schopny komunikovat. Zjednodušeně řečeno je tato komunikace zprostředkována pomocí chemických látek. Bakteriální komunikace probíhá v několika samostatných krocích při formování a zrání biofilmu. V jednom z typů této komunikace je ovlivňována transkripce genů jako odpověď na signální koncentraci, je označována jako „quorum sensing“ komunikace. Koncentrace signálních molekul je závislá na hustotě bakterií (quorum). Slovo quorum se běžně do češtiny překládá jako usnášení schopný počet. Tento český překlad termínu usnadňuje pochopení toho, jak proces quorum sensing u bakterií funguje. Bakterie vylučují chemické látky a ty jsou právě tím signálem, který může ovlivnit transkripci genů. To, že je tato komunikace závislá na hustotě bakterií znamená, že dokud není v blízkém okolí dostatečný počet bakterií (neboli usnášení schopný počet) koncentrace jimi produkovaných chemických látek není dostatečně vysoká a nic se

neděje. Pokud se dostatečně zvýší počet bakterií a tím pádem i koncentrace produkovaných látek, začnou bakterie v tomto okolí reagovat, dojde k „zapnutí“ genů a k transkripci (Valen and Scheie, 2018).

Původně se předpokládalo, že bakteriální komunikace probíhá pouze u několika druhů bakterií. Nicméně se později ukázalo, že je rozšířena napříč všemi druhy. Konkrétní aktivity, které bakteriální komunikace ovlivňuje, jsou například adheze, formování biofilmu, agregace, virulence, pohyblivost, antibiotická rezistence a horizontální přenos genů. Skutečnost, že quorum sensing ovlivňuje tolik zásadních procesů, otevírá možnosti nových strategií léčby bakteriálních onemocnění a to ovlivněním bakteriální komunikace (Valen and Scheie, 2018).

#### 2.1.1.2.2 Interakce

Hlavní skupiny bakterií ve zdravé ústní dutině jsou *Streptococcus* spp., které kolonizují oblasti bohaté na kyslík, z nichž nejběžnější jsou *Streptococcus sanguinis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. pneumoniae* a *S. milleri*. *S. sanguinis* má schopnost vázat se přímo na povrch ústní dutiny a na něj se může poutat řada dalších mikroorganismů, jako je *S. mutans*, který kolonizuje zub, tvoří zubní plak a způsobuje tvorbu zubního kazu a může přispívat ke vzniku periodontálních onemocnění (Mystkowska et al., 2018). Tyto interakce v rámci biofilmu hrají důležitou roli a napomáhají koexistenci různých druhů v orálním prostředí. Bylo zjištěno, že procesy probíhající mezi různými druhy bakterií orálního biofilmu jsou velmi složité a mohou být buď antagonistické, nebo synergické. Předpokládá se, že *S. gordonii* hraje roli při potlačování vzniku či rozvoje zubního plaku kvůli své schopnosti produkovat peroxid vodíku, který je pro bakterie toxický. Dalším důležitým druhem spojeným s biofilmem je *Actinomyces neaslundii*, který odstraňuje peroxid vodíku a napomáhá růstu *S. gordonii*. Na druhou stranu peroxid vodíku produkovaný *S. gordonii* je fatální pro růst *A. neaslundii*. Obdobné interakce byly zjištěny u *Fusobacterium nucleatum* a *Streptococcus cristatus*, kde první jmenovaný pomáhá úspěšné kolonizaci epiteliálních buněk druhem *Streptococcus cristatus*. Nicméně *S. cristatus* oslabuje *F. nucleatum* řízenou expresí cytokinů v epiteliálních buňkách. Studium takových interakcí by mohlo pomoci při navrhování strategií prevence, diagnostiky a léčby některých běžně se vyskytujících onemocněních (Sharma et al., 2018). Nejpočetnější bakterie tvořící mikrobiotu ústní dutiny jsou znázorněny v tabulce 2, která zahrnuje i rod *Bifidobacterium*, jelikož patří do kmene Actinobacteria.

**Tabulka 2 – Bakterie vyskytující se v ústní dutině (Mystkowska et al., 2018; Sharma et al., 2018)**

<b>Nejpočetnější bakterie ústní dutiny</b>	
Sliny	Actinobacteria, <i>Bacteroides</i> , Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes
Zubní plak	Firmicutes, Actinobacteria
Ústní sliznice	<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Rothia mucilaginosa</i> , <i>Eubacterium strain</i>
Mandle	Firmicutes, <i>Fusobacterium</i> , <i>Mogibacterium</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i>
Jícen	<i>Actinomyces</i> , Firmicutes, <i>Fusobacterium</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Streptococcus</i>
Jazyk	Actinomycetales, Bacilli, <i>Fusobacterium</i> , Lactobacillales, <i>Prevotella</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Treponema</i> , Clostridiales, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Chlorobi, <i>Treponema denticola</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Porphyromonas endodontalis</i>
<b>Onemocnění ústní dutiny a bakterie je způsobující</b>	
Zubní kaz	<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Thiomonas</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Pseudoramibacter</i> , <i>Selenomonas</i>
Onemocnění parodontu tzn. tkáň obklopující zub	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria, <i>Olsenella uli</i> , <i>Prevotella baroniae</i> , <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Propionibacterium propionicum</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella oralis</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Tannerella forsythia</i>
Zánět dásní nebo ozubice (tj.	Actinomycetes, <i>Capnocytophaga</i> , <i>Campylobacter</i> ,

vazivová tkáň upevňující zub v zubním lůžku)	<i>Eikenella, Fusobacterium, Prevotella, Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Tannerella forsythia, Bacteroidetes, Eubacterium saphenum, Porphyromonas endodontalis, Prevotella denticola, Parvimonas micra, Peptostreptococcus spp., Filifactor alocis, Desulfobulbus spp., Dialister spp., Synergistetes</i>
Zápach z úst (halitóza)	<i>Solobacterium moorei, Atopobium parvulum, Eubacterium sulci</i>

### 2.1.1.3 Nebakteriální složení

V ústní dutině se vyskytují kromě bakterií i další formy mikroorganismů, jako jsou prvoci, mikroskopické houby nebo viry. Předpokládá se, že prvotní populace je hlavně saprofytická a nejčastěji byla objevena *Entamoeba gingivalis* a *Trichomonas tenax*. Přítomnost *E. gingivalis* byla ve vyšších počtech hlášena u parodontálně nemocných, což naznačuje některé spojitosti s jinými druhy nalezenými na těchto místech (Sharma et al., 2018).

Patogenní kvasinky *Candida* spp., zejména *Candida albicans*, jsou v ústní dutině zcela běžné. Byly nalezeny na povrchu zubů, zubní protetice, ortodontickém zařízení a v zubním plaku (Mystkowska et al., 2018). Mohou být zodpovědné za různé ústní infekce. Jakmile jsou kultivovány na pevných plochách, mohou biofilmy *C. albicans* napadnout přilehlé buňky (Sharma et al., 2018). Ghannoum et al. (2010) uvádí 85 druhů mikroskopických hub v nezávislých studiích provedených na 20 zdravých hostitelích. K hlavním druhům, které byly pozorovány, patří *Candida, Cladosporium, Aureobasidium, Saccharomycetales, Aspergillus, Fusarium* a *Cryptococcus* (Ghannoum et al., 2010).

V ústní dutině a zubním plaku byly nalezeny také viry v aktivní i latentní formě, které byly zodpovědné za širokou škálu onemocnění dutiny ústní a přidružených orgánů (Sharma et al., 2018). Podle studie Wanga et al. (2016) bylo nalezeno několik bakteriofágů ze vzorků zubních plaků, jednalo se zejména o fágy bakterií rodů *Cornebacterium, Lactococcus, Pseudomonas* patřící do čeledi *Siphoviridae, Myoviridae* a *Podoviridae*. Během analýzy několika kolonií bakteriofágů bylo zjištěno, že přítomnost bakteriofágů v ústní dutině je vysoce individuální a druhově specifická, podobně jako je vysoce individuální přítomnost



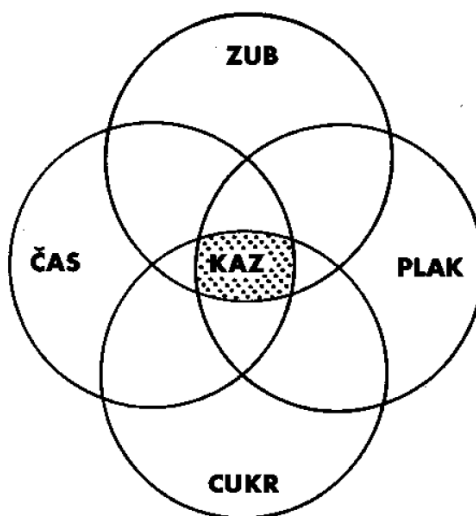
konkrétních druhů bakterií. Bakteriofágy ovlivňují metabolismus bakterií, a proto jsou také spojeny s určitými nemocemi např. endokarditidou (Sharma et al., 2018). Ly et al. (2014) uvádí, že role některých virů na patogenní vlastnosti jejich hostitelských bakterií je natolik významná, že jejich přítomnost může způsobit, že pak budou patogenní bakterie, které běžně v daném prostředí patogenní nejsou. Některá virová onemocnění se mohou společně s bakteriemi podílet na vzniku onemocnění v ústní dutině. Například herpes viry se společně s bakteriemi mohou podílet na vzniku periodontitidy (Ly et al., 2014).

## 2.2 Zubní kaz

Zubní kazy jsou progresivní nevratné procesy mikrobiálního původu postihující tvrdé zubní tkáň (Al Ayyan et al., 2018). Stále zůstávají jedním z nejběžnějších onemocnění, ačkoliv jejich prevalence v západních zemích v posledních letech klesla. Toto onemocnění je vyvoláváno působením kariogenních mikroorganismů (zejména streptokoků a laktobacilů) v delším časovém období. Vzniku kazu také napomáhá strava bohatá na sacharidy. Vliv na vznik kazu může mít i míra sekrece slin a jejich pufrací kapacita (Cagetti et al., 2013). Existují dvě skupiny streptokoků. První z nich se nazývá tzv. mutantní, kam se řadí především *S. mutans*, ale patří sem i další druhy streptokoků, konkrétně se jedná o *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. ferus* a *S. macacae* (Lee et al., 2011). Druhá skupina zahrnuje ostatní streptokoky tzv. nemutantní, které spolu s aktinomycetami byly dlouhé roky považovány za hlavní patogeny podílející se na vzniku zubního kazu. V posledních letech se ale rozšiřuje názor, že dominantními činiteli při vzniku zubního kazu jsou hlavně mutantní streptokoky, ale i bakterie jako například laktobacily a bifidobakterie (Cagetti et al., 2013).

Při časté konzumaci sladkých jídel a nápojů dochází ke vzrůstu počtu acidogenních (tvořící kyseliny) a acidorezistentních (tolerující nízké pH) kmenů v ústí dutině. To následně časem vede k posunu demineralizačně/remineralizační rovnováhy směrem ke ztrátě minerálů a důsledkem toho je vznik zubního kazu. Preventivní opatření proti vzniku zubního kazu jsou založena na dietních změnách, jako jsou snížení příjmu sladkých jídel a zvýšení odolnosti pacienta vůči zubnímu kazu. Někdy je doporučováno použití antibakteriálních látek za účelem snížení kariogenní mikrobioty, ačkoliv prakticky nelze dosáhnout úplné eradikace bakteriálních kmenů spojených se vznikem zubního kazu (Cagetti et al., 2013). Hlavní faktory, které se podílejí na vzniku zubního kazu, jsou vyobrazeny na obrázku 2.

**Obrázek 2 – Faktory, které se podílejí na vzniku zubního kazu (Kilian a kol., 1999)**



### **2.2.1 Sacharidy**

Důležité postavení v roli vzniku zubního kazu má mezi sacharidy sacharóza, jelikož je substrátem pro tvorbu extracelulárních polysacharidů, které slouží jako ideální prostředí pro rozvoj mikroorganismů. Bakterie v plaku metabolizují fermentovatelné sacharidy. Jejich katabolickým rozkladem vznikají organické kyseliny. Tyto kyseliny způsobují pokles pH uvnitř biofilmu, poté může docházet k odvápnování tvrdých zubních tkání a ke vzniku zubního kazu (Kilian a kol., 1999).

Kariogenní působení sacharidů závisí na celkovém příjmu potravou, na formě a frekvenci příjmu daného sacharidu (Kilian a kol., 1999).

### **2.2.2 Čas**

Zubní kaz se nestává klinicky zjevný okamžitě. Bakterie se tvoří postupně během 24 až 48 hodin a tím vytvářejí zubní plak. Následně jsou schopny produkovat kyseliny, enzymy a toxiny, které napomáhají rozvoji zubního kazu (Kilian a kol., 1999).

### 2.2.3 Zub

Vnímavost zubní tkáně vůči kazu ovlivňují určité faktory, jako jsou nutriční, rasové, konstituční, klimatické, celkový zdravotní stav nebo dědičnost. Přičemž přímý vztah dědičnosti a vzniku samotného zubního kazu nebyl prokázán. Dědí se více či méně odolná zubní tkáň, anatomické uspořádání zubů, postavení zubů, různé anomálie nebo tvar zubní korunky. Určitá místa jsou více náchylná k zubnímu kazu. Tato místa mohou být označována jako habituálně nečistá místa kvůli své nedokonalé samočišticí schopnosti (Kilian a kol., 1999).

Pro zdravé zuby a odolnou zubní tkáň je nutný normální a nenarušený vývoj organismu. Proto je důležitá vhodně volená výživa s dostatečným a vyváženým přísunem základních živin. I když nebyl podán nezvratný důkaz o tom, že dokonale vyvážená strava v období, kdy se zuby vyvíjejí, by zajistila vysoce odolnou zubní tkáň. Je však prokázán příznivý vliv prvku fluoru na odolnost zubní tkáně vůči kazu (Kilian a kol., 1999).

Fluoridy snižují vnímavost zubní tkáně vůči kazu a mohou být aplikovány systémově nebo místně. Před začátkem fluoridace by mělo dojít ke zjištění příjmu fluoridů potravou, protože nadměrný příjem fluoridů může vést ke skvrnitě sklovině (Kilian a kol., 1999).

### 2.2.4 Ostatní faktory

Kazy mají negativní dopad na obecné zdraví a kvalitu života jednotlivců. Bolest, namáhání žvýkacích svalů, prodloužení pracovní neschopnosti, změna stravy, neestetický vzhled a omezení sociálních aktivit jsou přímými i nepřímými důsledky zubního kazu (Tikhonova et al., 2018).

Vysoká prevalence zubního kazu v určitých skupinách společnosti zdůrazňuje potřebu vyvinout nové strategie v oblasti prevence zubního kazu (Kay and Locker, 1996). V této souvislosti několik výzkumných skupin navrhlo hloubkové vyšetřování psychosociálních a psychologických problémů. Objevují se některé vznikající důkazy, že stres by mohl mít potenciální roli při onemocnění zubního kazu (Finlayson et al., 2010). Souvislost mezi kazem a stresem lze vysvětlit různými způsoby. Některé z nich zahrnují změny v životním stylu a nezdravé chování (např. nadměrný příjem cukru, zanedbání ústní hygieny), jiné se zaměřují na změnu složení slin vyvolané stresem (Tikhonova et al., 2018).

Stres může být definován jako skutečné ohrožení pro fyziologickou nebo psychologickou integritu jedince, který vede ke kaskádě fyziologických nebo behaviorálních

reakcí pro udržení homeostázy. Existuje široce uznávaná teorie alostatické zátěže, která vysvětluje účinky stresu na lidské tělo. Při chronickém vystavení stresovým podmínkám se akumuluje „opotřebením“ alostatických systémů (centrální nervová soustava (CNS), autonomní nervová soustava (ANS), systém hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA)). Časem se stává systém ANS a HPA neregulovatelný. Nadměrná sekrece hormonu kortizolu stimuluje glukokortikoidní receptory v těle a mění funkci určitých neurotransmiterů např. adrenalinu, noradrenalinu nebo serotoninu, které mohou ovlivnit CNS, emoční a kognitivní funkce i metabolický a imunitní systém (McEwen and Gianaros, 2011).

Sliny udržují homeostázu ústní dutiny prostřednictvím různých funkcí např. zachování stálosti integrity zubů či antimikrobiální aktivity. Slinné bílkoviny a peptidy hrají důležitou roli v adhezi ústních mikroorganismů na povrch zubu a při udržení rovnováhy mezi remineralizačními a demineralizačními procesy. Inervace a sekrece slinných žláz jsou regulovány systémem ANS, který naopak ovlivňuje koncentraci slinných bílkovin a průtok slin. Za opakujících se chronických stresových podmínek může být funkce systému ANS změněna a následně i funkce slinných žláz, což by mohlo zvýšit riziko zubního kazu. Úroveň hladiny kortizolu ve slinách byla uznána jako platná míra aktivního volného kortizolu, který je potencionálním biomarkerem stresu. Mnoho korelačních studií ukázalo pozitivní spojení kortizolu s chronickými onemocněními, jako jsou periodontální onemocnění, diabetes, kardiovaskulární onemocnění a zubní kaz (Tikhonova et al., 2018).

### **2.2.5 Určení rizika vzniku zubního kazu**

Pro určení rizika vzniku zubního kazu je nutno provést klinické vyšetření, které zahrnuje znalost podrobné anamnézy, kazivosti zubů rodičů i sourozenců a stravovacích návyků s ohledem na příjem sacharidů během dne. Následně je důležité zaznamenávat počet a vývoj nových kazů v určitém časovém období. Vedle uvedeného klinického vyšetření se používají i screeningové testovací metody zahrnující mikrobiologické testy, určení pH slin a stanovení kumulace plaku za 24 hodin, která se stanovuje na předem odborně vyčištěném chrupu (Kilian a kol., 1999).

Mikrobiologické testy se uplatňují při zjišťování koncentrace kariogenních mikroorganismů ve slinách, především *Streptococcus mutans* a *Lactobacillus acidophilus* (Kilian a kol., 1999). Přičemž *Streptococcus mutans* je považován za mikroorganismus, který způsobuje vznik zubního kazu (Bafna et al., 2018), zatímco *Lactobacillus acidophilus* je zodpovědný za progresi kazu a jeho vyšší výskyt naznačuje častější příjem sacharidů během

dne (Merglová, 2008). Zvýšené riziko vzniku zubního kazu je signalizováno počtem 100 000 a více mikroorganismů jednoho nebo obou z výše uvedených druhů v 1 ml sliny, avšak není vždy možné potvrdit vzájemný vztah mezi kazem a zjištěnými hodnotami mikroorganismů. Jelikož u některých pacientů byla nalezena vysoká kazivost v přítomnosti nízké koncentrace mikroorganismů nebo naopak (Kilian a kol., 1999).

Optimální pH v ústní dutině se pohybuje v rozmezí 6,0–7,5. Při stanovení pH se určuje míra a doba trvání nízkých hodnot pod 5,5, kdy převažuje demineralizace skloviny. Naopak pokud dojde ke zvýšení pH na povrchu zubu, mohou se minerály ukládat zpět do zubní tkáně a dochází k remineralizaci (Roubalíková, 2007). Hodnota pH je ovlivněna např. obsahem sacharidů, minerálů nebo slinných proteinů. Měření musí být prováděno opakovaně z důvodu proměnlivosti v čase. Pro určení vzniku rizika zubního kazu je však nutné porovnat výsledky pH s ostatními faktory (Kilian a kol., 1999).

V rámci této práce jsem se podrobněji zabývala rodem *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, protože jsem dobrovolníkům podávala fermentované mléčné výrobky nebo probiotické kapsle obsahující oba tyto bakteriální rody.

## 2.3 Rod *Bifidobacterium*

Doména: Bacteria

Kmen: Actinobacteria

Třída: Actinobacteria

Řád: Bifidobacteriales

Čeleď: *Bifidobacteriaceae*

Rod: *Bifidobacterium* (Barka et al., 2015)

### 2.3.1 Historie rodu

V roce 1899 Tissier izoloval ze stolice kojenců bakterie s charakteristickým tvarem „Y“ a pojmenoval je *Bacillus bifidus*. Popsal, že tyto bakterie během růstu nevytvářely plyn, byly anaerobní a grampozitivní. V roce 1917 je Winslow zařadil do čeledi *Lactobacillaceae* a o tři roky později je Holland nazval *Lactobacillus bifidus*. Ačkoliv roku 1924 Orla-Jensen navrhl pro tyto bakterie samostatný rod *Bifidobacterium*, kvůli podobnosti s laktobacily byly však bifidobakterie dlouho řazeny do rodu *Lactobacillus*. Teprve v 8. vydání Bergey's

Manual of Determinative Bacteriology z roku 1974 byl poprvé vytvořen samostatný rod *Bifidobacterium* (Biavati et al., 2000).

### 2.3.2 Charakteristika

*Bifidobacterium* je rod striktně anaerobních, grampozitivních, nepohyblivých, nesporulujících tyčinek, které se někdy na konci větví (Bednář a kol., 1996). Mohou se vyskytovat jednotlivě, v řetězcích nebo ve shlucích. Bifidobakterie jsou chemoorganotrofní a mají fermentativní typ metabolismu. Ve většině případů jsou kataláza negativní. Vyznačují se vysokým obsahem guaninu a cytosinu v genomu, který se pohybuje od 42 mol% do 62 mol% (Biavati et al., 2000).

Optimální teplota pro jejich růst je 37–41 °C, avšak minimální teplota pro růst se může pohybovat v rozmezí 25–28 °C a maximální teplota 43–45 °C. Bifidobakterie jsou do určité míry tolerantní vůči kyselému prostředí. Optimální pH je mezi 6,5 až 7,0, přičemž pod pH 4,5 nebyl zaznamenán růst žádného druhu (Biavati et al., 2000).

Bifidobakterie přeměňují glukózu procesem fermentace, kdy dochází k produkci kyseliny mléčné a kyseliny octové v poměru 2:3 (Biavati et al., 2000) a spolu s dalšími bakteriemi čeledi *Bifidobacteriaceae* štěpí hexózy prostřednictvím specifického enzymu fruktóza-6-fosfát-fosfoketolaza (EC 4.1.2.22). Tento enzym je využíván při rodové identifikaci bifidobakterií (Vlková et al., 2005).

### 2.3.3 Výskyt

Bifidobakterie jsou obecně součástí zdravého gastrointestinálního traktu lidí a zvířat, ale mohou být také přítomny v jiných ekologických systémech, jako je střevní trakt hmyzu, v odpadních vodách a v potravinách (Mahlen and Clarridge, 2009).

Vzhledem k tomu, že určité druhy bifidobakterií jsou využívány jako probiotika, která jsou důležitá pro lidské zdraví, byly bifidobakterie dlouho považovány za nepatogenní. Jenomže tři druhy bifidobakterií jako je *B. dentium*, *B. inopinatum* a *B. denticolens* byly nalezeny v zubním kazu, některé z nich i ve slinách nebo v zubním plaku a *B. dentium* může skutečně působit jako patogen. Popis druhu *B. dentium* pochází z roku 1974, ale některé kmeny bifidobakterií, které byly následně identifikovány jako *B. dentium*, byly popsány již v roce 1957 Beerensem (Modesto et al., 2006). Ve studii Haukioja et al. (2010) byly uvedeny

další druhy bifidobakterií vyskytující se ve vzorcích z ústní dutiny, jednalo se o *B. bifidum* a *B. longum*.

V další studii týkající se přítomnosti bifidobakterií v zubním kazu byly popsány již zmíněné dva nové druhy *B. inopinatum* a *B. denticolens* (Crociani et al., 1996). Následně byly tyto dva druhy překvalifikovány na základě sekvence 16S rRNA a sekvence genu kódujícího heat shock protein 60 (Jian and Dong, 2002) do dvou nových rodů nazvaných *Scardovia inopinata* (*B. inopinatum*) a *Parascardovia denticolens* (*B. denticolens*) (Modesto et al., 2006). Rod *Scardovia* neobsahuje pouze jednoho zástupce, jako je tomu u rodu *Parascardovia*, jelikož v roce 2011 byl popsán jeho další druh a to *S. wiggisiae*, který byl také izolován z lidské ústní dutiny (Downes et al., 2011).

Jiné studie se zabývaly detekcí čeledi *Bifidobacteriaceae*, takovým příkladem může být izolace *Alloscardovia omnicoles* ze vzorku ústní dutiny a mandlí (Huys et al., 2007). Následující studie se nezaobíraly lidskými vzorky. V roce 2017 byl uveden druh předešlého rodu *Alloscardovia venturai*, který byl detekován z ústní dutiny morčete domácího (Sechovcová et al., 2017). Okamoto et al. (2007; 2008) izolovali *Metascardovia criceti* a *Bifidobacterium tsurumiens* ze zubního plaku křečků zlatých, jejichž strava obsahovala velké množství sacharidů.

## 2.4 Rod *Lactobacillus*

Doména: Bacteria

Kmen: Firmicutes

Třída: Bacilli

Řád: Lactobacillales

Čeď: *Lactobacillaceae*

Rod: *Lactobacillus* (Galperin, 2013)

### 2.4.1 Charakteristika

*Lactobacillus* je rod fakultativně anaerobních, grampozitivních, nesporulujících, nepohyblivých tyčinek (Bednář, 1996). Řadí se mezi bakterie mléčného kvašení vyznačující se nízkým procentuálním obsahem guaninu a cytosinu v genomu. Jsou schopny růstu v teplotním rozmezí 2–53 °C, jejich optimální teplota je mezi 30–40 °C. Mají fermentativní typ metabolismu a jsou chemoorganotrofní. Většina z nich vykazuje negativní katalázu

a optimální pH se obvykle pohybuje mezi 5,5–6,2. Rychlost růstu bývá často snížena v neutrálním nebo zpočátku alkalickém prostředí (Hammes and Hertel, 2003).

Laktobacily lze dělit do následujících skupin (Jay, 1997):

- Obligátně homofermentativní laktobacily, jejímž konečným produktem fermentace hexóz je kyselina mléčná (např. *L. acidophilus*)
- Fakultativně heterofermentativní laktobacily, jejímž konečným produktem fermentace hexóz je kyselina mléčná a v případě pentóz je to kyselina mléčná, kyselina octová, ethanol a CO<sub>2</sub> (např. *L. casei*)
- Obligátně heterofermentativní laktobacily produkující kyselinu mléčnou (50 %), kyselinu octovou, ethanol a CO<sub>2</sub> (např. *L. kefir*)

#### 2.4.2 Výskyt

Laktobacily se vyskytují v dutině ústní a přispívají ke vzniku zubního kazu. Dominantními druhy spojené se zubními kazy nalezené u dětí i dospělých jsou *L. acidophilus* (Kilian a kol., 1999), *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. casei/paracasei*, *L. salivarius* (Caufield et al., 2015), *L. delbrueckii*, *L. gallinarium* (Byun et al., 2004), *L. brevis*, *L. jensenii* (Smith et al., 2001), *L. plantarum*, *L. oris* a *L. vaginalis*. V menší míře byly zastoupeny *L. mucosae*, *L. crispatus*, *L. ultunesis*, *L. reuteri*, *L. gastricus* a *L. parabuchneri*. Většina druhů laktobacilů byly přítomné v zubním kazu spolu s dalšími laktobacily, avšak *L. fermentum*, *L. casei/paracasei* a *L. salivarius* byly nalezeny samostatně (Caufield et al., 2015).

Některé druhy laktobacilů se využívají při konzervaci zeleniny (zelí nebo okurek) a krmiv. Vyskytují se v mléce a v mléčném průmyslu se používají jako startovací kultury nebo při výrobě jogurtů např. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Takové potraviny jsou doporučeny především pacientům po užívání antibiotik nebo trpícím střevní dysmikrobií (Bednář a kol., 1996), jelikož laktobacily jsou přirozenou součástí mikrobioty trávicího traktu živočichů (Prakash et al., 2011).

Laktobacily tvoří také hlavní součást slizniční mikrobioty vagíny žen, kde fermentují glykogen na kyselinu mléčnou, která poté zajišťuje fyziologické nízké pH. Tato skupina bakterií bývá často nazývána *Lactobacillus vaginalis Döderleini*. Vaginální sekret obsahuje



$10^7$ – $10^9$  KTJ/g (kolonie tvořící jednotky na gram) laktobacilů, konkrétně jde například o druhy *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* a *L. vaginalis* (Koliba, 2012). Nízké pH je podstatné pro ochranu sliznice před osídlením jiných mikroorganismů (Bednář a kol., 1996). Laktobacily působí vůči patogenním mikroorganismům různými mechanismy jako např. vyloučením patogenů z receptorů na povrchu epitelu, koagulací s některými bakteriemi nebo produkcí bakteriocinů, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> či jiných biologicky aktivních látek, které brání růstu ostatních bakterií (Koliba, 2012).

## 2.5 Probiotika

WHO definuje probiotika jako živé mikroorganismy, které při podání v přiměřené dávce, představují zdravotní přínos pro pacienta (WHO, 2002). Tyto mikroorganismy jsou součástí přirozené mikrobioty a pokud jsou podávány, musí být aplikovány v takové formě, aby přežily transport do tlustého střeva (Cagetti et al., 2013).

### 2.5.1 Využívané probiotické mikroorganismy

Některé z běžně používaných probiotických mikroorganismů jsou *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, bifidobakterie, některé enterokoky, zejména *Enterococcus faecium* a kvasinky *Saccharomyces boulardii*. Mohou se používat i některé sporulující druhy bakterií, zejména se jedná o rod *Bacillus* (Kerry et al., 2018).

Probiotika se přidávají do potravin zejména do fermentovaných mléčných i nemléčných výrobků, ale jsou i součástí potravních doplňků nebo kojeneckých náhrad. (Pandey et al., 2015). Aktuální seznam mikroorganismů, které jsou nejčastěji používány jako probiotika, jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 3 – Využívané probiotické mikroorganismy (Kerry et al., 2018)**

Probiotické mikroorganismy		
Rod	Druh	Reference
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Dixit et al. (2016)

<i>Propionibacterium</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i>	Dixit et al. (2016)
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. productus</i>	Dixit et al. (2016)
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i>	Nguyen et al. (2016)
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>	Eid et al. (2016)
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>	Kechagia et al. (2013)
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Sornplang and Piyadeatsoontorn (2016)
<i>Streptococcus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>	Arora et al. (2013)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i>	Westermann et al. (2016)
<i>Bacteroides</i>	<i>B. uniformis</i>	Kobyliak et al. (2016)
<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i>	Kobyliak et al. (2016)
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>	Chen et al. (2013)

### 2.5.2 Zdravotní přínosy

Nejdůležitější příznivé účinky probiotik zahrnují prevenci proti průjmům, zácpě, změnám v konjugaci žlučových solí, zesílení anti-bakteriální a protizánětlivé odpovědi organismu. Dále přispívají k syntéze živin a zlepšují jejich biologickou dostupnost. Je známo, že některá probiotika mají biologickou aktivitu i při použití ve formě intaktních buněk a lyzátů. Probiotika také prokázala účinky při zmírnění příznaků alergie, rakoviny, AIDS, infekcí dýchacích a močových cest (Harish and Varghese, 2006).

Existují i zprávy o jejich příznivých účincích na stárnutí, únavu, autismus, osteoporózu, obezitu a diabetes 2. typu. Lze předpokládat, že řada mechanismů je spojena s probiotickými příznivými účinky (Harish and Varghese, 2006; Pandey et al., 2015):

- Tvorba inhibičních látek jako je peroxid vodíku, bakteriociny, organické kyseliny atd.
- Blokování adhezních míst pro patogenní bakterie

- Kompetice s patogenními bakteriemi o živiny
- Degradace toxinů a blokování receptorů
- Modulace imunitní odpovědi

Některé přehledové články informují o studiích zkoumající užívání probiotických kmenů za účelem prevence onemocnění ústní dutiny včetně zubního kazu (Saha et al., 2012). Probiotika jsou podávána ke zvýšení počtu nebo obnovení přirozeně se vyskytující saprofytické mikrobioty, která působí proti invazi patogenů. Právě tyto patogeny jsou hlavními původci četných onemocnění ústní dutiny (paradontitidy a zubního kazu). Probiotika podávaná pro takovou orální léčbu jsou mikroorganismy většinou užívané k působení v gastrointestinální oblasti, a proto nemusejí být ideální pro orální prostředí, které je značně odlišné od toho gastrointestinálního (Cagetti et al., 2013).

Ve studii Villavicencio et al. (2018) bylo 3–4 letým dětem podáváno mléko s probiotickými bakteriemi a kontrolní skupina konzumovala mléko bez probiotik. Výzkum probíhal v Kolumbii a zúčastnilo se ho 363 předškolních dětí, které denně po dobu devíti měsíců užívaly 200 ml mléka obsahujícího *Lactobacillus rhamnosus*  $5 \cdot 10^6$  KTJ a *Bifidobacterium longum*  $3 \cdot 10^6$  KTJ. U této skupiny dobrovolníků byl po devíti měsících konzumace mléka zaznamenán pokles počtu *Streptococcus mutans* oproti kontrolní skupině, nicméně tento pokles nebyl statisticky významný. Na druhou stranu byly statisticky významné rozdíly v hodnotách počtu *Lactobacillus* spp. Konkrétně byl počet *Lactobacillus* spp. u kontrolní skupiny  $7,03 \cdot 10^5 \pm 7,00 \cdot 10^5$  KTJ/ml a u skupiny užívající mléko s probiotickými bakteriemi to bylo  $4,78 \cdot 10^5 \pm 4,15 \cdot 10^5$  KTJ/ml. Před konzumací mléka byly hodnoty počtu *Lactobacillus* spp.  $6,53 \cdot 10^5 \pm 5,51 \cdot 10^5$  KTJ/ml u skupiny, která poté začala užívat probiotika, a u kontrolní skupiny byl počet *Lactobacillus* spp. před zahájením experimentu  $5,87 \cdot 10^5 \pm 4,74 \cdot 10^5$  KTJ/ml. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v prevalenci zubního kazu. Denní konzumace mléka obsahujícího *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium longum* tedy v této studii snižovala počty bakterií *Lactobacillus* spp. a zvyšovala pufrační kapacitu slin u předškolních dětí (Villavicencio et al., 2018).

Toivianinen et al. (2015) uvádí studii, která měla za cíl zhodnotit účinek perorálně podávaného druhu *Lactobacillus rhamnosus* GG a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 na počet mutantních streptokoků a orální mikrobiotu zdravého dospělého člověka. Byla provedena randomizovaná dvojitě zaslepená studie, kde zdraví dobrovolníci užívali pastilky

s obsahem probiotik nebo přijímali pastilky bez přidaných probiotik po dobu 4 týdnů. V této studii nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny ve složení mikrobioty ústní dutiny (Toiviainen et al., 2015).

Hlavním cílem takových studií bylo použití probiotik při prevenci zubního kazu nahrazením kariogenních bakterií zejména mutantních streptokoků za příznivé bakterie. Výsledky popsané různými výzkumnými skupinami byly v některých případech pozitivní, ale i přesto nejsou žádné vědecky nezvratné důkazy, které by prokázaly jasné závěry (Cagetti et al., 2013).

### **3 Hypotéza**

Bifidobakterie se obecně považují za zdraví prospěšné nepatogenní bakterie a jsou často využívány jako probiotika ve výživě lidí. Negativně mohou působit jako součást mikrobioty zubního plaku, kdy produkcí organických kyselin přispívají ke vzniku zubního kazu. Předpokládáme, že pokud budou bifidobakterie a laktobacily přijímány ve formě fermentovaných mléčných výrobků, dojde k zvýšení jejich počtu v zubním plaku.

### **4 Cíl práce**

Cílem diplomové práce bylo experimentálně ověřit, zda konzumace fermentovaných mléčných výrobků s obsahem bifidobakterií a laktobacilů má vliv na jejich počet v zubním plaku v porovnání s přijímáním probiotik ve formě kapslí.

## 5 Materiál a metody

Experimentu se účastnilo deset dospělých dobrovolníků, kterým byly kultivačně stanoveny počty bifidobakterií a laktobacilů v zubním plaku. Dobrovolníci byli rozděleni do dvou skupin, z nichž první skupina pěti dobrovolníků pravidelně 1krát denně konzumovala mléčný výrobek s obsahem bifidobakterií po dobu jednoho týdne. Druhá skupina pěti dobrovolníků přijímala 1krát denně bifidobakterie ve formě kapslí po dobu jednoho týdne. Pro stanovení bakterií byly odebrány vzorky zubního plaku před konzumací probiotik, následně 7., 10. a 14. den od prvního podávání probiotik.

### 5.1 Probiotické kapsle

Denní dávka (2 kapsle) obsahovala  $20 \cdot 10^9$  KTJ probiotického komplexu (2016) (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Streptococcus thermophilus*), 240 mg fruktooligosacharidů, kyselinu L-askorbovou, stearan hořečnatý, želatinu a barvivo E171 (oxid titaničitý) (2018). Obsah bakterií ve výrobku byl kultivačně ověřen.

### 5.2 Jogurt s bifidokulturou

Podle vyhlášky č. 397/2016 Sb., kterou se mění vyhláška č. 77/2003 Sb., se stanovují požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. V jogurtu včetně jogurtového mléka musí být protosymbiotická směs *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v počtu minimálně  $10^7$  KTJ/ml a u kysaných mléčných výrobků s bifidokulturou nesmí být obsah *Bifidobacterium* sp. nižší než  $10^6$  KTJ/ml v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného kvašení (2016).

Pro experiment byly použity jogurty (120 g), které obsahovaly jogurtové kultury druhu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* v počtu minimálně  $4 \cdot 10^9/100$  g (2017).

### 5.3 Kultivační média

Pro stanovení laktobacilů, bifidobakterií a celkového počtu anaerobních bakterií v zubním plaku byla předem připravena 3 různá kultivační média. Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) s přidavkem sojového peptonu (5 g/l) byl použit pro kultivaci celkového počtu anaerobních bakterií (Vlková a Rada, 2013). Složení tohoto média je znázorněno v tabulce 4.

**Tabulka 4 – Složení Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid) (Vlková a Rada, 2013)**

Látka	Množství
Trypton	10 g
Pepton želatiny	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukosa	1 g
Chlorid sodný	5 g
L-arginin	1 g
Pyruvát sodný	1 g
Vitamín K3 (menadion)	0,5 mg
Hemin	5 g
Voda	1000 ml
Sojový pepton	5 g
Agar	10 g

Pro detekci bifidobakterií se použil modifikovaný Wilkins-Chalgren agar (Oxoid; WSPMup), jehož složení je stejné jako výše uvedeného agaru (tabulka 4), ale je zde navíc přidán cystein (0,5 g/l), tween 80 (1 ml/l), ledová kyselina octová (1 ml/l) a mupirocin (100 mg/l). Rogosa agar (Oxoid) pro stanovení laktobacilů (Vlková a Rada, 2013) je vyobrazen v tabulce 5.

**Tabulka 5 – Složení Rogosa agaru (Oxoid) (Vlková a Rada, 2013)**

<b>Látka</b>	<b>Množství</b>
Trypton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukosa	20 g
Tween 80	1 ml
Dihydrogenfosforečnan draselný	6 g
Citrát amonný	2 g
Acetát sodný	17 g
Síran hořečnatý	0,575 g
Síran manganatý	0,12 g
Síran železitý	34 mg
Agar	20 g
Voda	1000 ml

## **5.4 Stanovení bakterií v zubním plaku**

### **5.4.1 Před konzumací probiotik**

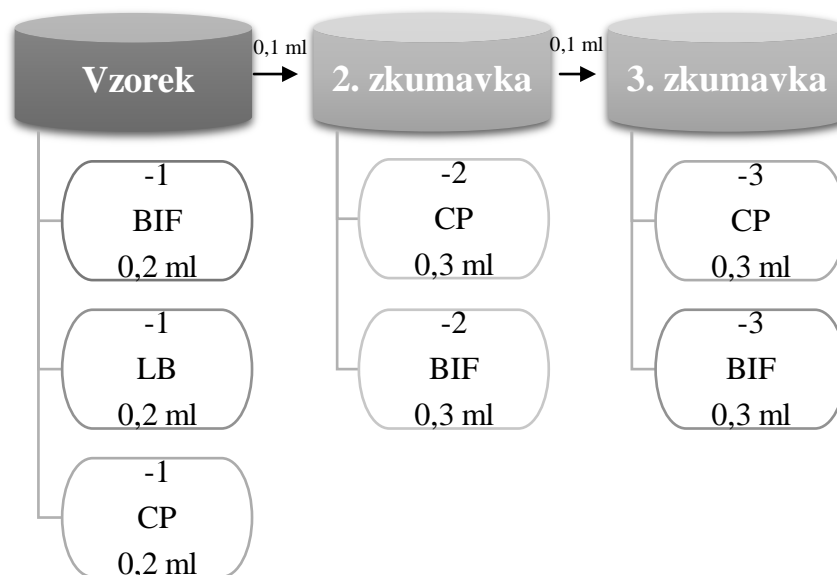
Vzorky zubního plaku byly odebírány před ranní ústní hygienou pomocí sterilního předem zváženého párátko do navážených zkumavek s anaerobním fyziologickým roztokem (1 ml). Následně byla stanovena hmotnost vzorku na desetitisíciny gramu, čímž byla zjištěna navážka zubního plaku. Poté byl vzorek (0,1 ml) asepticky převeden do zkumavky s anaerobně připraveným Wilkins-Chalgren bujónem (0,9 ml) (tabulka 6) a takto byla vytvořena ředící řada desítkového ředění do ředění  $10^{-3}$  ve zkumavkách s anaerobní atmosférou. Naředěné vzorky ze zkumavek byly převedeny na Petriho misky způsobem, který je znázorněn na obrázku 3, a ihned byly zality příslušnými selektivními půdami.



**Tabulka 6 – Složení Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid) (Vlková a Rada, 2013)**

Látka	Množství
Trypton	10 g
Pepton želatiny	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukosa	1 g
Chlorid sodný	5 g
L-arginin	1 g
Pyruvát sodný	1 g
Vitamín K3 (menadion)	0,5 mg
Hemin	5 g
Voda	1000 ml

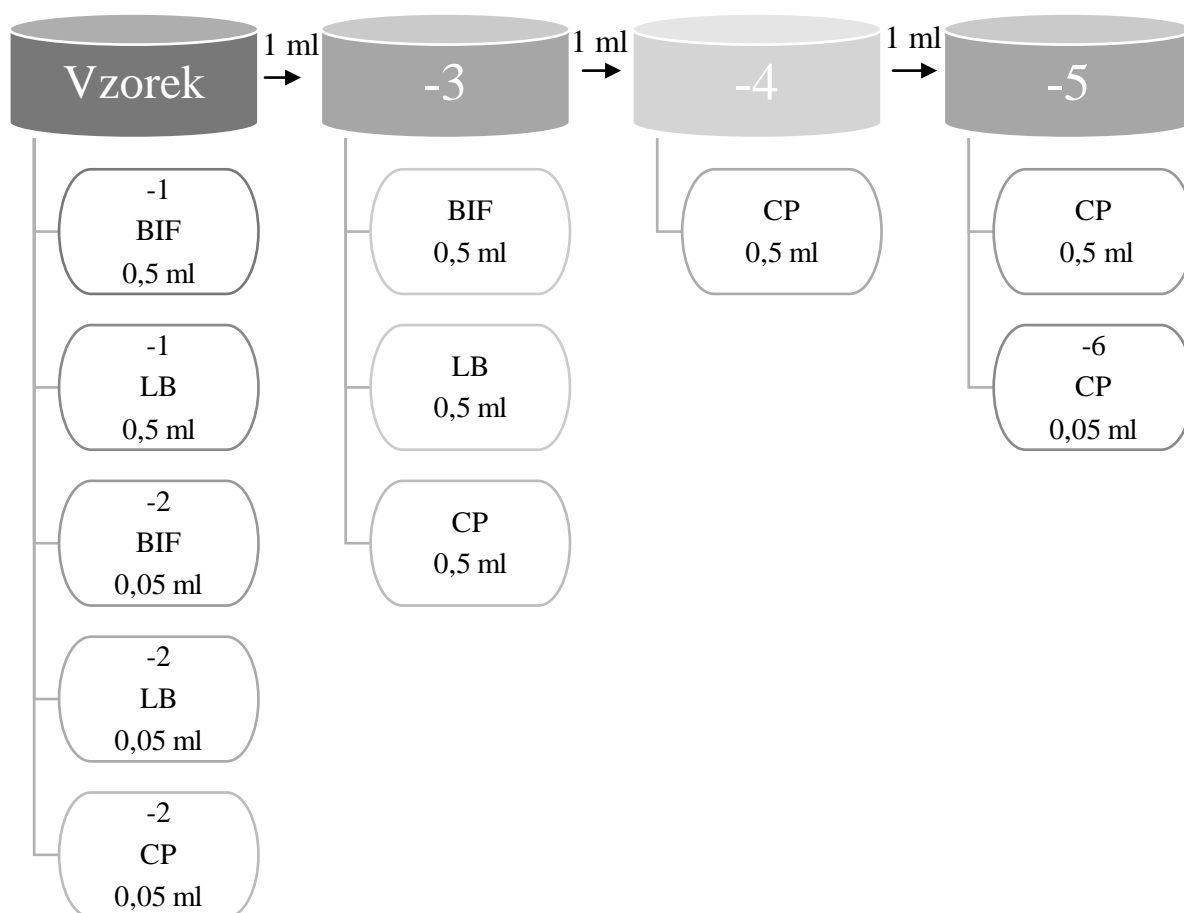
**Obrázek 3 – Schéma mikrobiologického rozboru (ve zkumavkách se nacházelo 0,9 ml Wilkins-Chalgren bujónu)**



#### 5.4.2 Po konzumaci probiotik

Vzorky byly odebrány podle postupu uvedeného výše do navážených zkumavek s anaerobním fyziologickým roztokem (3 ml). Následně byla vytvořena ředící řada desítkového ředění až do ředění  $10^{-5}$  podle schématu na obrázku 4. Naředěné vzorky byly asepticky umístěny na Petriho misky a okamžitě zality příslušnými agary.

**Obrázek 4 – Schéma mikrobiologického rozboru (ve vialkách pro ředící řadu bylo obsaženo 9 ml Wilkins-Chalgren bujónu)**



Pro ředící řadu byly použity vialky, ve kterých se nachází 9 ml Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid) (tabulka 6). Bujón je připraven metodou roll-tube, což znamená, že anaerobní prostředí bylo vytvořeno probubláváním média  $\text{CO}_2$  (Vlková a Rada, 2013).

### **5.4.3 Kultivace**

Bifidobakterie a celkové počty anaerobních bakterií byly po přelití jednou vrstvou agaru umístěny do anaerostatu společně s vyvíječem anaerobní atmosféry (Anearogen, Oxoid). Kultivace probíhala anaerobně 72 hodin při 37 °C (Vlková a Rada, 2013).

Laktobacily byly po zalití první vrstvou agaru, která se nechala zatuhnout, přelity druhou vrstvou agaru. Tím bylo zajištěno mikroaerofilní prostředí, ve kterém probíhá kultivace. Po zatuhnutí druhé vrstvy byly misky umístěny do termostatu dnem vzhůru. Kultivace probíhala 48–72 hodin při 37 °C (Vlková a Rada, 2013).

## **5.5 Vyhodnocení**

Pro vyhodnocení byly spočítány kolonie narostlé na jednotlivých půdách. Získané počty kolonií byly převedeny na 1 g vzorku podle zjištěné navážky. Konečné hodnoty bakterií byly vyjádřeny jako logaritmus počtu kolonií tvořících jednotek na gram (log KTJ/g). Hypotézy byly vyhodnoceny pomocí dvouvýběrového a párového testu v programu Statistica 12 na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 6 Výsledky

Pro stanovení počtu bakterií v zubním plaku kultivační metodou byly odebrány vzorky zubního plaku před konzumací probiotických kapslí či fermentovaných mléčných výrobků s bifidobakteriemi a následně 7., 10. a 14. den od prvního podávání probiotik. Sledovány byly celkové počty anaerobních bakterií (CP), bifidobakterie (BIF) a laktobacily (LB).

### 6.1 Počty bakterií v zubním plaku

Spočítáním kolonií narostlých na jednotlivých půdách byly získány hodnoty, které byly převedeny s ohledem na jednotlivé navážky a konečné počty bakterií jsou vyjádřeny pomocí jednotky log KTJ/g. Ze získaných hodnot byly sestaveny tabulky s průměrnými počty bakterií a grafy znázorňující průběh pokusu u některých dobrovolníků rozdělených do skupin podle toho, jaký výrobek přijímali.

#### 6.1.1 Probiotické kapsle

Z průměrných hodnot (tabulka 7) lze shrnout, že celkové počty anaerobních bakterií se u osob užívajících probiotické kapsle pohybovaly od  $10^7$  do  $10^{10}$  KTJ/g, přičemž jejich nejvyšší hodnoty u všech dobrovolníků jsou zaznamenány vždy před podáváním probiotik. Laktobacily se vyskytovaly v zubním plaku průměrně kolem  $10^2$  KTJ/g, ale 10. den od prvního podávání probiotik jejich hladina vzrostla průměrně na  $10^3$  KTJ/g. U třech dobrovolníků je zaznamenán pokles počtu bifidobakterií po příjmu probiotických kapslí, kdy hladiny průměrně klesly z hodnoty  $3,77 \pm 2,49$  log KTJ/g na počet  $2,57 \pm 2,62$  log KTJ/g, naopak po 10. dnu od prvního podávání je ve většině případů pozorován jejich nárůst. Nejvyšší průměrné hodnoty v počtu bifidobakterií v zubním plaku byly shledány u prvního dobrovolníka (graf 1) a to  $6,06 \pm 0,35$  log KTJ/g, naopak v průměru nejnižší hodnoty byly objeveny u pátého dobrovolníka (graf 2), které dosahovaly  $2,56 \pm 1,83$  log KTJ/g.

**Tabulka 7 – Průměrné počty bakterií v zubním plaku před a po přijímání probiotických kapslí v porovnání s průměrnými počty bakterií v zubním plaku před a po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků (log KTJ/g ± směrodatná odchylka; n=5)**

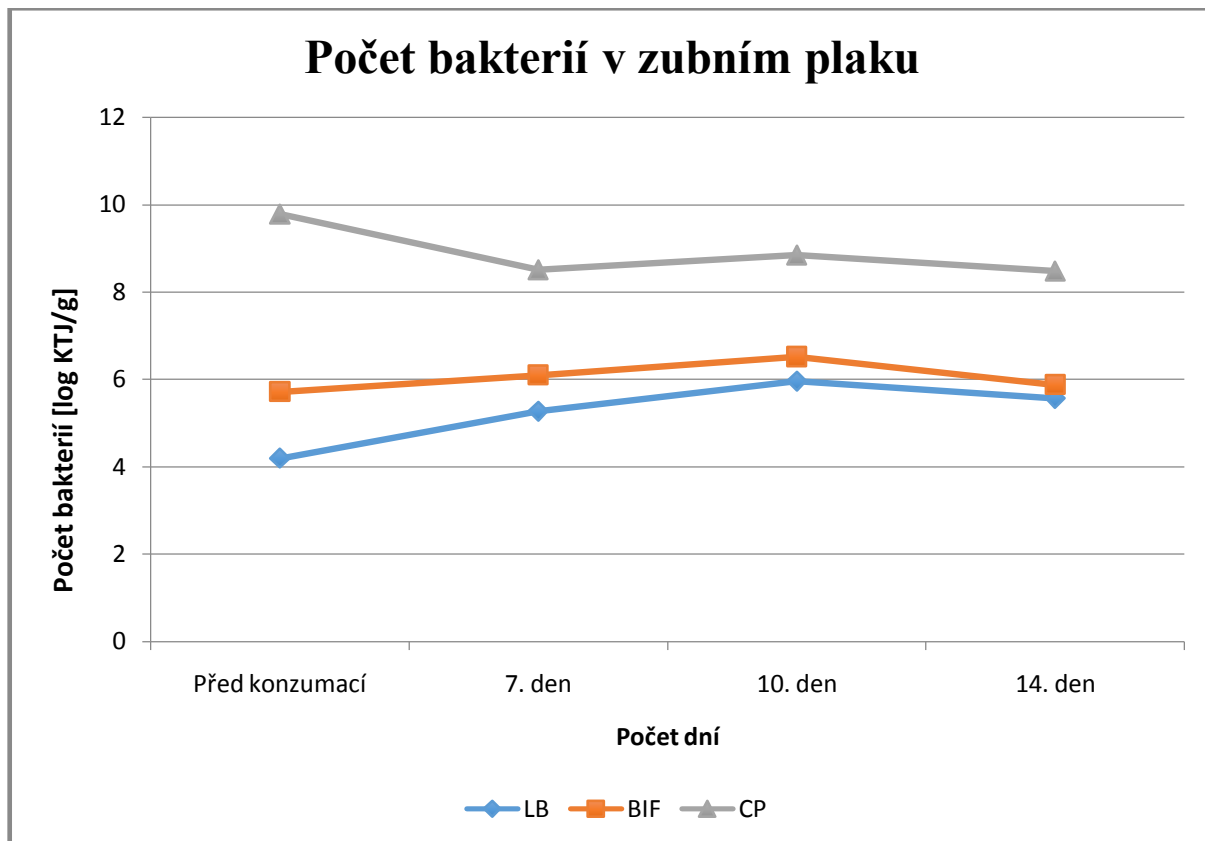
<b>Kapsle vs. jogurt</b>	<b>LB Kapsle</b>	<b>LB Jogurt</b>	<b>BIF Kapsle</b>
<b>Před konzumací</b>	2,35 ± 2,15 <sup>A</sup>	3,02 ± 2,80 <sup>A</sup>	3,77 ± 2,49 <sup>A</sup>
<b>7. den</b>	2,94 ± 3,06 <sup>A</sup>	3,72 ± 2,62 <sup>A</sup>	2,57 ± 2,62 <sup>A*</sup>
<b>10. den</b>	3,07 ± 2,13 <sup>A</sup>	4,36 ± 2,58 <sup>A</sup>	5,07 ± 2,88 <sup>A</sup>
<b>14. den</b>	2,04 ± 2,82 <sup>A</sup>	4,18 ± 4,00 <sup>A</sup>	5,77 ± 0,84 <sup>A</sup>

<b>Kapsle vs. jogurt</b>	<b>BIF Jogurt</b>	<b>CP Kapsle</b>	<b>CP Jogurt</b>
<b>Před konzumací</b>	5,15 ± 2,90 <sup>AB</sup>	10,05 ± 0,16 <sup>A</sup>	9,83 ± 0,18 <sup>A</sup>
<b>7. den</b>	6,04 ± 0,99 <sup>A*</sup>	7,95 ± 0,67 <sup>B</sup>	7,78 ± 0,66 <sup>B</sup>
<b>10. den</b>	6,74 ± 0,43 <sup>AB</sup>	7,79 ± 0,72 <sup>B</sup>	8,47 ± 0,68 <sup>C</sup>
<b>14. den</b>	2,53 ± 3,46 <sup>B</sup>	8,33 ± 0,24 <sup>B</sup>	7,76 ± 0,66 <sup>BC</sup>

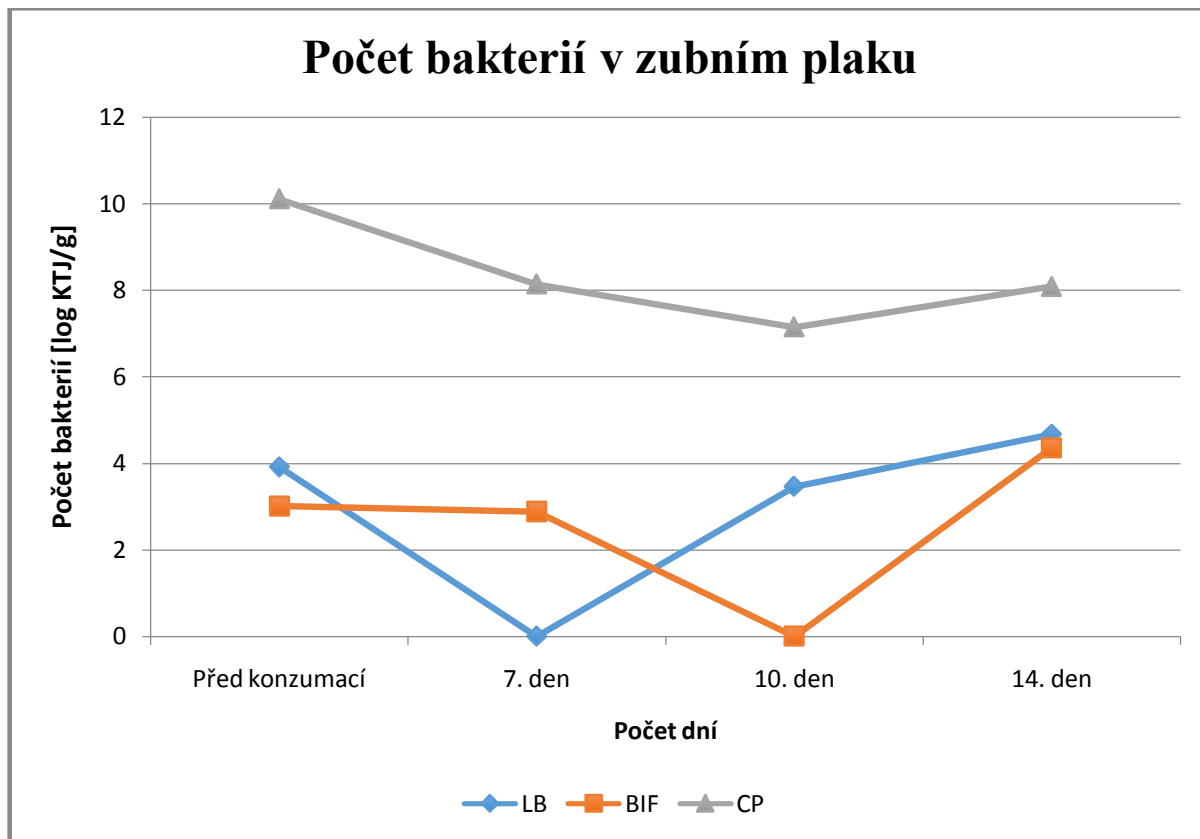
<sup>A,B,C</sup> Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

\* Statisticky významný rozdíl (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ) v počtech bifidobakterií mezi oběma pokusnými skupinami.

**Graf 1 – Grafické znázornění počtu bakterií před a po přijímání probiotických kapslí (1. dobrovolník)**



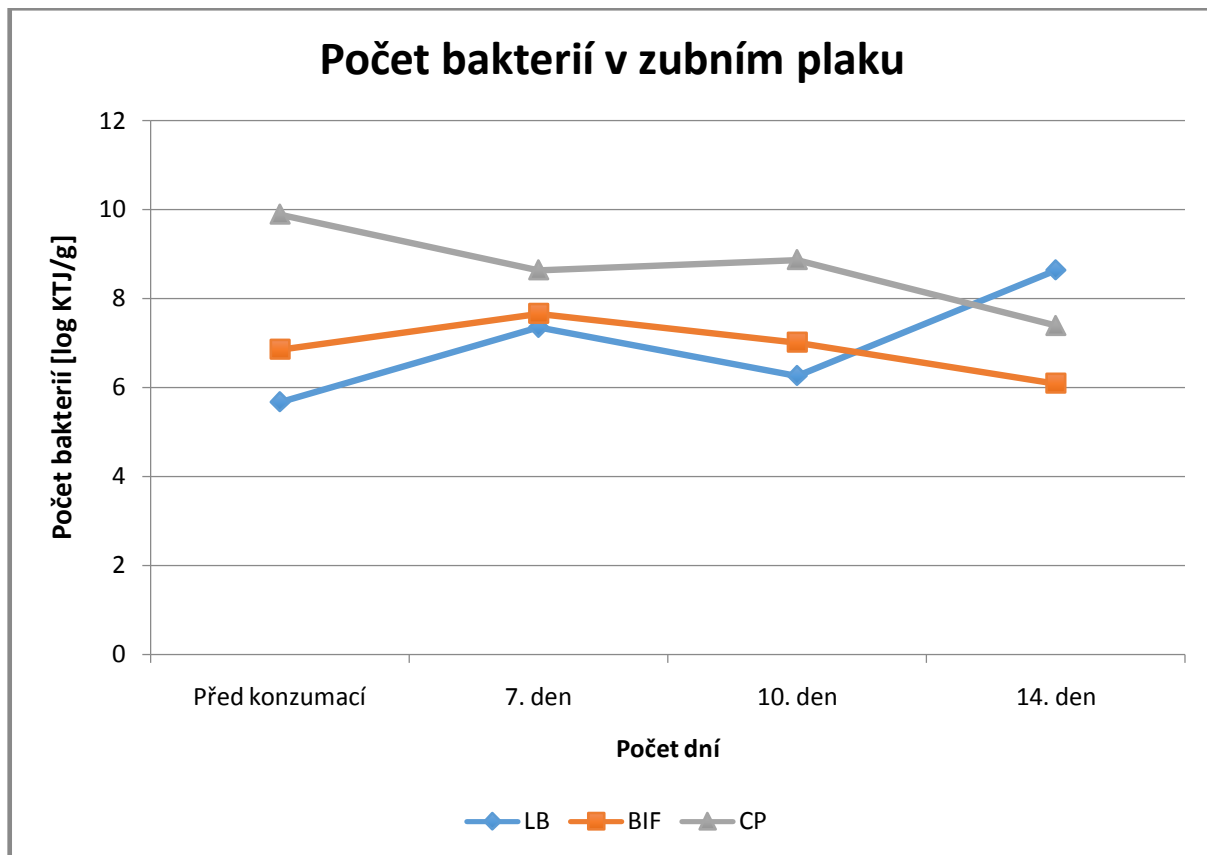
**Graf 2 – Grafické znázornění počtu bakterií před a po přijímání probiotických kapslí (5. dobrovolník)**



### 6.1.2 Jogurt s bifidokulturou

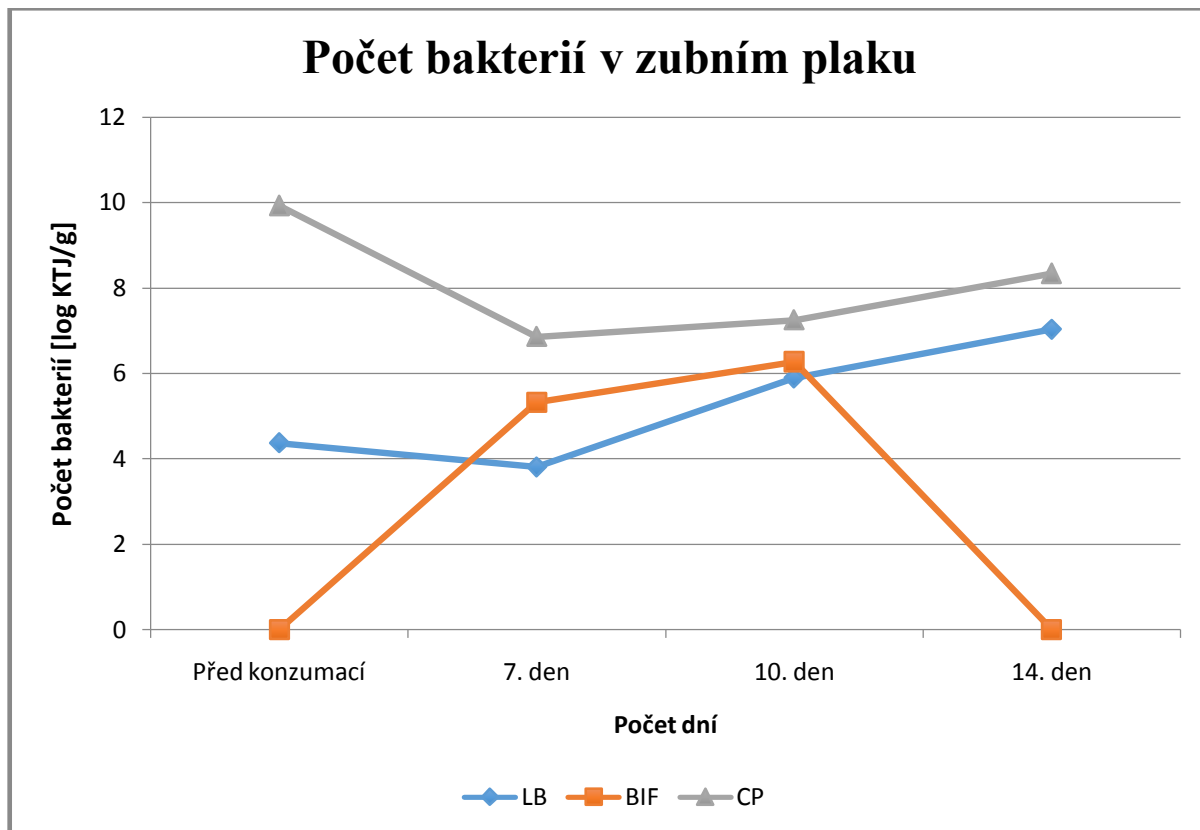
Průměrné hodnoty (tabulka 7) celkových počtů anaerobních bakterií se u osob užívajících fermentované mléčné výrobky pohybovaly v průběhu sledování od  $10^7$  do  $10^9$  KTJ/g. Nejvyšší hodnoty u všech dobrovolníků byly opět před přijímáním probiotik. U laktobacilů byl zaznamenán nárůst kolem 10. dne od prvního podávání probiotik z průměrné hodnoty (tabulka 7)  $10^3$  KTJ/g na počet  $10^4$  KTJ/g. Z průměrné hodnoty (tabulka 7) bifidobakterií lze vyčíst, že jejich počet v zubním plaku po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků postupně vzrůstal do 10. dne po prvním podání a následně klesal kolem 14. dne. Toto lze pozorovat na grafickém znázornění především u osmého (graf 3) a desátého (graf 4) dobrovolníka.

**Graf 3 – Grafické znázornění počtu bakterií před a po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků (8. dobrovolník)**





**Graf 4 – Grafické znázornění počtu bakterií před a po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků (10. dobrovolník)**



### 6.1.3 Porovnání počtů bakterií

V tabulce 7 jsou znázorněny průměrné počty bakterií v zubním plaku před a po přijímání probiotických kapslí v porovnání s průměrnými počty bakterií v zubním plaku před a po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků. Rozdíly v počtu laktobacilů v zubním plaku po přijímání probiotických kapslí v porovnání s jejich počtem po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků nebyly statisticky významné v průběhu celého experimentu ( $p > 0,05$ ). Toto lze pozorovat i u hodnot celkového počtu anaerobních bakterií, kdy rozdíl počtu těchto bakterií ve stejném srovnání nebyl statisticky významný ( $p > 0,05$ ). Naopak u počtu bifidobakterií v zubním plaku byl zaznamenán statisticky významný rozdíl 7. den po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků v porovnání s hodnotami bifidobakterií po přijímání probiotických kapslí ( $p < 0,05$ ), v dalších měřeních tento rozdíl již nebyl statisticky významný.

## 7 Diskuze

Mikrobiota ústní dutiny představuje důležitou součást lidské mikrobioty zahrnující několik stovek různých nejen bakteriálních druhů. Jedná se o běžnou součást ústní dutiny, která má důležitou funkci proti kolonizaci vnějších bakterií (Arweiler and Netuschil, 2016). Na základě sekvence 16S rDNA byla vytvořena analýza bakteriálního složení ve zdravé ústní dutině. Bylo zjištěno, že kmeny Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes a Spirochaetes tvoří 96 % z celkového počtu bakterií vyskytující se v ústní dutině. Změna mikrobioty byla pozorována u některých onemocnění, jako je například diabetes, bakteriémie, endokarditida, rakovina nebo autoimunitní onemocnění (Verma et al., 2018). Mikrobiota se začíná rozvíjet během porodu, kdy zdrojem pro kolonizaci jsou zejména bakterie z porodních cest, proto ji ovlivňují i různé způsoby porodu a může tak docházet k narušení mikrobiální kolonizace vyvolané lékařskými postupy (Li et al., 2018). Následně dutinu ústní osidlují různé rody jako například *Streptococcus*, *Lactobacillus* (Mystkowska, 2018 et al.; Sharma et al., 2018) nebo *Bifidobacterium* (Modesto et al., 2006), které mohou být spojeny i se vznikem zubního kazu (Allaker and Stephen, 2017). Jelikož produkcí organických kyselin přispívají k jeho vzniku (Featherstone, 2008), ale lze nalézt i studie, které se zabývají prospěchem probiotických bakterií na zdraví ústní dutiny (Haukioja, 2010).

Cílem této práce bylo otestovat, zda konzumace fermentovaných mléčných výrobků s bifidobakteriemi má vliv na počty laktobacilů a bifidobakterií v zubním plaku v porovnání s přijímáním probiotik v kapslích. Experiment probíhal na deseti dobrovolnících starších 18 let, kteří byli rozděleni do dvou skupin. První skupina 5 dobrovolníků přijímala probiotické kapsle, které obsahovaly v denní dávce  $20 \cdot 10^9$  KTJ probiotického komplexu s 8 bakteriálními druhy 1krát denně po dobu jednoho týdne. Druhá skupina 5 dobrovolníků konzumovala 120 g jogurtu s bakteriálním druhem *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* v počtu  $4 \cdot 10^9/100$  g výrobku 1krát denně po dobu jednoho týdne. Vzorky zubního plaku byly odebírány vždy před ranní ústní hygienou a počty bakterií byly stanovovány kultivační metodou na specifických pěstebních půdách před konzumací a po ní.

V naší studii průměrná hodnota počtu laktobacilů v zubním plaku dobrovolníků, kteří jedli fermentované mléčné výrobky s obsahem bifidobakterií, byla před konzumací  $3,02 \pm 2,80$  log KTJ/g. Sedmý den od první konzumace narostla tato hodnota na  $3,72 \pm 2,62$  log KTJ/g a desátý den na  $4,36 \pm 2,58$  log KTJ/g, což může být dáno právě konzumací jogurtu s obsahem těchto bakterií, které mohly mít schopnost dočasné kolonizace. Toto tvrzení je podpořeno i faktem, že čtrnáctý den došlo k poklesu na  $4,18 \pm 4,00$  log KTJ/g.

V porovnání se skupinou, která konzumovala jogurt s bifidobakteriemi, byl vliv přijímání probiotických kapslí na počet laktobacilů v zubním plaku méně významný, jelikož počet těchto bakterií před konzumací probiotických kapslí dosahoval  $2,35 \pm 2,15$  log KTJ/g, sedmý den hodnota mírně vzrostla na  $2,94 \pm 3,06$  log KTJ/g, desátý den na  $3,07 \pm 2,13$  log KTJ/g a následně čtrnáctý den počet klesl na hodnotu  $2,04 \pm 2,82$  log KTJ/g.

Celkový počet anaerobních bakterií byl před užíváním fermentovaných mléčných výrobků  $10^9$  KTJ/g. Po konzumaci došlo ke snížení jejich počtu a tato hodnota zůstala snižena i 14. den od prvního podání. Jedním z možných vysvětlení je kompetice laktobacilů s anaeroby o živiny.

Celkový počet anaerobních bakterií klesl i následkem užívání probiotických kapslí. To by mohlo znamenat, že probiotika z těchto kapslí uvolněná, ovlivňují složení a počet bakterií v celém trávicím traktu včetně dutiny ústní.

Nárůst a pokles počtu bifidobakterií měl během experimentu konzumace fermentovaných mléčných výrobků s jejich obsahem stejnou tendenci jako u laktobacilů. To znamená, že sedmý den od první konzumace těchto výrobků došlo k nárůstu jejich počtu, který do desátého dne pokračoval. Což opět může souviset se schopností dočasné kolonizace těchto bakterií v ústní dutině, protože čtrnáctý den byl zaznamenán jejich výrazný pokles.

Průměrné hodnoty bifidobakterií při přijímání probiotických kapslí klesly sedmý den po konzumaci z počtu  $3,77 \pm 2,49$  log KTJ/g na  $2,57 \pm 2,62$  log KTJ/g. Následně desátý a čtrnáctý den došlo k velkému nárůstu bifidobakterií, který nejspíše s experimentem nesouvisí, ale tyto odchylky nelze přesně určit, jelikož složení mikrobioty ústní dutiny závisí na mnoha faktorech, z nichž nejdůležitější jsou stravovací návyky během dne, pravidelná ústní hygiena, extrakce zubů, protetické náhrady, zubní a periodontální onemocnění, metabolické nebo rakovinové onemocnění (Mystkowska et al., 2018). Z důvodu těchto faktorů, které nebyly zaznamenávány, po vyhodnocení výsledků nebyla potvrzena hypotéza, a proto nárůst bifidobakterií po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků s jejich obsahem nebyl statisticky významný. Naproti tomu ve srovnání s přijímáním probiotických kapslí tento nárůst bifidobakterií dosáhl statistické významnosti.

Ze zjištěných průměrných hodnot plyne, že při konzumaci fermentovaných mléčných výrobků s obsahem bifidobakterií docházelo k nárůstu počtu laktobacilů i bifidobakterií v zubním plaku. Tyto průměry jsou však spojeny s vysokou směrodatnou odchylkou, a tím pádem byl vliv konzumace fermentovaných mléčných výrobků na počet laktobacilů a bifidobakterií v ústní dutině během naší studie vysoce individuální a je nutné přistupovat

k těmto výsledkům s určitou rezervou. Nicméně jsou užitečné jako podklady pro další experimenty, které by se zabývaly vlivem konzumace fermentovaných mléčných výrobků s přidavkem bifidobakterií na výskyt těchto bakterií v ústní dutině. Právě vysoké hodnoty směrodatných odchylek jsou pro nás signálem, že je v dalších experimentech potřeba provést řadu úprav. Mezi tyto modifikace by měla být zahrnuta úprava jídelníčků pozorovaných dobrovolníků. Tato studie totiž dobrovolníky nijak neomezovala v konzumaci jogurtů po skončení experimentu a mohlo se tak stát, že některý z probandů je užíval i po uplynutí sedmi dnů nebo naopak před začátkem experimentu, což mohlo snadno zkreslit výsledky. Navíc by se sjednocením jídelníčku omezil i vliv další stravy např. bohaté na sacharidy nebo jiných potravin obsahujících probiotické kultury. K dalšímu zpřesnění studie by mělo dojít zvýšením počtu dobrovolníků, tím by se snížila míra vlivu individuálních výchylek na celkové výsledky. Dále by bylo vhodné u všech dobrovolníků unifikovat přesnou dobu konzumace jogurtů a také odebírání vzorků. Vysoká směrodatná odchylka v našich experimentech může být vyvolána i tím, že pokud při vyhodnocování některého ze vzorků došlo k hrubé chybě, není to při hodnocení pouze jediného vzorku od daného pacienta v daný den zjistitelné. Proto by v dalších experimentech mělo být odebíráno několik vzorků najednou, aby byla detekce hrubých chyb snazší, odchylka měření nižší a přesnost stanovení vyšší.

Účinek probiotik na zubní kazy a s nimi související rizikové faktory byly hodnoceny v několika experimentálních studiích s použitím různých mikroorganismů: *Lactobacillus rhamnusus* GG, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. brevis* CD2 a *Bifidobacterium* spp. (Cagetti et al., 2013). Mechanismus účinku těchto bakterií v ústní dutině dosud nebyl zcela pochopen (Villavicencio et al., 2018), přesto byly navrženy k redukci výskytu zubního kazu, změnám počtu mutantních streptokoků a laktobacilů, změnám pH plaku a zvrácení lézí zubního kazu (Cagetti et al., 2013). Příkladem může být studie Alanziho et al. (2018), kde se experimentálně zjišťoval vliv kombinace probiotik *Lactobacillus rhamnusus* GG a *Bifidobacterium lactis* B-12 na zdraví dásní. Této studii se zúčastnilo 108 školáků ve věku 13–15 let. Byli rozděleni do dvou skupin, kdy obě skupiny dostávaly dvakrát denně pastilky s probiotiky nebo placebem po dobu čtyř týdnů. Bylo zjištěno, že probiotické pastilky významně snižovaly výskyt *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *Fusobacterium nucleatum* ve slinách i v zubním plaku, přičemž *A. actinomycetemcomitans* je považován za původce lokalizované juvenilní periodontitidy, což je onemocnění charakterizované rychlou destrukcí tkáně podporující zub (Raja et al., 2014). Také byl snížen počet *Porphyromonas*

*gingivalis* v zubním plaku, zatímco v kontrolní skupině nebyly zaznamenány žádné významné změny (Alanzi et al., 2018).

Další studie zkoumala, zda krátkodobá konzumace jogurtu obsahujícího bifidobakterie má vliv na obsah mutantních streptokoků a laktobacilů v ústní dutině u dospělých. Byla provedena dvojitě zaslepená randomizovaná křížová studie, která zahrnovala 21 zdravých jedinců ve věku 21–24 let. Dobrovolníci byli rozděleni do dvou skupin, z nichž první skupina užívala 200 g jogurtu obsahujícího *Bifidobacterium bifidum* DN-173 010 ( $7 \cdot 10^7$  KTJ/g) jednou denně po dobu dvou týdnů a kontrolní skupina konzumovala jogurt bez životaschopných bakterií. Následkem užívání probiotického jogurtu byla zaznamenána statisticky významná redukce mutantních streptokoků ve slinách. Podobný trend byl pozorován také u laktobacilů, ale tento pokles nedosáhl statistické významnosti (Caglar et al., 2005). Naproti tomu v našem pokusu došlo k nárůstu počtu laktobacilů, ale tento nárůst také nebyl statisticky významný ani v porovnání s přijímáním probiotik ve formě kapslí.

Bafna et al. (2018) provedli dvojitě zaslepenou randomizovanou placebem kontrolovanou studii, kde po dobu čtyř týdnů bylo sledováno 70 osob se zjištěným výskytem *Streptococcus mutans* více než  $10^6$  KTJ/ml ve slinách. Jedinci užívali 100 g jogurtu obsahujícího *Lactobacillus acidophilus* La5 a *Bifidobacterium lactis* Bb12 nebo jogurt bez probiotických bakterií jednou denně. Z výsledků vyplynulo, že existuje významný statistický rozdíl v počtu *Streptococcus mutans* ve slinách při požívání jogurtu s probiotiky anebo bez probiotik. *Lactobacillus acidophilus* La5 a *Bifidobacterium lactis* Bb12 přítomné v jogurtu byly účinné při snižování hladin *Streptococcus mutans* ve slinách. Následně bylo zjištěno, že bifidobakterie mají schopnost vázat se na *Fusobacterium nucleatum* a laktobacily mohou dočasně kolonizovat ústní dutinu. Tyto vlastnosti jak bifidobakterií tak laktobacilů umožňují jejich přilnutí k ústní sliznici a zubní tkáni a mohou tak konkurovat přítomným patogenům. To je v souladu s naší studií, kde došlo k dočasné kolonizaci bifidobakterií i laktobacilů následkem užívání fermentovaných mléčných výrobků. Také bylo prokázáno, že probiotika jako součást mléčných produktů přispívají k neutralizaci kyselého prostředí v ústech a interagují s kariogenními bakteriemi (Bafna et al., 2018). Podobné výsledky uvádí i výše uvedená studie Villavicencio et al. (2018), v níž zjistili, že pravidelná denní konzumace mléka s *Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium longum* snižuje celkový počet laktobacilů a zvyšuje pufrací kapacitu slin. Pro objasnění mechanismu účinku je však nutné provedení dalších pokusů.

Ferrazzano et al. (2008) uvádí, že vehikulum (nosič) pro podávání probiotik by mělo být mléčného původu z důvodu obsažených kaseinových fosfopeptidů, které mají inhibiční účinek na demineralizaci a podporují remineralizaci zubní skloviny. Tudiž fermentované mléčné výrobky jsou považovány za vynikající prostředek pro podávání probiotik díky synergickému vztahu mezi složkami mléčného výrobku a probiotickou kulturou (Ferrazzano et al., 2008).

Studie Glavina et al. (2012) dospěla k závěrům, že vlivem konzumace jogurtů s obsahem *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 došlo k významnému snížení počtu *Streptococcus mutans*, zvýšení pufrční kapacity slin a zároveň hladina laktobacilů zůstala přibližně stejná jako před začátkem experimentu. Poslední zmíněný poznatek je v rozporu s námi pozorovanou tendencí, kdy počet laktobacilů i bifidobakterií rostl. Výše popsány změny v naší studii by bylo potřeba tento rozpor potvrdit nebo vyvrátit. V případě, že by se potvrdil závěr studie Glavina et al. (2012), znamenalo by to, že laktobacily přijímané v jogurtu mohou redukovat patogenní mikrobiotu ústní dutiny a zároveň nezvyšovat rizika kariogenity způsobená samotnými laktobacily, protože jejich množství bylo před experimentem i po něm přibližně stejné.

Námi provedenou metodou nelze určit souvislost mezi zvýšeným počtem bifidobakterií nebo laktobacilů v zubním plaku a vznikem zubního kazu, jelikož podle Kiliana a kol. (1999) v některých případech byla nalezena nízká kazivost v přítomnosti vysoké koncentrace mikroorganismů nebo obráceně. Pro určení vysoké kazivosti by bylo nutné sestavit komplex výsledků u jednotlivých dobrovolníků pomocí různých metod zahrnující znalost podrobné anamnézy, příjmu sacharidů během dne, kazivosti zubů rodičů a sourozenců a genetických predispozic. Dále by bylo důležité zaznamenávat počet nových kazů v období experimentu a následně provést mikrobiologické testy pro stanovení koncentrace *Streptococcus mutans* a *Lactobacillus acidophilus* ve slinách, určit pH slin a sledovat kumulaci plaku za 24 hodin (Kilian a kol., 1999).

Jelikož v posledních letech roste zájem o probiotika užívaná pro zdraví ústní dutiny, ale většina studií byla provedena s probiotickými druhy původně doporučenými pro zdraví střev, navrhla bych doporučení pro další výzkum zabývající se specifickými bakteriálními druhy v ústní dutině. Dokonce ani nebyly dostatečně prostudovány potenciální nežádoucí účinky probiotických bakterií v ústní dutině, proto je ke zvážení zda převýší pozitivní účinek těchto bakterií nad acidogenitou laktobacilů a bifidobakterií.

Možným řešením může být návrh podle Haukioja (2010), kde jsou uvedeny geneticky modifikované mikroorganismy, které by snížily škodlivé vlastnosti patogenních druhů přirozeně kolonizující dutinu ústní. Modifikovaný druh by mohl být využit k nahrazení původního patogenu. Jedním ze slibných příkladů může být vytvoření druhu *Streptococcus mutans* s úplnou delecí (tj. druh chromozomové mutace aberace, při níž chybí část chromozomu včetně příslušných genů na ní uložených) otevřeného čtecího rámce laktátové hydrogenázy a tím byla významně snížena jeho kariogenita (Haukioja, 2010).

## 8 Závěr

Všechny dohledané studie se shodují v tom, že podávání laktobacilů a bifidobakterií do ústní dutiny ve formě fermentovaných mléčných výrobků významně snižuje výskyt *Streptococcus mutans* ve slinách a zároveň zvyšuje pH slin.

Nárůst počtu laktobacilů v zubním plaku po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků s probiotickou kulturou nebyl statistický významný ani v porovnání s přijímáním probiotik ve formě kapslí. Po této konzumaci byly však zvýšeny i průměrné počty bifidobakterií v zubním plaku u námi posuzovaných osob, ale tento nárůst již dosáhl statistické významnosti ve srovnání s příjmem probiotických kapslí. Celkové počty anaerobních bakterií klesly po podávání fermentovaných mléčných výrobků s probiotiky i probiotických kapslí u obou pozorovaných skupin, což by mohlo znamenat, že tato probiotika ovlivnila složení a počet bakterií v celém trávicím traktu včetně dutiny ústní. Výsledky jsou však spojeny s vysokou směrodatnou odchylkou a tím pádem byl vliv konzumace těchto probiotik na počet laktobacilů a bifidobakterií v zubním plaku během naší studie vysoce individuální.

Pro zřetelnější prokázání vlivu probiotik na ústní dutinu je však nutné provést podrobné studie zabývající se potenciálními nežádoucími účinky těchto bakterií v ústní dutině a tím potom zjistit, zda pozitivní účinek laktobacilů a bifidobakterií převáží nad negativním působením jejich acidogenních produktů.



## 9 Citovaná literatura

Al Ayyan, W., Al Halabi, M., Hussein, I., Khamis, A.H., Kowash, M. A systematic review and meta-analysis of primary teeth caries studies in Gulf Cooperation Council States. *Saudi Dental Journal*. [online] 2018, 30, 175–182. [cit. 2018-07-26]. Dostupné z <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1013905218302189>>.

Alanzi, A., Honkala, S., Honkala, E., Varghese, A., Tolvanen, M., Söderling, E. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Beneficial Microbes*. [online] 2018, 15; 9(4): 593-602. [cit. 2018-09-11]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29633646>>.

Allaker, R.P., Stephen, A.S. Use of Probiotics and Oral Health. [online] 2017, 4(4): 309–318. [cit. 2018-10-10]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5688201/>>.

Arora, T., Singh, S., Sharma, R.K. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition*. [online] 2013, 29(4): 591-6. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287068>>.

Arweiler, N.B., Netuschil, L. The Oral Microbiota. *Microbiota of the Human Body*. [online] 2016, 902: 45-60. [cit. 2018-10-09]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27161350>>.

Bafna, H.P., Ajithkrishnan, C.G., Kalantharakath, T., Singh, R.P., Kalyan, P., Vathar, J.B., Patel, H.R. Effect of Short-term Consumption of Amul Probiotic Yogurt Containing *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium Lactis* Bb12 on Salivary *Streptococcus mutans* Count in High Caries Risk Individuals. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. [online] 2018, 8(2): 111–115. [cit. 2018-10-10]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932918/>>.

Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. [online] 2015, 25; 80(1): 1-43. [cit. 2018-10-08]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609051>>.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Triton, 560 s. ISBN 8594031505280.

Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology. *Annals of Microbiology*. [online] 2000, 50, 117-131. [cit. 2018-09-03]. Dostupné z <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.583.7996>>.

Biopron 9 Premium 60 tobolek. Dr. Max Lékárna. [online] 2018. [cit. 2018-10-07]. Dostupné z <<https://www.drmax.cz/biopron-9-premium-60-tobolek>>.

43315?gclid=Cj0KQCQjw3ebdBRC1ARIsAD8U0V4zcHWStso\_ITHDm5u4YzQV6fSda3V3adwRRH DkVayW\_ceaN1FWsswaAprhEALw\_wcB>.

Biopron9® Premium. WALMARK, a.s. [online] 2016. [cit. 2018-10-07]. Dostupné z <<http://www.biopron.cz/biopron-9-premium/>>.

Byun, R., Nadkarni, M.A., Chhour, K.L., Martin, F.E., Jacques, N.A., Hunter, N. Quantitative Analysis of Diverse Lactobacillus Species Present in Advanced Dental Caries. *Journal of Clinical Microbiology*. [online] 2004, 42, 7, 3128–3136. [cit. 2018-10-6]. Dostupné z <<https://jcm.asm.org/content/42/7/3128.short>>.

Cagetti, M.G., Mastroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P., Campus, G. The Use of Probiotic Strains in Caries Prevention: A Systematic Review. *Nutrients*. [online] 2013, 5, 2530-2550. [cit. 2018-07-21]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3738986/>>.

Caglar, E., Sandalli, N., Twetman, S., Kavaloglu, S., Ergeneli, S., Selvi, S. Effect of yogurt with Bifidobacterium DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontologica Scandinavica*. [online] 2005, 63(6): 317-20. [cit. 2018-10-08]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16512103>>.

Caufield, P.W., Schön, C.N., Saraithong, P., Li, Y., Argimón, S. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. *Journal of dental research*. [online] 2015, 94(9): 110-8. [cit. 2018-09-10]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25758458>>.

Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C., Scardovi, V. Bifidobacterium inopinatum sp. nov. and Bifidobacterium denticolens sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *International journal of systematic bacteriology*. [online] 1996, 46(2): 564-71. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8934909>>.

Dixit, Y., Wagle, A., Vakil, B. Patents in the Field of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics. *Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene*. [online] 2016, 1(2): 11. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.omicsonline.org/peer-reviewed/patents-in-the-field-of-probiotics-prebiotics-synbiotics-a-review-77205.html>>.

Do, T., Devine, D., Marsh, P.D. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*. [online] 2013, 5: 11–19. [cit. 2018-09-15]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674928>>.

Downes, J., Mantzourani, M., Beighton, D., Hooper, S., Wilson, M.J., Nicholson, A., Wade, W.G. *Scardovia wiggisiae* sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus *Scardovia* and *Scardovia inopinata*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. [online] 2011, 61(1): 25-9. [cit. 2018-10-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139283>>.

Eid, R., Jakee, J.E., Rashidy, A., Asfour, H., Omara, S., Kandil, M.M., Mahmood, Z., Hahne, J., Seida, A.A. Potential Antimicrobial Activities of Probiotic Lactobacillus Strains Isolated from Raw Milk. *Journal of Probiotics & Health*. [online] 2016, 4: 138. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.omicsonline.org/open-access/potential-antimicrobial-activities-of-probiotic-lactobacillus-strainsisolated-from-raw-milk-2329-8901-1000138.php?aid=69018>>.

Featherstone, J.D. Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal*. [online] 2008, 53(3): 286-91. [cit. 2018-10-10]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782377>>.

Ferrazzano, G.F., Cantile, T., Quarto, M., Ingenito, A., Chianese, L., Addeo, F. Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization in vitro. *Australian Dental Journal*. [online] 2008, 53(4): 314-9. [cit. 2018-11-01]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19133946>>.

Finlayson, T.L., Williams, D.R., Siefert, K., Jackson, J.S., Nowjack-Raymer, R. Oral Health Disparities and Psychosocial Correlates of Self-Rated Oral Health in the National Survey of American Life. *American Journal of Public Health*. [online] 2010, 100(1), 246–255. [cit. 2018-08-08]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2837435/>>.

Galperin, M.Y. Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiology Spectrum*. [online] 1(2), 2013. [cit. 2018-10-08]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306282/>>.

Gao, L., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y., Chen, F. Oral microbiomes: more and more importance. *Protein Cell*. [online] 2018, 9(5), 488–500. [cit. 2018-08-02]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5960472/>>.

Ghaffari, M., Rakhshanderou, S., Ramezankhani, A., Buunk-Werkhoven, Y., Noroozi, M., Armoon, B. Are educating and promoting interventions effective in oral. *International Journal of Dental Hygiene*. [online] 2018, 16(1): 48-58. [cit. 2018-07-21]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28834249>>.

Ghannoum, M.A., Jurevic, R.J., Mukherjee, P.K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Gillevet, P.M. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathogens*. [online] 2010, 8; 6(1): e1000713. [cit. 2018-08-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20072605>>.

Glavina, D., Gorseta, K., Skrinjarić, I., Vranić, D.N., Mehulić, K., Kozul, K. Effect of LGG Yoghurt on Streptococcus Mutans and Lactobacillus Spp. Salivary Counts in Children. *Collegium Antropologicum*. [online] 2012, 36(1): 129-32. [cit. 2018-10-13]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22816209>>.

Hammes, W.P., Hertel, Ch. The genera Lactobacillus and Carnobacterium. *The Prokaryotes*. [online] 2003, 320-403. [cit. 2018-09-15]. Dostupné z <[https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F0-387-30744-3\\_10](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F0-387-30744-3_10)>.

Harish, K., Varghese, T. Probiotics in human—evidence based review. *Calicut Medical Journal*. [online] 2006, 4(4): e3. [cit. 2018-09-01]. Dostupné z <[https://www.researchgate.net/publication/26496850\\_Probiotics\\_in\\_human-evidence\\_based\\_review](https://www.researchgate.net/publication/26496850_Probiotics_in_human-evidence_based_review)>.

Haukioja, A. Probiotics and Oral Health. *European Journal of Dental Education*. [online] 2010, 4(3): 348–355. [cit. 2018-10-10]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2897872/>>.

Historie výrobku Activia®. Danone. [online] 2017. [cit. 2018-10-07]. Dostupné z <<https://www.activia.cz/cz/nase-expertiza/historie-vyroбку-activia>>.

Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Falsen, E., Wauters, G., Vandamme, P. *Alloscardovia omnicolens* gen. nov., sp. nov., from human clinical samples. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. [online] 2007, 57(7): 1442-6. [cit. 2018-10-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625172>>.

Chen, X., Yang, G., Song, J.H., Xu, H., Li, D., Goldsmith, J., Zeng, H., Parsons-Wingerter, P.A., Reinecker, H.C. Kelly, C.P. Probiotic yeast inhibits VEGFR signaling and angiogenesis in intestinal inflammation. *PLoS One*. [online] 2013, 13; 8(5): e64227. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675530>>.

Jay, J.M. 1997. *Modern food microbiology*. New York: Champan and Hall, p. 661. ISBN 978-1-4615-7476-7.

Jian, W., Dong, X. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. [online] 2002, 52(3): 809-12. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12054242>>.

Kay, E.J., Locker, D. Is dental health education effective? A systematic review of current evidence. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. [online] 1996, 24(4): 231-5. [cit. 2018-08-08]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8871028>>.

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., Fakiri, E.M. Health Benefits of Probiotics. *ISRN Nutrition*. [online] 2013, 2013: 481651. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4045285/>>.

Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S., Das, G. Benefaction of probiotics for human health. *Journal of food and drug analysis*. [online] 2018, 26, 927-939. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://scinapse.io/papers/2793166738>>.

Kilian, J., Bartáková, V., Bilder, J., Fialová, S., Halačíková, Z., Handzel, J., Houbová, H., Hubková, V., Korábek, L., Lekešová, I., Mareš, J., Merglová, V., Penka, M., Pražáková, L.,

Semrád, B., Šubrtová, I., Vaněk, J., Vomela, J., Zicha, A. 1999. Prevence ve stomatologii. Praha: Galén, 239 s. ISBN 80-7184-976-6.

Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A.P., Styriak, I., Gaspar, L., Fusek, J., Rodrigo, L., Kruzliak, P. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutrition & Metabolism*. [online] 2016, 20; 13: 14. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26900391>>.

Koliba, P. Probiotika z pohledu gynekologa. *Medicína pro praxi*. [online] 2012, 9(8–9): 354–359. [cit. 2018-09-10]. Dostupné z <<https://www.medvik.cz/bmc/link.do?id=bmc12032569>>.

Larsen, T., Fiehn, N.E. Dental biofilm infections. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. [online] 2017, 125(4): 376-384. [cit. 2018-09-15]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28407420>>.

Lee, D.K., Park, S.Y., An, H.M., Kim, J.R., Kim, M.J., Lee, S.W., Cha, M.K., Kim, S.A., Chung, M.J., Lee, K.O., Ha, N.J. Antimicrobial activity of *Bifidobacterium* spp. isolated from healthy adult Koreans against cariogenic microflora. *Archives of Oral Biology*. [online] 2011, 56(10): 1047-5. [cit. 2018-10-09]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21439550>>.

Li, H., Wang, J., Wu, L., Luo, J., Liang, X., Xiao, B., Zhu, Y. 2018. The impacts of delivery mode on infant's oral microflora. *Scientific Reports*. [online] 2018, 8, 11938. [cit. 2018-08-25]. Dostupné z <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-30397-7>>.

Ly, M., Abeles, S.R., Boehm, T.K., Robles-Sikisaka, R., Naidu, M., Santiago-Rodriguez, T., Pride, D.T. Altered oral viral ecology in association with periodontal disease. *MBio*. [online] 2014, 20; 5(3): e01133-14. [cit. 2018-08-30]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24846382>>.

Mahlen, S.D., Clarridge, J.E. Site and Clinical Significance of *Alloscardovia omnicolens* and *Bifidobacterium* species isolated in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. [online] 2009, 47(10): 3289-93. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641056>>.

Martin, R., Makino, H., Yavuz, A.C., Ben-Amo, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., Kubota, H., Swinkels, S., Sakai, T., Oishi, K., Kushiro, A., Knol, J. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS one*. [online] 2016, 11(6): e0158498. [cit. 2018-08-22]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928817/>>.

McEwen, B.S., Gianaros, P.J. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annual Review of Medicine*. [online] 2011, 62:431-45. [cit. 2018-08-08]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20707675>>.

Merglová, V. Prenatální a včasná postnatální prevence zubního kazu. *New EU magazine of medicine*. [online] 2008, 3. [cit. 2018-10-13]. Dostupné z <<http://www.neumm.cz/archiv/492/casopis-neumm-3-2008.html>>.

Modesto, M., Biavati, B., Mattarelli, P. Occurrence of the family bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Research*. [online] 2006, 40(3): 271-6. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707878>>.

Monroe, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology*. [online] 2007, 5, 11, e307. [cit. 2018-09-15]. Dostupné z <<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0050307>>.

Mutschelknauss, R.E. 2002. *Praktická parodontologie. Klinické postupy*. Přeložil doc. MUDr. P. Poledník. Praha: Quintessenz, 532 s. ISBN 80-902118-8-7.

Mystkowska, J., Niemirowicz-Laskowska, K., Łysik, D., Tokajuk, G., Dabrowski, J.R., Bucki, R. The Role of Oral Cavity Biofilm on Metallic Biomaterial Surface Destruction–Corrosion and Friction Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. [online] 2018, 19(3): 743. [cit. 2018-08-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877604/>>.

Nguyen, H.T., Truong, D.H., Kouhondé, S., Ly, S., Razafindralambo, H., Delvigne, F. Biochemical Engineering Approaches for Increasing Viability and Functionality of Probiotic Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. [online] 2016, 17(6), 867. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/6/867>>.

Okamoto, M., Benno, Y., Leung, K.P., Maeda, N. "Bifidobacterium tsurumiense sp. nov., from hamster dental plaque." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. [online] 2008, 58(1): 144-8. [cit. 2018-10-25]. Dostupné z <<https://scinapse.io/papers/1973742572>>.

Okamoto, M., Benno, Y., Leung, K.P., Maeda, N. *Metascardovia criceti* Gen. Nov., Sp. Nov., from Hamster Dental Plaque. *Microbiology and Immunology*. [online] 2007, 51(8), 747-754. [cit. 2018-10-25]. Dostupné z <<https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1045519570>>.

Pandey, K.R., Naik, S.R., Vakil, B.V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*. [online] 2015, 52(12): 7577–7587. [cit. 2018-08-30]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4648921/>>.

Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Cantor, A. The Gut Microbiota and Human Health with an Emphasis on the Use of Microencapsulated Bacterial Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. [online] 2011, 2011: 981214. [cit. 2018-09-10]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21772792>>.

Předpis č. 397/2016 Sb. ze dne 12. prosince 2016 o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2016. Částka 162. s. 6271. Dostupné také z <<https://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=397&r=2016>>.

Raja, M., Ummer, F., Dhivakar, C.P. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans – A Tooth Killer? *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. [online] 2014, 8(8): 13–16. [cit. 2018-11-11]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4190817/>>.

Rosier, B.T., Marsh, P.D., Mira, A. Resilience of the oral microbiota in health - mechanisms that prevent dysbiosis. *Journal of Dental Research*. [online] 2018, 97(4), 371-380. [cit. 2018-08-02]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29195050>>.

Roubalíková, L. Co je dobré vědět o hygieně dutiny ústní I. *Medicína po praxi*. [Online] 2007, 2: 76–79. [cit. 2018-10-28]. Dostupné z <<https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/02/08.pdf>>.

Saha, S., Tomaro-Duchesneau, C., Tabrizian, M., Prakash, S. Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*. [online] 2012, 12(9): 1207-20. [cit. 2018-07-26]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690730>>.

Sechovcová, H., Killer, J., Pechar, R., Geigerová, M., Švejtil, R., Salmonová, H., Mekadim, C., Rada, V., Vlková, E., Kofroňová, O., Benada, O. *Alloscardovia venturai* sp. nov., a fructose 6-phosphate phosphoketolase-positive species isolated from the oral cavity of a guinea-pig (*Cavia aperea* f. *porcellus*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. [online] 2017, 67(8): 2842-2847. [cit. 2018-10-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28820091>>.

Sharma, N., Bhatia, S., Sodhi, A.S., Batra, N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiology*. [online] 2018, 4(1): 42-66. [cit. 2018-07-21]. Dostupné z <<http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2018.1.42>>.

Schindler, J. Mikrobiální biofilm. *Vesmír*. [online] 2001, 80, 203, 2001. [cit. 2018-09-15]. Dostupné z <<https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-4/mikrobialni-biofilm.html>>.

Smith, S.I., Awah, A.J., Coker, A.O., Savage, K.O., Abosedo, D.A., Oyedeji, K.S. Lactobacilli in human dental caries and saliva. *Microbios*. [online] 2001, 105(411): 77-85. [cit. 2018-10-06]. Dostupné z <<https://europepmc.org/abstract/med/11393751>>.

Sornplang, P., Piyadeatsoontorn, S. Probiotic isolates from unconventional sources. *Journal of Animal Science and Technology*. [online] 2016, 19; 58: 26. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27437119>>.

Tikhonova, S., Booij, L., D'Souza, V., Crosara, K.T.B., Siqueira, W.L., Emami, E. Investigating the association between stress, saliva and dental caries: a scoping review. *BMC Oral Health*. [online] 2018, 18:41. [cit. 2018-08-03]. Dostupné z <<https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-018-0500-z>>.

Toiviainen, A., Jalasvuori, H., Lahti, E., Gursoy, U., Salminen, S., Fontana, M., Flanagan, S., Eckert, G., Kokaras, A., Paster, B., Söderling, E. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clinical Oral Investigations*. [online] 2015, 19: 77–83. [cit. 2018-10-28]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24638207>>.

Valen, H., Scheie, A.A. Biofilms and their properties. *European Journal of Oral Sciences*. [online] 2018, 126, 1: 13-18. [cit. 2018-09-15]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30178559>>.

Verma, D., Garg, P.K., Dubey, A.K. Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*. [online] 2018, 200: 525–540. [cit. 2018-08-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29572583>>.

Villavicencio, J., Villegas, L.M., Arango, M.C., Arias, S., Triana, F. Effects of a food enriched with probiotics on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in preschool children: a cluster randomized trial. *Journal of Applied Oral Science*. [online] 2018, 14; 26: e20170318. [cit. 2018-09-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29768525>>.

Vlková, E., Nevorál, J., Jencikova, B., Kopecný, J., Godefrooij, J., Trojanová, I., Rada, V. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods*. [online] 2005, 60(3): 365-373. [cit. 2018-09-15]. Dostupné z <<http://europepmc.org/abstract/MED/15649538>>.

Vlková, E., Rada, V. 2013. *Cvičení z potravinářské mikrobiologie*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 46 s. ISBN: 978-80-213-2402-2.

Wang, J., Gao, Y., Zhao, F. Phage-bacteria interaction network in human oral microbiome. *Environmental Microbiology*. [online] 2016, 18(7): 2143-58. [cit. 2018-08-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26036920>>.

Westermann, C., Gleinser, M., Corr, S.C., Riedel, C.U. A Critical Evaluation of Bifidobacterial Adhesion to the Host Tissue. *Frontiers in Microbiology*. [online] 2016, 5; 7: 1220. [cit. 2018-09-05]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547201>>.

WHO. Probiotics. 2002. In: *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Volume 4: Recommendations*. World Health Organization, London, Ontario, Canada : World Health Organization. p. 11.



## 10 Seznam příloh

Příloha č. 1: Tabulka 8 – Počty bakterií před a po přijímání probiotických kapslí (log KTJ/g) a navážky zubního plaku (g) u jednotlivých dobrovolníků

<b>1. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	4,19	5,72	9,78	0,0442
<b>7. den</b>	5,27	6,1	8,51	0,0046
<b>10. den</b>	5,96	6,52	8,84	0,0073
<b>14. den</b>	5,56	5,88	8,48	0,0552
<b>2. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	0	0	10,03	0,0401
<b>7. den</b>	0	0	6,81	0,0147
<b>10. den</b>	3,21	5,52	7,59	0,0246
<b>14. den</b>	0	6,46	8,66	0,0078
<b>3. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	0	3,89	10,22	0,0313
<b>7. den</b>	2,67	0	7,95	0,043
<b>10. den</b>	0	6,42	8,18	0,0256
<b>14. den</b>	0	5,79	8,25	0,0217
<b>4. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	3,65	6,24	10,1	0,0445

<b>7. den</b>	6,77	3,89	8,33	0,0101
<b>10. den</b>	2,7	6,91	7,19	0,0398
<b>14. den</b>	0	6,37	8,17	0,0171
<b>5. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	3,91	3,01	10,11	0,0492
<b>7. den</b>	0	2,88	8,14	0,0265
<b>10. den</b>	3,46	0	7,15	0,0348
<b>14. den</b>	4,67	4,36	8,09	0,0399

**Příloha č. 2: Tabulka 9 – Počty bakterií před a po konzumaci fermentovaných mléčných výrobků (log KTJ/g) a navážky zubního plaku (g) u jednotlivých dobrovolníků**

<b>6. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	0	5,98	9,7	0,0358
<b>7. den</b>	0	6,29	7,64	0,0324
<b>10. den</b>	0	6,27	8,69	0,0189
<b>14. den</b>	0	6,54	7,15	0,0368
<b>7. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	0	6,17	10,04	0,0399
<b>7. den</b>	3,31	5,39	7,61	0,0296
<b>10. den</b>	4,05	7,1	8,8	0,0072
<b>14. den</b>	0	0	8,61	0,011

<b>8. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	5,67	6,86	9,89	0,0433
<b>7. den</b>	7,35	7,66	8,64	0,0268
<b>10. den</b>	6,26	7,01	8,87	0,0405
<b>14. den</b>	8,64	6,09	7,39	0,0075
<b>9. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	5,09	6,72	9,61	0,0291
<b>7. den</b>	4,14	5,52	8,14	0,0337
<b>10. den</b>	5,59	7,06	8,72	0,0048
<b>14. den</b>	5,21	0	7,32	0,0132
<b>10. dobrovolník</b>				
	<b>LB</b>	<b>BIF</b>	<b>CP</b>	<b>Navážka</b>
<b>Před konzumací</b>	4,37	0	9,93	0,0449
<b>7. den</b>	3,81	5,32	6,86	0,0585
<b>10. den</b>	5,89	6,27	7,25	0,0572
<b>14. den</b>	7,03	0	8,34	0,0154