

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Stanovení *Lactobacillus casei* v probiotických potravinách
a stolici**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Ladislav Adámek

Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada CSc.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení *Lactobacillus casei* v probiotických potravinách a stolici" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2014

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval vedoucímu své diplomové práce prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za odborné vedení a vstřícnost.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Šárce Musilové, PhD. a Ing. Věře Bunešové, PhD., jejichž pomoc, zejména při zpracování praktické části mé diplomové práce, byla neocenitelná. Tato diplomová práce vznikla na základě mé bakalářské práce a tak bych chtěl poděkovat i Ing. Evě Popelářové, PhD., která mě při jejím zpracování vedla.

Zpracování této diplomové práce by samozřejmě nebylo možné bez poskytnutí materiálních prostředků, za což patří dík Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky.

Stanovení *Lactobacillus casei* v probiotických potravinách a stolici

Souhrn

O důležitosti zdravé výživy v životě každého člověka dnes již nikdo nepochybuje. Současný uspěchaný životní styl však nepřeje tomu, aby se lidé stravovali podle vhodných doporučení.

Špatný životní styl, včetně špatné výživy, vede k rozvoji různých civilizačních onemocnění (kardiovaskulární choroby, rakovina, diabetes, zácpa, revmatické nemoci, obezita, cévní mozková příhoda). Těmto onemocněním můžeme předcházet konzumací funkčních potravin (mají kromě výživové hodnoty i jiný pozitivní účinek na zdraví) anebo doplňků stravy.

Do obou těchto skupin můžeme zařadit probiotika (funkční potravina – jogurt, doplněk stravy – probiotické kapsle). Probiotika jsou v současnosti hodně skloňovanou problematikou. Jde o probiotické bakterie, které se přirozeně vyskytují v našem těle.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout selektivní prostředí pro stanovení a izolaci probiotické bakterie *Lactobacillus casei* z potravin a stolice. Dále byly ověřovány možnosti identifikace této bakterie.

Živná půda M – RTLV agar byla schopna inhibovat z výrobků probiotických tablet dostatečné množství bakterií. Na této živné půdě byly schopny růstu pouze bakterie *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*. V jednom případě na živné půdě byla identifikována i bakterie *Lactobacillus fermentum*, která může také v malém počtu kolonie tvořit.

U živné půdy M – RTLV agar nebyla potvrzena schopnost rozlišení kolonií *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* od *Lactobacillus rhamnosus*. Tato schopnost měla být dána použitou látkou 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid (TTC). U látky TTC bylo během používání zjištěno, že se chová velmi nestabilně.

Identifikační souprava API 50 CHL není schopna rozlišit *Lactobacillus casei* od *Lactobacillus paracasei*. Čisté kultury *Lactobacillus casei* spolehlivě identifikuje jako *Lactobacillus paracasei*. Toto bylo potvrzeno u čistých kultur ale i při identifikaci kolonií kultivovaných z výrobků.

Pro další identifikaci je tedy nutné využívat molekulárně - genetické metody identifikace. V mém případě šlo o polymerázovou řetězovou reakci PRC. PCR dokázalo

spolehlivě odlišit *Lactobacillus casei* od *Lactobacillus paracasei* na základě použitých primerů.

Další médium MRS – V agar využitě pro kultivaci *Lactobacillus casei* z probiotických tablet při různých teplotách mělo negativní výsledek. Selektivní schopnost MRS – V agaru byla slabá.

U živných půdy MRS – B a MRS – LP byla potvrzena jejich selekční schopnost. Lze je dobře použít pro kultivaci *Lactobacillus casei* v mléčných fermentovaných výrobcích. Dobře inhibují bakterie *Lactobacillus acidophilus*, startovací kulturu (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) a bifidobakterie.

Na žádném médiu nebylo možno kultivovat *Lactobacillus casei* ze vzorků stolice. Živné půdy byly upravovány všemi možnými prostředky a kultivovány při různých podmínkách. Žádné z těchto opatření nevedlo k dostatečné inhibiční schopnosti pro bakterie rodu *Clostridium* spp. a *Escherichia coli*.

Terapeutické minimum (10^6 KTJ/g) bylo splněno u dvou vzorků (č. 9, 10) fermentovaných mléčných výrobků. U vzorku číslo 11 byl obsah bakterií 10^5 KTJ/g.

U vzorků probiotických tablet (č. 1, 3, 4, 5, 6, 7) byl obsah laktobacilů srovnatelný s údaji uvedenými na etiketě výrobku. U výrobku číslo 2 se celkový obsah laktobacilů lišil od údajů uvedených na etiketě.

Klíčová slova: *Lactobacillus casei*, probiotika, potraviny, trávicí trakt, M – RTL V agar

Enumeration of *Lactobacillus casei* in probiotic food and faeces

Summary

Nowadays nobody doubts about the importance of eating healthy food. Current hectic life style is not in favour of people eating according to health food recommendations.

Unhealthy life style including eating unhealthy food leads to development of various lifestyle diseases (coronary diseases, cancer, diabetes, constipation, rheumatism, obesity, cerebrovascular accident). We may prevent these diseases by eating functional food (besides from nutritional values it has other positive effects on health) or by eating food supplements.

We may include probiotics in both of these groups (yoghurt as functional food, probiotic capsules as food supplement). Probiotics is highly discussed issue nowadays. Probiotics are probiotic bacteria naturally occurring in human body.

The aim of this dissertation was to produce selective media to detect and isolate probiotic bacteria *Lactobacillus casei* from food and stool. The possibilities to identify this bacteria were also verified.

Culture medium M – RTLV agar was able to inhibit sufficient number of bacteria from probiotic pill products. Only probiotic bacteria *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* were able to grow on this culture medium. In one case probiotic bacteria *Lactobacillus fermentum*, that is able to create colonies in a small number in this culture medium was also identified.

Culture medium M – RTLV agar proved not suitable for distinguishing the colonies of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. The presence of 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC) should have ensured the capability of distinguishing the colonies. TTC substance was found quite unstable during the tests.

API 50 CHL identification system is not able to distinguish *Lactobacillus casei* from *Lactobacillus paracasei*. Isolated *Lactobacillus casei* strains were reliably identified by API 50 CHL identification system as *Lactobacillus paracasei*. This discovery was confirmed both while doing tests with pure cultures as well as with identifying colonies cultivated from products.

It is necessary to use genetic methods for future identification. I have used polymerase chain reaction PCR. PCR method based on primers used was reliably able to distinguish *Lactobacillus casei* from *Lactobacillus paracasei*.

Another culture medium MRS – V agar used for cultivation of *Lactobacillus casei* from probiotic pills at different temperatures had negative results. Selective ability of MRS – V agar medium was low.

MRS – B culture medium and MRS – LP proved to be sufficiently selective. These culture media may be used for *Lactobacillus casei* cultivation in fermented milk products. They inhibit the growth of *Lactobacillus acidophilus* bacteria as well as starter cultures (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) and bifidobacteria very well.

None of the culture media proved suitable for cultivation of *Lactobacillus casei* from stool. Culture media were adjusted by every possible means and cultivated in different conditions. None of these measures led to sufficient inhibitory ability of the *Clostridium* spp genus and *Escherichia coli*.

Two samples of fermented milk products (sample number 9 and 10) complied with the therapeutic minimum (10^6 CFU/g). Sample number 11 contained bacteria at 10^5 CFU/g.

The quantity of lactobacillus in probiotic pill samples (sample number 1, 3, 4, 5, 6, 7) was comparable to information on their product labels. The quantity of lactobacillus in product number 2 differed from the information on its product label.

Keywords: *Lactobacillus casei*, probiotics, food, gastrointestinal tract, M – RTL V agar

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární rešerše	2
2.1. Gastrointestinální trakt.....	3
2.1.1. Mikrobiota v jednotlivých částech trávicího traktu	4
2.1.2. Funkce fyziologické střevní mikrobioty	7
2.2. Střevní mikrobiota v průběhu života	8
2.2.1. Kolonizace GIT v dětství	8
2.2.2. Mikrobiota v dospělosti.....	9
2.2.3. Mikrobiota ve stáří	9
2.2.4. Vliv probiotik a prebiotik při podávání kojencům	10
2.3. Funkční potraviny	11
2.4. Probiotika.....	12
2.4.1. Historie probiotik	12
2.4.2. Definice probiotik	14
2.4.3. Formy probiotik	16
2.4.4. Terapeutické využití probiotik	17
2.5. Používané bakteriální kmeny.....	18
2.5.1. Rod <i>Bifidobacterium</i>	19
2.5.2. Rod <i>Lactobacillus</i>	20
2.5.2.1. Význam laktobacilů	22
2.5.2.2. Kultivační vlastnosti.....	22
2.5.3. Rod <i>Streptococcus</i>	22
2.5.4. Rod <i>Lactococcus</i>	24
2.5.5. Rod <i>Enterococcus</i>	24
2.6. Prebiotika	25
2.6.1. Oligosacharidy	27

2.6.2.	Fruktooligosacharidy a inulin	27
2.6.3.	Galaktooligosacharidy.....	28
2.6.4.	Sójové oligosacharidy	29
2.6.5.	Laktulosa	30
2.6.6.	Laktitol	31
2.6.7.	Rezistentní škrob.....	31
2.7.	Synbiotika	32
2.8.	Metody identifikace mikroorganismů.....	32
3.	Cíl práce.....	34
4.	Materiál a metody.....	35
4.1.	Odběr vzorků	35
4.2.	Přehled vzorků	36
4.3.	Mikrobiologický rozbor	37
4.3.1.	Stanovení počtu mikroorganismů	37
4.3.2.	Příprava ředící řady	37
4.3.3.	Stanovení <i>Lactobacillus casei</i>	38
4.3.4.	Používané sbírkové kultury.....	38
4.3.5.	Složení a příprava kultivačních médií.....	39
4.3.6.	Kultivační podmínky.....	42
4.4.	Identifikace mikroorganismů	42
4.4.1.	API 50 CHL	42
4.4.1.1.	Postup zpracování API 50 CHL.....	43
4.4.2.	Izolace DNA.....	43
4.4.3.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	44
4.4.3.1.	Postup zpracování PCR.....	45
5.	Výsledky.....	46
6.	Diskuze	52

7. Závěr.....	56
8. Seznam literatury	57
9. Seznam použitých zkratek	64
10. Samostatné přílohy	65

1. Úvod

O důležitosti zdravé výživy v životě každého člověka dnes již nikdo nepochybuje. Současný uspěchaný životní styl však nepřeje tomu, aby se lidé stravovali podle vhodných doporučení. Dalším problémem je informovanost lidí o tom, co si pod pojmem zdravá výživa mají představit. Ať už jde o internet, televizi nebo různé časopisy, všude se pouze opisují články, o tom jak by měla zdravá výživa vypadat anebo jak zdravě hubnout. Bohužel kvalita těchto článků a informací je nízká a většinou jsou zařazovány jen za účelem zvýšení prodeje nebo sledovanosti.

Špatný životní styl, včetně špatné výživy, vede k rozvoji různých civilizačních onemocnění (kardiovaskulární choroby, rakovina, diabetes, zácpa, revmatické nemoci, obezita, cévní mozková příhoda). Těmto onemocněním můžeme předcházet konzumací funkčních potravin (mají kromě výživové hodnoty i jiný pozitivní účinek na zdraví) anebo doplňků stravy.

Do obou těchto skupin můžeme zařadit probiotika (funkční potravina – jogurt, doplněk stravy – probiotické kapsle). Probiotika jsou v současnosti hodně skloňovanou problematikou. Jde o probiotické bakterie, které se přirozeně vyskytují v našem těle. U těchto bakterií probíhají rozsáhlé vědecké studie kvůli jejich terapeutickým vlastnostem a pozitivním vlastnostem pro naše tělo. Mezi pozitivní funkce těchto bakterií patří např. redukce hnilobných bakterií ve střevě, tvorba mastných kyselin s krátkým řetězcem, snižování cholesterolu, tvorba některých vitaminů. Tyto funkce pak vedou k zabránění větších obtíží pro naše tělo.

Aby probiotika byla však v našem organismu funkční, musí splňovat určitá kritéria a zdravotní nezávadnost. U výrobků je např. dobré dodržet minimální hranici 10^6 KTJ životaschopných buněk v 1 ml nebo 1 g výrobku, aby byl zajištěn průchod žaludkem do tenkého a tlustého střeva.

Pro stanovování počtu probiotických bakterií se využívá kultivace na živných médiích a dále identifikace těchto mikroorganismů. Vzhledem k širokému spektru bakteriálních rodů není jednoduché tyto bakterie odlišit a identifikovat.

I nadále je třeba se funkcemi těchto probiotických bakterií a jejich přínosy pro lidský organismus zabývat a hledat nové bakteriální druhy, které budou splňovat kritéria pro probiotika.

2. Literární rešerše

Mikrobiologie je všeobecná věda o mikroskopických živých organismech, o jejich činnosti, tvaru (morfologii), stavbě (cytologii), fyziologii, biochemii, ekologii, rozmnožování, dědičnosti a proměnlivosti, systematice, fylogenezi a nakonec o jejich identifikaci a metodách zkoumání a posuzování (Görner a Valík, 2004).

Jako mikroorganismy označujeme jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy viditelné pouze mikroskopicky, které jsou schopny tvořit samostatné funkční jednotky. Z hlediska své struktury jsou mikroorganismy značně heterogenní skupinou, jejich společným znakem jsou velmi malé rozměry jejich těl, od několika desetin mikrometrů (μm) po několik desetin milimetrů (odtud název – *mikros* znamená řecky malý). Mezi mikroorganismy řadíme viry, bakterie, sinice (cyanobakterie), archea, prvoky, některé houby a řasy. Viry nemají buněčnou strukturu; bakterie, archea a sinice mají prokaryotický typ buňky, kdežto houby, řasy a prvoci mají eukaryotický typ buněk (Čechová a Janalíková, 2007).

Pod technickým termínem potravinářská mikrobiologie rozumíme širší obsah, který zahrnuje: mikrobiologii potravin, předměty denního užívání a prostředí potravinářských provozů (Görner a Valík, 2004).

Předmětem potravinářské mikrobiologie jsou mikroorganismy, které

- slouží na výrobu potravin,
- potraviny a předměty denního užívání znehodnocují,
- jsou přenášeny potravinami z nemocného zvířete, nebo nemocného člověka, bacilonosiče na vnímavého jedince (Görner a Valík, 2004).

Speciálním aspektem potravinářské mikrobiologie, který se úzce dotýká fermentační mikrobiologie, je vývoj, příprava, zkoumání, a vytváření podmínek pro příznivý účinek kulturních mikroorganismů na zušlechťování výrobků v mlékárenské technologii, konzervářském průmyslu, masovém průmyslu, uskladňování krmiv a jiných (Görner a Valík, 2004).

Ještě než člověk měl tušení o existenci mikroorganismů, už je uměl využívat a řídit jejich činnost ke svému prospěchu. Dlouhou historii má výroba alkoholických nápojů, kysaných mléčných nápojů, výroba sýra, octa, chleba, kyselého zelí. Lidé také dokázali využívat mikroorganismy při různých technologických procesech, např. zpracování kůží, máčení lnu. (Čechová a Janalíková, 2007).

2.1. Gastrointestinální trakt

Zpracování potravin GI systémem vede v konečném důsledku k zajištění energie pro tělní buňky a pomáhá při obnově tkání organismu. Esenciální živiny, voda a elektrolyty jsou převedeny z gastrointestinálního traktu do vnitřního prostředí organismu prostřednictvím řady mechanických a biochemických procesů. V rámci trávení se potrava rozkládá na jednodušší látky, které jsou dostatečně malé, aby mohly být absorbovány v těle.

Živiny jsou vstřebávány v lumen trávicího traktu, přes vrstvy epitelových buněk do krve nebo lymfy (Kailasapathy et al., 2011). Zažívací ústrojí lidského těla je přibližně 30 m dlouhé (Forsythe, 2010). Gastrointestinální trakt se skládá z: dutiny ústní, hltanu, jícnu, žaludku, tenkého střeva (duodenum, jejunum a ileum) a tlustého střeva (tračník a konečník). Připojenými orgány vylučující látky do GI jsou: slinné žlázy, játra, slinivka břišní, žlučník. Tyto orgány pomáhají při zpracování potravin a následnému štěpení. Připojené orgány se ovšem neřadí do gastrointestinálního traktu. Vylučované látky, včetně enzymů, mukózy, žlučových solí a kyselin, jsou ve vztahu k určitému místu v GI traktu a ovlivňují tak tuto oblast např. kyselina chlorovodíková vytváří kyselé prostředí v žaludku. Faktorů ovlivňujících účinnost trávení je mnoho, včetně zdraví hostitele a vnějšího prostředí (Kailasapathy et al., 2011).

Potrava je zpracovávána především hydrolýzou a fermentací umožňující vytvoření vhodných molekul, které mohou být absorbovány. Hydrolytické reakce probíhají za účasti různých enzymů, nacházejících se v celém gastrointestinálním traktu. Fermentační procesy v organismu mají za následek velké množství mikroorganismů, které napomáhají trávení nestravitelných látek. Do jaké míry hostitelská mikrobiota tomuto procesu napomáhá, je závislé na typu trávicí trubice hostitele (Kailasapathy et al., 2011).

Střevní trakt je obzvláště náchylný k mikrobiální penetraci a vstřebávání toxinů, v důsledku velké plochy, umožňující vysokou absorpci živin. Nicméně je také vybaven řadou obranných mechanismů (Forsythe, 2010).

GI trakt a jeho mikrobiální osídlení přispívá velkým dílem k celkovému zdravotnímu stavu člověka. Uvedený fakt využívali již ve starověku, kdy např. v Indii považovali stravu za důležitého činitele ovlivňujícího rychlost uzdravování při onemocnění.

V odborné literatuře je často uváděn termín mikrobiální ekosystém člověka. Je tím míněno kvalitativní i kvantitativní složení mikrobioty na různých místech trávicího ústrojí a výskyt různých biogenních a abiogenních faktorů ve stejných lokalitách a vzájemné ovlivňování těchto faktorů a mikrobioty.

Jako eubióza je označováno normální mikrobiální osídlení určitého biotypu v příslušné části trávicí trubice. To znamená, že mikrobiocenóza je se svým hostitelem v rovnováze. Jestliže se ovšem jakýmkoliv způsobem změní prostředí, dochází také ke změnám v mikrobiálním osídlení (Hrubý a Turek, 1989).

Střevní mikrobiota, jak již bylo naznačeno, je velice komplexní ekosystém, ve kterém existuje řada vzájemných vazeb. Pro jejich vymezení se nejčastěji používají termíny:

- Symbióza - označuje vztah, kdy mikroby jsou ve společné, velice úzké vzájemně výhodné asociaci v každém momentu jejich soužití, což v trávicí trubici nastává velmi omezeně.
- Mutualismus - termín postihuje vzájemně výhodnou asociaci.
- Komensalismus - výhodná asociace pouze pro jednoho účastníka bez škodlivého vlivu na druhého.
- Parasitismus - asociace, kdy jeden z účastníků žije na úkor druhého (Voříšek, 1989).

2.1.1. Mikrobiota v jednotlivých částech trávicího traktu

Gastrointestinální trakt člověka obsahuje více než 10^{14} mikroorganismů, je to mnohem více, než je celkový počet buněk v našem těle. Odhaduje se, že lidský GI trakt skrývá okolo 1000 druhů bakterií, ale pouze 30 – 40 druhů tvoří 95 % populace. Při normálních okolnostech je mikrobiální úroveň v tenkém střevě $10^{6-7}/g$ a v tlustém střevě $10^{9-10}/g$. Mezi převládající rody v tenkém střevě patří *Lactobacillus* spp. a *Enterococcus* spp., v tlustém střevě je několik rodů čeledi *Enterobacteriaceae*, různé rody *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp. (Ray and Bhunia, 2008). Během posledních let roste počet studií o bakterii *Faecalibacterium prauznitzii*, která představuje až 5% z celkové bakteriální populace ve střevě (Miquel et al., 2013).

Střevní mikroorganismy rozdělujeme na autochtonní a alochtonní. Alochtonní mikrobiota kolonizuje místa, kde došlo ke ztrátě původní mikrobioty (autochtoní) z různých důvodů jako jsou léčba antibiotiky, nevhodná strava, zánět (Ray and Bhunia, 2008).

V následující tabulce (Tab. 1) je uvedeno obecné kvalitativní a kvantitativní rozdělení mikroorganismů v trávicím traktu (Schulze et al., 2008)

Tab. 1: Kvantitativní a kvalitativní zastoupení (Schulze et al., 2008)

Žaludek a duodenum 10 ¹ – 10 ³ CFU	Jejunum a ileum 10 ⁴ – 10 ⁸ CFU	Kolon 10 ¹⁰ – 10 ¹² CFU
Laktobacily Streptokoky Kvasinky (<i>Candida albicans</i>) <i>Helicobacter pylori</i>	Laktobacily <i>E. coli</i> a jiné enterobakterie Streptokoky Enterokoky Bifidobakterie Fusobakterie <i>Faecalibacterium prauznitzii</i>	Bakteroidy Bifidobakterie Peptostreptokoky Eubakterie Fusobakterie Klostridie Veillonely <i>E. coli</i> Enterokoky Laktobacily Stafylokoky Pseudomonády Kvasinky (<i>Candida albicans</i>) <i>Faecalibacterium prauznitzii</i>

Podrobnější rozdělení střevního mikrobiomu nabízí následující tabulka č. 2.

Tab. 2: Lidská gastrointestinální mikrobiota podle Salminen et al. (2004)

	žaludek	Jejunum	ileum	Kolon
celkové množství bakterií (ml)	0- 10 ³	0- 10 ⁵	10 ³ - 10 ⁹	10 ¹⁰ - 10 ¹²
aeroby nebo fakultativní anaeroby				
koliformní bakterie	0- 10 ²	0- 10 ³	10 ² - 10 ⁷	10 ⁴ - 10 ¹⁰
streptokoky aerobní	0- 10 ³	0- 10 ⁴	10 ² - 10 ⁶	10 ⁵ - 10 ¹⁰
Stafylokoky	0- 10 ²	0- 10 ³	10 ² - 10 ⁵	10 ⁴ - 10 ⁹
Laktobacily	0- 10 ³	0- 10 ⁴	10 ² - 10 ⁵	10 ⁶ - 10 ¹⁰
plísň/kvasinky	0- 10 ²	0- 10 ²	10 ² - 10 ⁴	10 ⁴ - 10 ⁶
Anaeroby				
Bakteroidy	ojediněle	0- 10 ³	10 ³ - 10 ⁷	10 ¹⁰ - 10 ¹²
Bifidobakterie	ojediněle	0- 10 ³	10 ³ - 10 ⁸	10 ⁸ - 10 ¹¹
streptokoky anaerobní	ojediněle	0- 10 ³	10 ² - 10 ⁶	10 ¹⁰ - 10 ¹²
Klostridie	ojediněle	ojediněle	10 ² - 10 ⁴	10 ⁶ - 10 ¹¹
Eubakterie	ojediněle	ojediněle	ojediněle	10 ⁹ - 10 ¹²

Z přehledu vyplývá, že probíhá postupná proměna mikrobiálního ekosystému od převahy aerobů orálně k převaze anaerobů v aborálních oddílech. Jejich vzájemný poměr ukazuje tabulka č. 3 (Zbořil, 2005).

Tab. 3: Proměna mikrobiálního ekosystému

oddíl GIT	anaeroby : aeroby
tenké střevo	1 : 1
orální kolon	100 : 1
aborální kolon	1000 : 1

G. Gibson a M. Roberfroid nabízejí jiné schéma kvantitativní a kvalitativní struktury mikrobioty trávicího traktu s ohledem na potenciální patogenní efekt (Tab. 4). Rozlišují bakterie na potenciálně patogenní a projektivní (Zbořil, 2005)

Tab. 4: Rozdělení mikrobioty trávicího traktu s ohledem na patogenní efekt (Zbořil, 2005)

Průměrný kvantitativní výskyt v trávicím traktu (10^x ml)	Bakterie s patogenním potenciálem	Bakterie s projektivními vlivy
10^2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
10^2	Vibrionaceae	
10^2	Stafylokoky	
10^2	Klostridie	
10^6	Veilonely	
10^6	Enterobakterie	Enterobakterie
10^6	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
10^8		Laktobacily
10^{10}	Sulfobakterie	
10^{10}	anaerobní grampozitivní koky	anaerobní grampozitivní koky
10^{10}	Metanogeny	Metanogeny
10^{10}		Eubakterie
10^{10}		Bifidobakterie
10^{11}	Bakteroidy	Bakteroidy

2.1.2. Funkce fyziologické střevní mikrobioty

Klíčová role prospěšných mikroorganismů v GIT pro lidské zdraví byla dlouho opomíjena, a pozornost se soustředila pouze na střevní patogeny a faktory vedoucí k gastrointestinálním onemocněním (Goktepe et al., 2006).

Tab. 5: Hlavní funkce mikroorganismů v GIT (Kailasapathy et al., 2011)

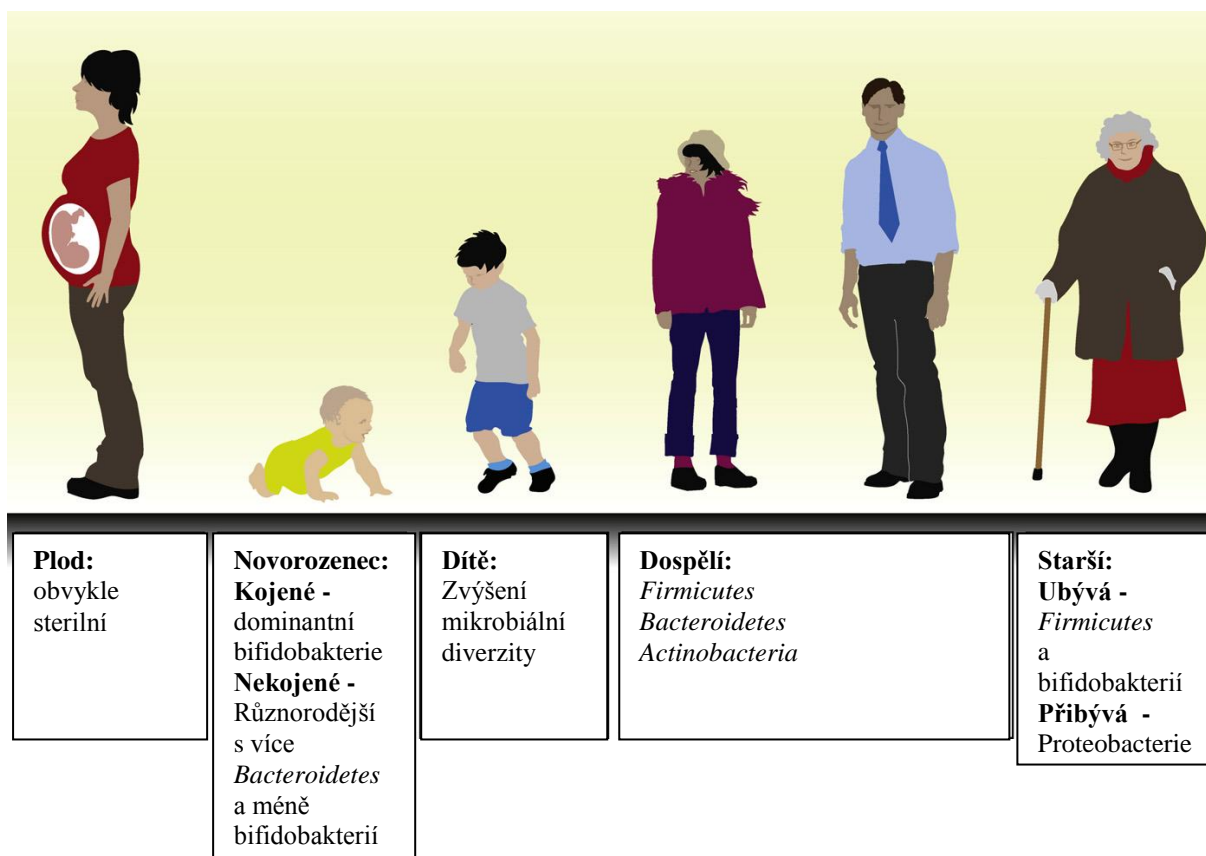
Funkce	Mikrobiální aktivita v GI traktu
Metabolické funkce	Fermentace nestravitelných zbytků potravy, tvorba mastných kyselin s krátkým řetězcem, produkce vitamínů skupiny B a K, vstřebávání vápníku, železa, atd.
Ochranné funkce	Kolonizační rezistence – zabránění uchycení a proliferaci patogenu.
Trofické funkce	Regulace epiteliální buněčné proliferace a diferenciaci.

Mikrobiota v gastrointestinálním traktu jsou spojena se stimulací imunitního systému, metabolismu potenciálních karcinogenních látek a s výrobou některých vitamínů skupiny B, trávicích a ochranných enzymů (Kailasapathy et al., 2011). Přibližně 80 % (10^{10}) buněk produkujících imunoglobuliny se nachází ve sliznici tenkého střeva (Goktepe et al., 2006).

Kolonizace střevní sliznice vhodnými mikroorganismy, tvoří ochranu před uchycením patogenních bakterií ve střevě. Kulturní střevní mikrobiota posiluje ochranu proti patogenům přirozenou konkurencí o živné látky, vitamíny, růstové faktory, obsazováním potencionálních vazebných míst a tvorbou fermentačních produktů (vliv na pH), které omezují jejich růst. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem okyselují prostředí tlustého střeva, čímž brání růstu potenciálně nebezpečných bakterií. Dále, produkuje antimikrobiální látky, jako je například bakteriocin, který inhibuje růst jiných bakterií. V případech kdy je narušena rovnováha mezi střevními mikroorganismy, může se stát původně komenzální druh patogenním, např. *Candida* spp. a *Clostridium* spp., v malých množstvích jsou neškodné, ale při oslabení dojde k podpoře jejich růstu (Kailasapathy et al., 2011).

2.2. Střevní mikrobiota v průběhu života

Tab. 6: Hlavní změny mikrobioty trávicího traktu v průběhu života (Dias et al., 2009)



2.2.1. Kolonizace GIT v dětství

V děloze je lidský plod mikrobiologicky sterilní (Forsythe, 2010). Martín et al. (2004) poukazuje na to, že k osídlení traktu může dojít v menší míře ještě před narozením plodu. Některé bakterie mléčného kvašení byly izolovány z placenty, amniové tekutiny, smolky zdravých novorozenců před prvním kojením a pupečnickové šňůry, včetně těch narozených císařským řezem (Martín et al., 2004). Zdrojem bifidobakterií pro novorozence je podle některých studií mateřské mléko (Bronský, 2009). V průběhu porodu novorozenec získává mikroorganismy z pochvy, kontaktu s životním prostředím, ze zdroje potravy. V důsledku toho se vytvoří komplexní mikrobiota. Brzy po narození jsou ve vzorku stolice detekovatelné fakultativně anaerobní bakterie. Tyto mikroorganismy odstraní kyslík a následně sníží oxidačně – redukční potenciál a umožní růst striktně anaerobním mikroorganismům. Při přirozeném porodu jsou první kolonizační bakterie mateřského původu. Při porodu císařským řezem dochází k první kolonizaci mikroorganismy od personálu nemocnice a prostředí. Následně je kolonizace ovlivňována stravou (Forsythe, 2010).

Bronský (2009) uvádí, že mateřské mléko není nutně sterilní a může obsahovat nízké počty bakterií rodu *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bifidobacterium* spp.. Rada et al. (2009) uvádí, že mateřské mléko není primárním zdrojem bifidobakterií pro kojence. Mateřské mléko uvnitř mléčné žlázy je sterilní stejně, jako je tomu i u ostatních savců. Bakterie v mateřském mléku jsou s největší pravděpodobností přítomny jako sekundární kontaminace.

U dětí kojených dochází častěji ke kolonizaci bakteriemi rodu *Staphylococcus* spp. z důvodu zvýšeného kontaktu s matčinou pokožkou (Forsythe, 2010). U dětí krmených umělou výživou dochází ke kolonizaci mnohem složitější, ale méně žádoucí, mikrobiotou. Ta je ve vyšším množství zastoupena patogenními bakteriemi rodů *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp. a *Streptococcus* spp. (Zbořil, 2005). Další změna přichází s podáváním pevné stravy dítěti, kdy se začíná mikrobiota více podobat té v dospělosti. K ustálení složení střevních mikroorganismů dochází přibližně ve dvou letech věku (Ray and Bhunia, 2008).

V případech, kdy nedojde ke správnému osídlení trávicího traktu v kojeneckém věku, především probiotickými kmeny bakterií, může dojít k rozvoji řady onemocnění, mezi něž patří průjemová onemocnění a alergie (Nováková et al., 2009)

2.2.2. Mikrobiota v dospělosti

U dospělých osob je trávicí trakt osídlen četnými a různorodými bakteriemi. Konkrétní složení se u jednotlivých osob liší a je ovlivněno řadou faktorů. Mezi nejběžnější bakterie patří bakteroidy, bifidobakterie, eubakterie, laktobacily a klostridia (Kalač, 2003).

Strava je jedním z hlavních faktorů ovlivňující gastrointestinální střevní mikrobiotu. U osob se stravou bohatou na sacharidy a tuky bývá vyšší počet bakteroidů, klostridií, bifidobakterií a peptokoků. U osob konzumujících nízkotučné potraviny a více vlákniny jsou zjišťovány vyšší počty laktobacilů a klebsiel. Při pravidelném doplňování stravy fermentovanými výrobky se zvyšuje ve střevech počet probiotických bakterií.

Vliv na složení střevní mikrobioty má také geografická poloha (Zbořil, 2005).

2.2.3. Mikrobiota ve stáří

Ve vyšším věku, zejména po 65. roku, se složení střevní mikrobioty nepříznivě mění. K největším změnám dochází u tlustého střeva. Klesá počet bifidobakterií a dalších mléčných

bakterií a vzrůstá počet zdravotně problematických mikroorganismů, zejména enterobakterií (Kalač, 2003).

U starších osob je nalézáno také větší množství kvasinek *Candida albicans*. Současně je častější vznik zánětů a snižuje se schopnost produkovat a přijímat vitamíny a stopové prvky (Zbořil, 2005)

2.2.4. Vliv probiotik a prebiotik při podávání kojencům

Výsledky mnoha klinických studií, ve kterých byla probiotika podávána dětem, umožňují konstatovat, že probiotika mají řadu doložených indikací.

Byl zaznamenán mírný pozitivní vliv podávání probiotik v prevenci akutních infekčních gastrointestinálních onemocnění u jinak zdravých dětí, kde nejčastější příčinou onemocnění byly rotaviry. V mnoha studiích bylo prokázáno, že probiotika snižují počet průjemových stolic a zkracují dobu trvání onemocnění přibližně o jeden den. Účinek je však závislý na použitém probiotiku a jeho dávce, která by neměla být menší než 10^{10} CFU (Guarino a kol, 2008).

Velký význam mohou probiotika mít při prevenci atopického onemocnění. Podávání probiotika *Lactobacillus rhamnosus* GG matce 4 týdny před porodem a 6 měsíců dítěti po porodu snížilo výskyt atopického ekzému ve 2, 4 a 7 letech (Kalliomäki et al., 2007).

Dalším onemocněním, kde mohou být probiotika užitečná, je nekrotizující enterokolitida. Na vzniku tohoto onemocnění se podílí nedonošenost, enterální výživa a bakteriální kolonizace. Preventivní podávání probiotik významným způsobem snižuje riziko těžké nekrotizující enterokolitidy a mortality u nedonošených dětí s hmotností vyšší než 1000 g. Ve studiích byla použita různá probiotika jako *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium infantis* (Deshpande et al. 2010).

Probiotika mohou mít pozitivní vliv u kojeneckých kolik. U dětí s kojeneckými kolikami je ve střevech více koliformních bakterií a méně laktobacilů. Laktobacily ovlivňují motilitu a vnímání bolesti. V tomto případě se v mnoha studiích pozitivně využila probiotická bakterie *Lactobacillus reuteri* (Savino et al., 2008).

V současnosti také probíhají studie o využití probiotik v dutině ústní. Tato probiotika mohou významně snižovat množství patogenů působících zubní kaz a periodontální onemocnění.

2.3. Funkční potraviny

Funkční potravina je jakákoli potravina, která má kromě výživové hodnoty příznivý účinek na zdraví konzumenta, jeho fyzický či duševní stav. Je to potravina (nikoli tableta nebo prášek) vyrobená z přírodně se vyskytujících složek. Měla by se konzumovat jako součást denní stravy (Goldberg, 1994).

Potraviny jsou primárně hodnoceny podle jejich nutriční hodnoty. Jinými slovy, nejdůležitějším faktorem pro hodnocení potravin je jejich funkce primární tj. při poskytování standardních živin.

Sekundární funkcí potravin je její chuť, vzhled, struktura, vůně. Kromě těchto funkcí je velká pozornost věnována funkcím terciárním.

Terciární funkce potraviny prospěšně ovlivňují jednu nebo více biologických funkcí v těle. Příklady terciární funkční vlastnosti potravin, které byly studovány je antikarcinogenita, antimutagenita, antioxidační činnost. Vzhledem ke zhoršujícímu se zdraví současné populace je velká snaha potravinářského průmyslu v mnoha zemích rozvíjet nové potraviny s těmito funkcemi (Goldberg, 1994).

Potraviny s terciárními funkcemi jsou označovány jako funkční potraviny (Goldberg, 1994). Tento pojem byl vytvořen v Japonsku na počátku roku 1980 (Arihara, 2006). Jde tedy o potraviny, které mimo své základní funkce nasycení a výživy organismu mají i další vlastnosti pozitivně ovlivňující zdraví a vitalitu člověka (Kuchta a Pružinec, 2006).

Funkční potraviny by se měly konzumovat jako součást denní stravy (Goldberg, 1994). Cílem funkčních potravin není léčení chorob ve stádiu jejich propuknutí, jako je tomu u léků, ale předcházení těmto chorobám. Jejich účinek je také pozorovatelný v delším časovém horizontu (až 10 let) než je tomu u léků. Je tedy nutné je konzumovat pravidelně a delší časové období (Vlková et al., 2009). Jejich konzumace může ovlivnit některé pochody v organismu, zejména:

- posílit přirozené obranné mechanismy proti škodlivým vlivům prostředí
- působit preventivně proti nemocem
- příznivě ovlivňovat fyzický a duševní stav
- zpomalovat proces stárnutí (Goldberg, 1994).

Potraviny, které mohou být funkčními potravinami, jsou:

- přírodní potraviny, jako je ovoce nebo obilí, které mohou, ale nemusí být modifikovány z důvodu zvýšení obsahu nějaké látky (např. lykopen, vitamin E, obohacené rostlinné oleje, obohacená rýže)
- potraviny, u nichž byla nějaká látka doplněna (např. margaríny s přidanými fytosteroly)
- potraviny, u kterých byla složka odstraněna nebo snížen její objem (např. jogurt se sníženým obsahem tuku)
- potraviny, v nichž je jeden nebo více složek, které byly upraveny, nahrazeny nebo zvětšen jejich obsah s cílem zlepšit vlastnost pro zdraví jako např. šřáva se zvýšeným obsahem antioxidantů, jogurt s přidanými probiotiky a prebiotiky (European Commission, 2010).

Legislativa se u mladé a bouřlivě se rozvíjející problematiky funkčních potravin a nutraceutik rodí pomalu. Její sjednocení v rámci Evropské unie je nedořešeno. Přitom musí být legislativně vymezeno zejména:

- které potraviny mohou být deklarovány jako funkční,
- které prokázané zdravotní přínosy mohou být deklarovány na obalech,
- co deklarovat na obalech – které účinné složky jsou přítomny a v jakém obsahu (Kalač, 2003).

2.4. Probiotika

2.4.1. Historie probiotik

Flemingovo zjištění, že některé metabolické produkty plísně *Penicillium* omezují růst patogenních mikroorganismů, vedlo k zavedení termínu antibiotický (anti = proti, bios = život) (Voříšek, 1989).

Pojem probiotika bylo původně používáno jako antonymum ke slovu antibiotikum. To je odvozeno z řeckých slov pro a bios (Vasiljevic and Shah, 2008). Probióza označuje symbiotickou asociaci dvou organismů žijících společně a poskytujících si vzájemně výhody (Voříšek, 1989).

Poprvé upozornil na probiotickou aktivitu laureát Nobelovy ceny Metchnikoff při studiu stimulace tkáňových a krevních buněk v roce 1907. Metchnikoff si všiml, že se Bulharští zemědělci dožívají poměrně vysokého věku. Svojí teorii dlouhověkosti spojoval s vysokou konzumací kysaných mléčných výrobků obsahující bakterie *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Metchnikoff ve svém experimentu vyslovil teorii, že bakterie *Lactobacillus bulgaricus* by mohla kolonizovat trávicí trakt a zabránit tak množení a zvyšování počtu hnilobných bakterií (Vasiljevic and Shah, 2008).

V roce 1930 se podařilo japonskému vědci Minoru Shirota izolovat a kultivovat *Lactobacillus casei* kmen Shirota z dětské stolice. O 5 let později byl kmen použit pro výrobu fermentovaného mléčného výrobku, který inicioval založení společnosti s názvem Yakult (Vasiljevic and Shah, 2008).

Ve stejné době francouzský pediatr Henry Tissier poznamenal, že děti při průjmovém onemocnění mají málo G^+ bakterií ve tvaru Y, přičemž tyto bakterie jsou u zdravých dětí ve stolici dominantní (Butel, 2013).

Jako první použili pojem probiotika Lilly a Stillwell v roce 1965. Označil termínem probiotika látku produkovanou jedním prvokem, která stimulovala růst jiného prvoka. Později byl tento termín používán pro krmné a potravní doplňky určené pro výživu zvířat a lidí.

Parker v roce 1974 navrhl zahrnout do termínu probiotika interakci mezi mikroorganismem a hostitelem. Termín probiotika byl použit pro organizmy a substance, které mají příznivý vliv na mikroorganismy ve střevě.

Fuller v roce 1989 formuloval definici, která s postupným zpřesňováním platí dodnes. „Probiotika jsou živé mikrobiální krmné a potravní doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenózy.“

Havenaar a Huis in't Veld v roce 1992 probiotika definovali jako mono nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které, jestliže se aplikují člověku nebo zvířeti, prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikrobioty (Kun Lee and Salminen, 2009).

Nejnovější výzkumy však ukazují, že nejenom živé mikroorganismy, ale i jejich neživé formy a určité složky buněčných stěn mikroorganismů pravděpodobně mohou ovlivňovat hostitele (Kvasničková, 2000).

2.4.2. Definice probiotik

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele (FAO/WHO, 2001)

Mimo pozitivního vlivu na lidské zdraví musí probiotika splňovat i některá další kritéria, jak je uvedeno v tabulce č. 7 (Nevoral, 2005).

Tab. 7: Kritéria pro výběr probiotických mikroorganismů (Kailasapathy et al., 2011)

	Požadované vlastnosti	
1	Lidský původ	Důležité pro specifické přínosy pro zdraví, správná kolonizace v GIT.
2	Odolnost proti žaludečním kyselinám a žluči	Předpoklad pro přežití při průchodu trávicím traktem.
3	Bezpečnost pro lidské zdraví	Nepatogenní, geneticky stabilní, netoxické, bez alergických reakcí.
4	Adheze na povrch střevní sliznice	Klíčový faktor pro stimulaci imunity, konkurenční boj s patogenem.
5	Přežití průchodu GIT	Základní požadavek pro rozvoj zdravotních výhod, aktivita v GIT, odolnost proti degradaci trávicími enzymy.
6	Ověřené přínosy pro zdraví	Produkce vitamínů, zlepšení laktosové intolerance, úprava cholesterolu, modulace imunitní odpovědi.
7	Dobré vlastnosti při zpracování	Kultivovatelné ve velkém počtu, přežití zpracování a skladování, bez negativního efektu na produkty, do kterých se přidávají.

Mezi nejčastěji používanými bakteriálními rody jsou mléčné bakterie, zejména rody *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp. Dalšími používanými rody jsou také *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. atd. (Butel, 2013). Důvodem jejich využití je dlouhodobá zkušenost s těmito bakteriemi v mlékárenském průmyslu, při produkci siláže, dále jejich relativně snadná kultivace a v drtivé většině nepatogenní charakter (Vlková et al., 2009).

Většina těchto mikroorganismů byla izolována z mléčných fermentovaných výrobků, jako je kefir, Maasai mléko, Kurut. Tyto fermentované výrobky jsou nejdůležitějším zdrojem, protože mohou obsahovat široké spektrum druhů mléčných bakterií. Některé kmeny byly izolovány i z mateřského mléka jako např. *Lactobacillus fermentum*. Dalším zdrojem těchto bakterií s probiotickými vlastnostmi je trávicí trakt zdravých dětí a dospělých. Kmeny s pozitivními vlastnostmi byly také izolovány trávicího traktu zvířat (včely, ryby, krevety atd.), ale také z fermentovaných (fermentované salámy, klobásy, zelenina) potravin (Butel, 2013).

Do probiotik mohou být zařazeny i další rody, které nepatří pod bakterie mléčného kvašení. *Escherichia coli* nebo *Propionibacterium* spp. jsou také kmeny s pozitivními vlastnostmi, ale zároveň představují vyšší potencionální riziko nežádoucích účinků. Tyto bakterie jsou tedy méně často používané (Butel, 2013).

Probiotické vlastnosti mají nejen bakterie, ale i kvasinky. Kvasinka *Saccharomyces boulardii* se už několik desetiletí také používá jako probiotikum (Butel, 2013).

Na místo původně používaných mlékárenských kultur se nyní upřednostňují bakterie izolované z trávicího traktu (Vlková et al., 2009).

Mechanismy působení probiotik nejsou doposud dobře prokázané, což je jeden z problémů, kterým se zabývá Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA). Tento úřad zatím žádnému probiotiku neschválil zdravotní tvrzení (Butel, 2013).

Možné mechanismy působení probiotik:

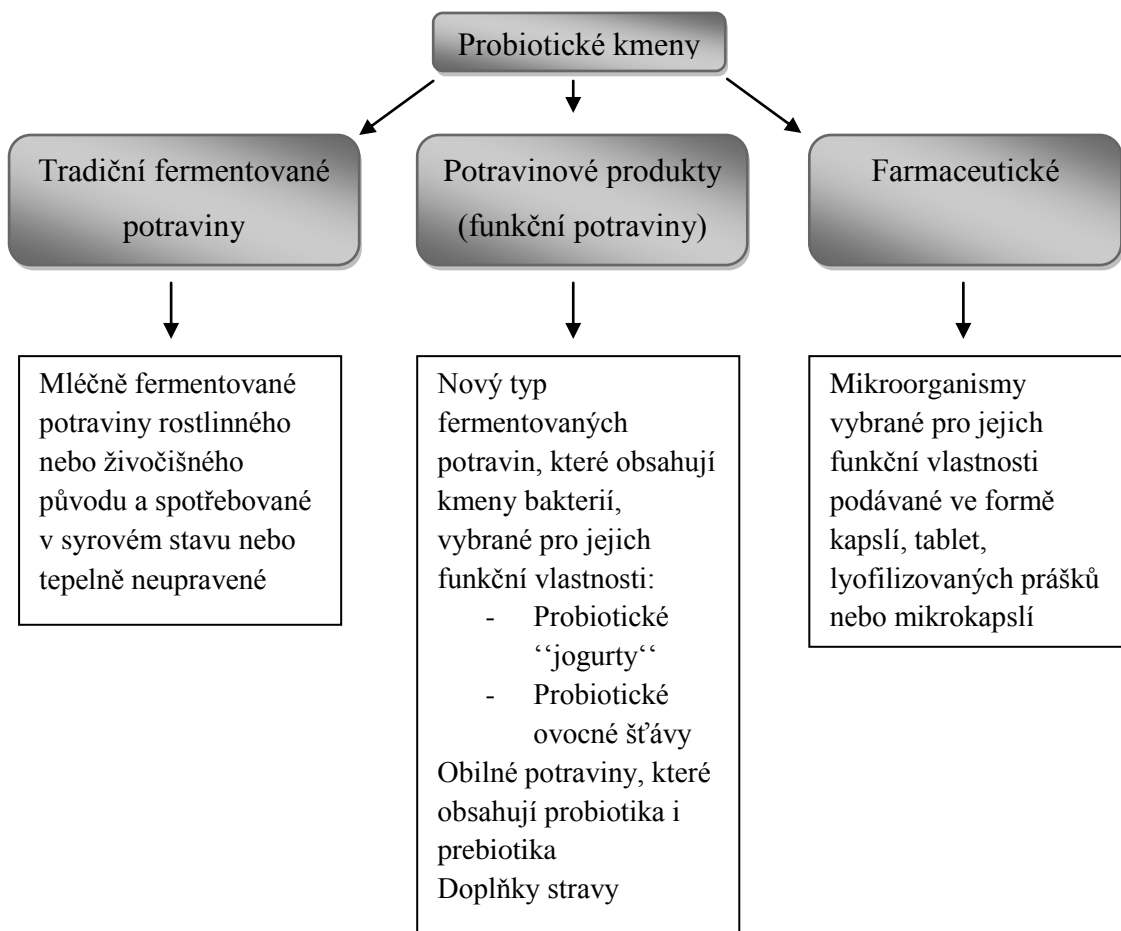
- Stabilizace mikrobiomu kompeticí s patogenními mikroorganismy o vazebná místa na receptorech o živiny
- Produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (zvl. kyselina máselná)
- Pokles pH střevního obsahu
- Zvýšení rozpustnosti minerálních látek
- Omezení zpětné resorpce žlučových kyselin
- Stabilizace střevní slizniční bariéry, úprava střevní permeability
- Produkce antimikrobiálních substancí
- Modifikace toxinů a toxinových receptorů
- Stimulace imunitní odpovědi na patogeny, např. zvýšená produkce sekrečního IgA, IgG, IgM, protizánětlivě působících cytokinů IL – 10, TGF – β ; snížená produkce protizánětlivých cytokinů TNF – α , interferonu – γ stejně jako mediátorů zánětu, např. matrixmetalloproteináz (Butel, 2013).

2.4.3. Formy probiotik

Probiotika (jak je znázorněno na schématu) jsou k dispozici a můžou být podávána v různých formách, zahrnující zejména kvašené potraviny a farmaceutické výrobky, které mohou být ve formě kapslí, mikrokapslí nebo rozpustných prášků (Goktepe et al., 2006).

Probiotické kultury jsou z velké míry využívány do výrobků v mléčném průmyslu, kde slouží jako nástroj pro rozvoj a vznik nových produktů. Tradičně jsou probiotika využívána do jogurtů, ale v současnosti jsou nosičem probiotik také např. majonézy, pomazánky, maso. Probiotickými mikroorganismy jsou také fortifikovány ovocné šťávy, zmrzliny, müsli tyčinky (Vasiljevic and Shah, 2008).

Za minimální denní dávku, aby probiotika byla účinná v našem těle, se považuje 10^6 – 10^9 CFU (Sýkora et al., 2006).



2.4.4. Terapeutické využití probiotik

Jednou z hlavních oblastí aplikace probiotik je léčba nebo prevence průjmů spojených s antibiotiky. Tyto průjmy jsou často spojeny s bakterií *Clostridium difficile*, která se v malém množství v trávicím traktu nachází běžně. Léčba antibiotiky vede k narušení mikrobiální rovnováhy a následnému zvětšení počtu *C. difficile* a tvorbě toxinu. Podávání probiotik je nutné k obnovení rovnováhy střevních mikroorganismů. Použití probiotik při léčbě antibiotiky snižuje riziko průjmu o 52 %, riziko cestovatelských průjmů o 8 % a riziko akutního průjmu z různých příčin o 34 %. Při studiích byly zkoušeny kmeny *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. boulardii*. Všechny tyto kmeny vykazovaly podobné účinky (Vasiljevic and Shah, 2008).

Prevence a léčba alergií je další oblast, v které probiotika mohou projevit svou prospěšnou roli. Zpožděné kolonizace bakteriemi rodu *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp. v gastrointestinálním traktu dětí, může být jedním z důvodů alergických reakcí. Také rozdíly v GIT mikrobiotě mohou hrát roli v citlivosti na alergie. Kojenci s atopickým ekzémem měli v trávicím traktu bakterie rodu *Bifidobacterium* spp. typické pro trávicí trakt starších lidí. Zdravé děti měly GIT kolonizován bakterií *Bifidobacterium bifidum* typickou pro kojené děti. Několik studií prokázalo, že *Lactobacillus* GG podávaný matce a následně dítěti může snížit riziko výskytu atopického ekzému (Vasiljevic and Shah, 2008).

Crohnova choroba a ulcerózní kolitida jsou chronická onemocnění zatím neobjasněného původu. Pacienti trpí vředy tenkého střeva a sliznice tlustého střeva, kdy se střídají období obtíží s obdobími relativního klidu (remise). U pacientů dochází k disbióze a snížení mikrobiální diverzity. Použití klasických probiotických kmenů v některých studiích nevedlo k pozitivním výsledkům. Při použití bakterie *Escherichia coli* Nissle 1917 nebo kvasinky *S. boulardii* vedlo k zmírnění příznaků v obdobích aktivity a prodloužení období remise (Butel, 2013).

V některých *in vitro* studiích byl zjišťován účinek probiotik proti bakterii *Helicobacter pylori*, způsobující žaludeční vředy a rakovinu žaludku. Výsledky zatím nejsou tak významné z důvodu malého počtu klinických studií a malého počtu pacientů. Při použití kvasinky *S. boulardii* byly výsledky pozitivní (Butel, 2013).

Kolorektální karcinom je u nás nejčastějším karcinomem trávicího traktu. Už delší čas je akceptována představa, že bakterie sehrávají významnou úlohu v procesu jeho vzniku a vývoje. Epidemiologické studie zjistily zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu u pacientů, u kterých střevní flóra obsahovala zvýšené množství bakterií rodu *Bacterioides* spp., a naopak, snížené riziko při kolonizaci laktobacily a eubakteriemi.

Střevní mikrobiota může ovlivnit kolorektální karcinogenezi produkcí enzymů, které transformují prokarcinogeny na aktivní karcinogeny. Mezi ty patří β - glukuronidasa, glykosidasa, azoreduktasa, nitroreduktasa. Mezi hlavní mechanismy, kterým mikrobiota ovlivňuje vývoj karcinomu, patří dekonjugace žlučových kyselin a tvorba sekundárních žlučových kyselin, aktivace prokarcinogenů, fermentace vedoucí k tvorbě mastných kyselin s krátkým řetězcem, tvorba diacylglycerolu a adsorpce hydrofobních molekul (Čokášová et al., 2010).

Ischemická choroba srdce je choroba, kterou způsobuje nedostatek kyslíku (ischemii) v srdečním svalu, tj. přívod kyslíku do srdečního svalu je menší, než jeho potřeba. U nemocného se může projevovat jako angina pectoris, porucha srdečního rytmu, selhání srdce nebo se nemusí projevit vůbec. K nejčastějším a nejrizikovějším faktorům patří zvýšená koncentrace cholesterolu v krvi, zvýšení krevní tlak, kouření, zvýšená koncentrace cukru v krvi. Vysoký výskyt kardiovaskulárních chorob vede k četným preventivním opatřením. V polovině 80. Let se prokázal význam snížení LDL – cholesterolu ve snižování rizika vzniku ischemické choroby srdce. K neznámějším mechanismům, kterým probiotika snižují koncentraci plazmatického cholesterolu, patří přímá degradace a utilizace cholesterolu probiotikami, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, vazba části cholesterolu na mikroorganismy, s kterými je následně vyloučen (Čokášová et al., 2010).

Probiotika lze kladně využít i v oblasti narušení bakteriální flóry urogenitálního traktu. Za úspěšné se považují kmeny *L. casei Shirota*, *L. fermentum* RC – 14 a další laktobacily. Jejich využití je možné nejen při bakteriálních infekcích, ale i při mykózách (vulvovaginitidy způsobené rodem *Candida* spp.) (Hronek et al., 2006)

2.5. Používané bakteriální kmeny

Mezi nejčastěji používané bakteriální rody patří *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. a *Lactococcus* spp. Jednotlivé vlastnosti a charakteristiky rodů jsou rozepsány v následujících oddílech.

2.5.1. Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie byly poprvé izolovány ze stolice kojených dětí v roce 1899 vědcem Henri Tisierem, který je označil jako *Bacillus bifidus*. I když v roce 1924 navrhl Orla – Jensen rod *Bifidobacterium*, byly bifidobakterie řazeny do jiných taxonomických skupin, jako je *Bacillus bifidus* (1900), *Bacteroides bifidus* (1923 – 1934) a *Lactobacillus bifidus* (1939 – 1957). V roce 1973 a následně v osmém vydání Bergey's Manual došlo k překlasifikování a ustanovení rodu *Bifidobacterium* spp., který se skládal z 11 druhů. Scardovi v roce 1986 aktualizoval seznam druhů na 24 a v současnosti se rod *Bifidobacterium* spp. skládá z 31 druhů (Lee and O'Sullivan, 2010).

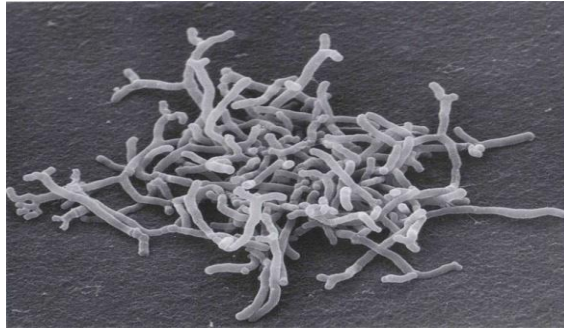
Tento rod se řadí mezi grampozitivní bakterie a je součástí kmene *Actinobacteria*, třída *Actinobacteria*, podtřída *Actinobacteridae*, řád *Bifidobacteriales*, čeleď *Bifidobacterium*. Podle DSMZ německé sbírky mikroorganismů je v současnosti do rodu *Bifidobacterium* spp. zahrnuto 29 druhů (Kun Lee and Salminen, 2009).

Buňky jsou grampozitivní tyčinky různých tvarů a velikostí, přítomné jako jednotlivé buňky, nebo v řetízcích různých velikostí. Jsou nesporelující, nepohyblivé a anaerobní, i když některé z nich tolerují malé koncentrace O₂ v přítomnosti CO₂ (Ray and Bhunia, 2008). Bakterie *B. animalis* subs. *lactis* dokáže tolerovat 10 % kyslíku (Jardine, 2009). Optimální teplota pro růst je 37 – 41 °C (Ray and Bhunia, 2008). *B. bifidum* přežívá teploty do 60 °C (Salminen et al., 2004). Jejich optimální hodnota pH pro růst je 6,5 až 7,0; nerostou při pH 5,0 až 4,5 a 8,0 až 8,5 (Görner a Valík, 2004).

Charakteristická je u těchto bakterií tvorba acetátu a laktátu (v poměru 3:2) ze sacharidů, za současné produkce malého množství etanolu, sukcinátu a mravenčanu (Šilhánková, 2008).

Bifidobakterie byly izolovány ze stolice lidí, zvířat a ptáků, a jsou považovány za prospěšné pro normální zdraví trávicího traktu. Obvykle se nacházejí v tlustém střevě. Ve velkém množství jsou nalézány u dětí 2 – 3 dny po porodu. U dětí se nacházejí především druhy *B. infantis*, *B. breve* a *B. longum* (Obr. 1), zatímco u dospělých jde spíše o druhy *B. adolescentis* a *B. longum* (Maxa a Rada, 1996).

Bifidobakterie lze kultivovat na speciálních médiích za anaerobních podmínek. Typické médium pro kultivaci (TPY) obsahuje: tryptikasu, fyton, glukosu, kvasniční autolyzát a soli manganu, železa, zinku a vápníku také Tween 80, cystein hydrochlorid a agar; pH 6,5. Identifikace rodu se uskutečňuje na základě mikroskopického obrazu buněk, tvaru kolonií a růstu na specifických médiích (Görner a Valík, 2004).



Obr. 1. *Bifidobacterium longum*
www.jpkc.njau.edu.cn

2.5.2. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* spp. je největší skupinou mezi bakteriemi mléčného kvašení, v současné době zahrnuje více než 120 druhů a 20 poddruhů. Jsou zahrnuty v kmeni *Firmicutes*, třídě *Bacilli*, řád *Lactobacillales*, čeleď *Lactobacillaceae* (Kun Lee and Salminen, 2009).

Rod byl poprvé popsán v roce 1901 Beijerinckem (Görner a Valík, 2004). V roce 1919 laktobacily roztřídil Orla-Jensen do tří skupin (termobakterie, streptobakterie, betabakterie) a to podle jejich růstové teploty a podle morfologických a fenotypových rysů (Plocková a Březina, 1988). Na základě jejich fermentace hexos a pentos byly rozděleny do tří skupin, jak je uvedeno v tabulce č. 8 (Ray and Bhunia, 2008).

Rod zahrnuje různorodou skupinu grampozitivních, tyčinkovitých, obvykle nepohyblivých, nesporulujících, fakultativně anaerobních druhů, které se velmi liší svojí morfologií růstu a metabolickými vlastnostmi. Buňky mohou být velmi krátké až velmi dlouhé tyčinky, tenké nebo středně silné, často ohnuté, a mohou být jednotlivé nebo spojené v řetízky (Ray and Bhunia, 2008).

Při fermentaci glukosy, v závislosti na druhu, produkují jen kyselinu mléčnou jako svůj hlavní metabolit nebo produkují kyselinu mléčnou, etanol, kyselinu octovou a CO₂. Některé druhy také produkují diacetyl. Mnoho druhů využívá také laktosu, sacharosu, fruktosu nebo galaktosu a některé druhy mohou fermentovat i pentosy. Vhodná teplota pro růst se může lišit od 1 do 50 °C, většina druhů ale dobře roste při teplotách 20 – 40 °C. Laktobacily rostou nejlépe ve slabě kyselém prostředí pH 4,5 – 6,4. Růst se zastavuje při pH 3,6 – 4,0 (Ray and Bhunia, 2008).

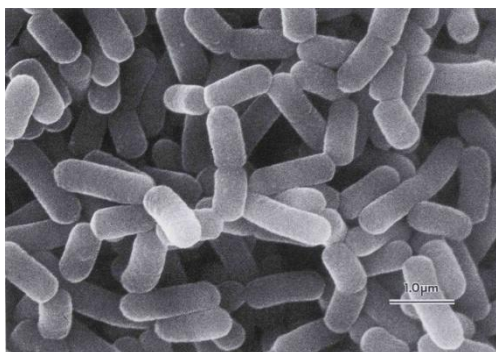
Tab. 8: Rozdělení laktobacilů (Ray and Bhunia, 2008)

Charakteristika	Skupina I	Skupina II	Skupina III
Předchozí označení	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>Betabacterium</i>
Fermentace sacharidů	Obligátně homofermentativní	Fakultativně heterofermentativní	Obligátně heterofermentativní
Produkty fermentace	Kyselina mléčná	Kys. mléčná nebo kys. mléčná, octová, ethanol, CO ₂	Kyselina mléčná, octová, ethanol, CO ₂
Fermentace pentóz	-	+	+
Druhy	<i>Lab. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> , <i>Lab. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lab. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lab. plantarum</i> <i>Lab. curvatus</i> <i>Lab. sake</i>	<i>Lab. casei</i> ssp. <i>casei</i> , <i>rhamnosus</i> , <i>pseudoplantarum</i> <i>Lab. divergenes</i> <i>Lab. kefir</i> <i>Lab. confuses</i>	<i>Lab. fermentum</i>

Skupina I: Hexosy fermentují na kyselinu mléčnou a pentosy a glukonáty nefermentují.

Skupina II: Podle množství a druhu sacharidu produkují buď výlučně kyselinu mléčnou nebo kyselinu mléčnou a další produkty (kyselinu octovou, etanol, kyselinu mravenčí, CO₂).

Skupina III: Hexosy fermentují na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a CO₂. Pentosy fermentují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou (Ray and Bhunia, 2008).



Obr. 2. *Lactobacillus casei*
www.jpkc.njau.edu.cn

2.5.2.1. Význam laktobacilů

Tři poddruhy *Lactobacillus delbrueckii* ssp. se používají při fermentaci mléčných výrobků, jako jsou některé druhy sýrů a jogurty. Dobře rostou při 45 °C a fermentují laktosu za vzniku velkého množství D (-) kyseliny mléčné. Základním enzymem těchto poddruhů je β – galaktosidasa. *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus reuteri* jsou prospěšné střevní mikroorganismy, které jsou přítomny v tenkém střevě. *L. acidophilus* se používá při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, a také se přidává do pasterovaného mléka, probiotických kapslí. Metabolizuje laktosu a vytváří velké množství D (-) kyseliny mléčné. *Lactobacillus helveticus* se používá při výrobě sýrů a fermentuje laktosu na kyselinu mléčnou. *Lactobacillus casei* ssp. *casei* (Obr. 2) je součástí fermentovaných mléčných výrobků. Štěpí laktosu na L (+) kyselinu mléčnou. Některé kmeny jsou využívány jako probiotické bakterie. *Lactobacillus plantarum* se používá při fermentaci masa a zeleniny. Produkuje DL – kyselinu mléčnou. *L. curvatus* a *L. sake* může růst při teplotách (2 – 4 °C) a využívá se při fermentaci zeleniny a masa. *Lactobacillus sake* se používá pro fermentaci vína saké. *Lactobacillus kefir* je důležitý při výrobě kefiru (Ray and Bhunia, 2008).

Některé druhy laktobacilů produkují bakteriociny jako, např. *L. acidophilus* – laktocín B, *L. fermentum* – laktocín LP 27 (Görner a Valík, 2004).

2.5.2.2. Kultivační vlastnosti

Rogosa a MRS agary byly primárně vyvinuty pro kultivaci laktobacilů z různých zdrojů. Využívají se pro kultivaci celé skupiny bakterií mléčného kvašení (De Man et al, 2003).

Podle normy ČSN 56 0094 se ke stanovení bakterií rodu *Lactobacillus* spp. v potravinách využívá živná půda MRS.

2.5.3. Rod *Streptococcus*

V taxonomii Streptokoků se často užívají dva klasifikační systémy. Nejnovějším klasifikačním systémem rodu *Streptococcus* spp. je rozdělení, které navrhli Schilfer a Kilpper-Bälz. Jde o rozdělení rodu *Streptococcus* spp. na: pyogenní streptokoky, orální streptokoky, jiné streptokoky, enterokoky a mléčné streptokoky (Tab. 9). Pro potravinářskou mikrobiologii je ale z taxonomického hlediska důležitější, že uvedení autoři navrhli skupinu enterokoků a skupinu mléčných streptokoků povýšili na samostatné rody: *Enterococcus* spp. a *Lactococcus* spp. (Görner a Valík, 2004).

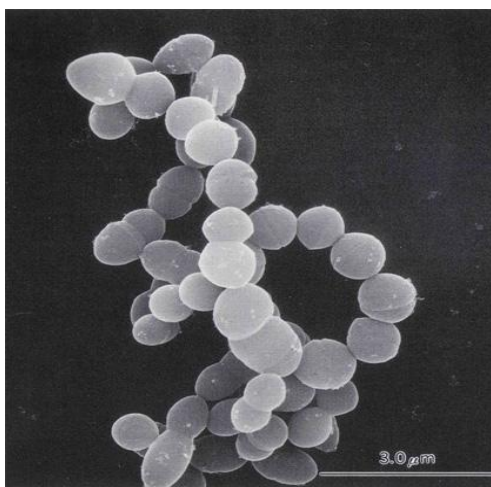
Jedná se o grampozitivní mikroorganismy, které tvoří spory. Buňky jsou kulaté nebo vejcovité o průměru méně než 2 μm .

Streptokoky se nacházejí na mukózních membránách úst, v dýchacím, zažívacím, urogenitálním traktu, na pokožce zvířat, lidí a v přírodě (Görner a Valík, 2004).

Streptococcus thermophilus (Obr. 3) tvoří ovoidní grampozitivní buňky o průměru 0,7 až 0,9 μm v párech až dlouhých řetízcích (Ray and Bhunia, 2008). Vyznačuje se tvorbou dvou mléčných dehydrogenáz produkujících L – laktát, čím se liší od jiných bakterií mléčného kvašení, které mají víc jak jednu dehydrogenázu, ale tvoří DL – laktát. *S. thermophilus* se vyskytuje v mléku a mléčných produktech přirozeně, stejně tak i ve formě složky čistých zákysových kultur. Divoké kmeny *S. thermophilus* způsobují vady při zrání tvrdých sýrů (Görner a Valík, 2004).

Tab. 9: Rozdělení potravinářsky významných streptokoků (Görner a Valík, 2004)

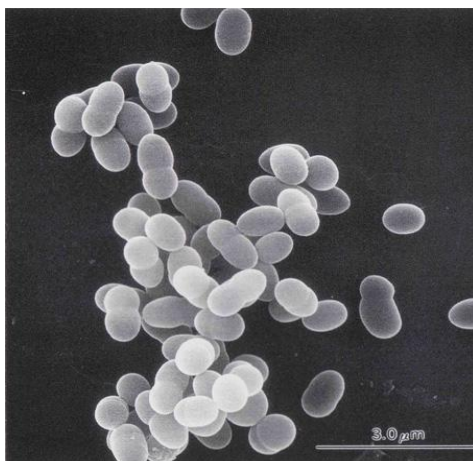
Jiné streptokoky	<i>Streptococcus acidominimus</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. alactolyticus</i> , <i>S. thermophilus</i> (Obr. 2), <i>S. saccharolyticus</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. porcinus</i>
Enterokoky	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. malodorans</i> , <i>E. mundtii</i>
Mléčné streptokoky (<i>Lactococcus</i>)	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>hordniae</i> , <i>L. raffinolactis</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>L. plantarum</i>



Obr. 3. *Streptococcus thermophilus*
www.jpkc.njau.edu.cn

2.5.4. Rod *Lactococcus*

Laktokoky se řadí mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení (Vlková et al., 2009). Jedná se buňky ovoidního tvaru velikosti 0,5 – 1,0 μm , které tvoří páry nebo krátké řetízky. Koky jsou nepohyblivé, nesporolující, grampozitivní a fakultativně anaerobní. Bakterie rodu *Lactococcus* spp. dobře rostou v teplotním rozmezí 20 – 30 °C, při koncentraci NaCl do 6,5 % a pH do 9,6. Optimální růstová teplota je 37 °C (Sedláček, 2007). Ve vhodném prostředí produkují přibližně 1 % L(+) kyselinu mléčnou a redukují pH na 4,5 (Ray and Bhunia, 2008). V mlékárenském průmyslu je nejdůležitější *Lactococcus lactis* (Šilhánková, 2008). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Obr. 4) jsou součástí mikroorganismů základních smetanových kultur, tvoří převážně kyselinu mléčnou (Zadrazil, 2002). Některé kmeny *Lactococcus lactis* produkují bakteriocin nisin, který inhibuje rozvoj řady grampozitivních bakterií. Tento bakteriocin se používá při konzervaci potravin (Šilhánková, 2008).

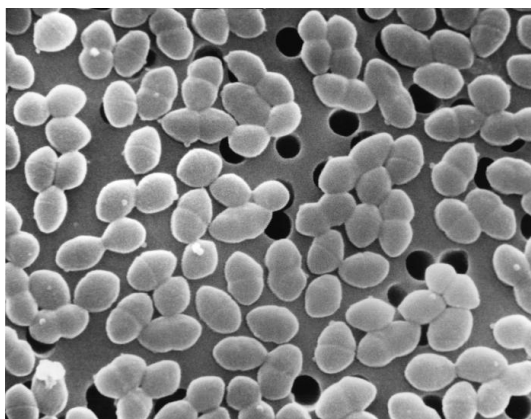


Obr. 4. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
www.jpkc.njau.edu.cn

2.5.5. Rod *Enterococcus*

Jedná se o grampozitivní koky v řetízcích, o něco větší než streptokoky, nenáročné na kultivační podmínky. Z více než 50 druhů enterokoků jsou nejčastější a nejvýznamnější *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* (Obr. 5). Vyskytují se přirozeně v tlustém střevu, jsou pravidelnou součástí střevní mikrobioty. Charakteristická je jejich relativní rezistence k fyzikálním a chemickým vlivům: na rozdíl od ostatních koků v lidském těle vydrží 60 °C po dobu 30 minut, rostou za přítomnosti 6% NaCl, při pH až 8,5.

Rostou při teplotě pro bakterie kolonizující sliznice neobvykle nízké (10 °C) i vysoké (45 °C) i za přítomnosti žluči (Schindler, 2010). *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* jsou bakterie důležité jako probiotika. Lze je snadno rozlišit podle fermentace arabinosy a sorbitolu a teploty vhodné pro jejich kultivaci (Marth and Steele, 2001)



Obr. 5. *Enterococcus faecium*
www.f8i.org/bacteria

2.6. Prebiotika

Od roku 2004 jsou prebiotika definována jako: Selektivně fermentovatelné složky, které umožňují konkrétní změny, a to jak ve složení a / nebo aktivitě gastrointestinální mikrobioty, čímž zlepšují zdraví a pohodu svého hostitele (Gibson and Roberfroid, 2008).

Prvně byl výraz prebiotikum použit v roce 1990 (Gibson and Fuller, 2000). Prebiotika jsou sacharidy s krátkým řetězcem, které jsou nestravitelné trávicími enzymy člověka. Prebiotikum je neaktivní složka stravy, která prochází do tlustého střeva a zde je pak selektivně fermentováno (Al – Sheraji, 2013). Pokud nestravitelný sacharid podporuje růst veškeré mikrobioty tlustého střeva (bez selektivní stimulace určitého mikrobiálního druhu) působí jako tzv. "colonic food" (potravina pro tlusté střevo). Colonic food se definuje jako potravinářská přísada, která se dostává do tlustého střeva a slouží jako substrát pro endogenní bakterie, čímž nepřímo poskytuje hostiteli energii, metabolické substráty a esenciální mikronutrienty (Kvasničková, 2000). Ve většině případů se jedná o podporu zvýšení počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp. (Oliveira et al., 2009).

Aby určité potravinářské přísady fungovaly jako prebiotika:

- mají procházet horní částí GIT v nezměněné formě, nemají se tam ani hydrolyzovat, ani absorbovat.
- mají sloužit určitým bakteriím tlustého střeva jako selektivní substrát, který vede ke zvýšení metabolické aktivity těchto bakterií nebo k podpoře jejich růstu.
- mají pozitivně ovlivňovat složení mikrobioty tlustého střeva.
- mají mít celkově pozitivní vliv na zdraví a celkovou pohodu příslušného jedince (Kvasničková, 2000).

Laktulosa, galaktooligosacharidy, fruktooligosacharidy, inulin, a jeho hydrolyzáty, maltooligosacharidy a rezistentní škrob jsou běžně používané v lidské stravě. Základní koncové produkty metabolismu sacharidů jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem, zvláště kyselina octová, kyselina propionová a kyselina máselná, které jsou používány hostitelským organismem jako zdroj energie (Al – Sheraji, 2013).

Prebiotika příznivě působí na střevní peristaltiku. To vede ke zkrácení doby, kdy je v kontaktu kolonocyt s perorálně přijímanými potravinovými karcinogeny a snížené pH inhibuje aktivitu dehydrogenas a hydroxylas, které mění žlučové kyseliny na karcinogenní kyselinu deoxycholovou a lithocholovou (Oliveira et al., 2009).

Prokázalo se, že řada oligosacharidů má bifidogenní vlastnosti, kdy po konzumaci dochází k nadměrnému růstu bifidobakterií a ke snížení počtu ostatních bakterií, např. *Clostridium perfringens*, fusobakterií a bakteroidů (Kvasničková, 2000). Jako zdroje těchto sacharidů může být čekanka, cibule, česnek, chřest, artyčoky, pórek, banány, rajčata a mnoho ostatních rostlin (Al – Sheraji, 2013).

Názory na doporučenou denní dávku prebiotik se liší. Nejširší rozmezí se udává pro oligofruktosu (1 – 18 g / den). Pro ostatní prebiotika jsou udávány doporučené dávky (Kvasničková, 2000):

- galaktooligosacharidy 10 g / den
- xylooligosacharidy 0,7 g / den
- sójové oligosacharidy 2,0 g / den
- laktulosa 3 g / den
- laktosacharosa 5 – 10 g / den.

Využití probiotik jako složka potravin má více výhod, protože zlepšuje senzorické vlastnosti a poskytuje vyvážené nutriční složení. Při použití do pekařských výrobků a snídaňových cereálií se dosáhne prodloužení trvanlivosti a lepší vláčnosti pečiva. Jejich rozpustnost umožňuje přidavek do mléčných výrobků, pomazánek, nápojů. Velmi často se prebiotika také užívají ve formě tablet. Vzhledem k jejich vlastnosti, tvorbě gelovité struktury, je lze dobře využít k zahušťování nízkotučných výrobků, bez jakéhokoliv ovlivnění chuti. Toho lze dobře využít při výrobě jogurtů, smetanových sýrů (Al – Sheraji, 2013).

2.6.1. Oligosacharidy

Oligosacharidy jsou skupina sacharidů s krátkým řetězcem sestávající se z 2 – 20 jednotek. Mohou být lineární nebo rozvětvené a vyskytují se v celé řadě potravin. Některé oligosacharidy jsou rozpustné ve vodě, nebo fyziologickém roztoku (Kailasapathy et al., 2011). Na světovém trhu se využívá více než 20 typů nestravitelných oligosacharidů. Nejvíce používané jsou galaktooligosacharidy a fruktooligosacharidy (Sako et al., 1999).

Oligosacharidy jsou široce distribuovány v rostlinách, jako je cibule, pórek, chřest, čekanka, topinambur, česnek, pšenice a oves, sojové boby (Kailasapathy et al., 2011). Mohou být extrahovány z přírodních zdrojů (např. sojové oligosacharidy), vyrobené enzymatickou transglykosylací (např. galaktooligosacharidy, fruktooligosacharidy) nebo enzymatickou hydrolýzou polysacharidů (např. xylooligosacharidy, isomaltooligosacharidy) (Sako et al., 1999).

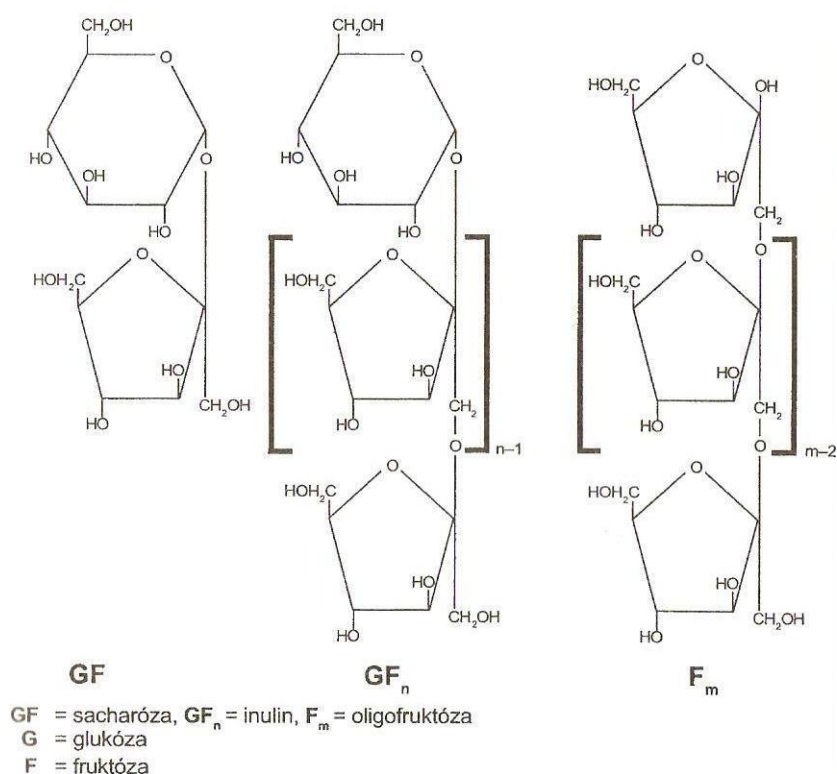
2.6.2. Fruktooligosacharidy a inulin

FOS jsou polymery (polymerizační stupeň 2 – 30) β - D – fruktosy spojené β (2 \rightarrow 1) glykosidickými vazbami zakončené molekulou sacharosy (Kailasapathy et al., 2011).

Hydrolýzou inulinu endoglykosidázami vznikají lineární oligomery složené z jedné molekuly glukosy, ke které jsou vázány β (2 – 1) fruktooligosacharidy prostřednictvím vazby typu (α 1 – β 2) – jako u sacharosy. Označují se GF_n kde n představuje počet jednotek fruktosy. Kromě těchto vznikají hydrolýzou inulinu i oligomery typu F_n. Jde o homopolymery fruktosy vázané prostřednictvím β (2-1) vazby, přičemž n představuje počet jednotek fruktosy v homopolymerech (Kvasničková, 2000).

Lze je rozdělit na přírodní, kde účinkují v rostlinách jako zásobní polymery a syntetické (Vlková et al., 2009). Průmyslově se vyrábí z disacharidu sacharózy pomocí enzymu β – fruktofuranosidasy, který produkuje rod *Aspergillus niger* (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010). Většina vyráběných fruktanů je z inulinu. Výroba zahrnuje extrakci inulinu z kořene čekanky a následnou rafinaci a sušení. Extrahovaný inulin je řízeně hydrolyzován enzymem inulinasou (Kailasapathy et al., 2011).

Obecně platí, že příjem FOS zvyšuje počet bifidobakterií a laktobacilů, zvyšuje množství mastných kyselin s krátkým řetězcem a snižuje koncentraci klostridií, fusobakterií a pH (Kailasapathy et al., 2011).

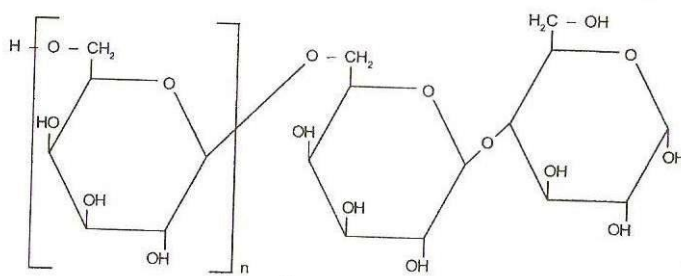


Obr. 6. Molekulární struktura sacharózy, inulinu a oligofruktózy (Kvasničková, 2000)

2.6.3. Galaktooligosacharidy

GOS jsou vyráběny převážně enzymatickou syntézou β – galaktosidasy za použití substrátu laktózy (Dias et al., 2009). Při této reakci dochází k hydrolytické degradaci laktózy (Kailasapathy et al., 2011). Jejich stabilita v kyselém prostředí z nich dělá ideální látky pro použití v potravinách. Z důvodu relativně vysoké sladivosti, chuťové kvality a nízké hodnoty kalorií se využívá jako zajímavé funkční sladidlo (Dias et al., 2009).

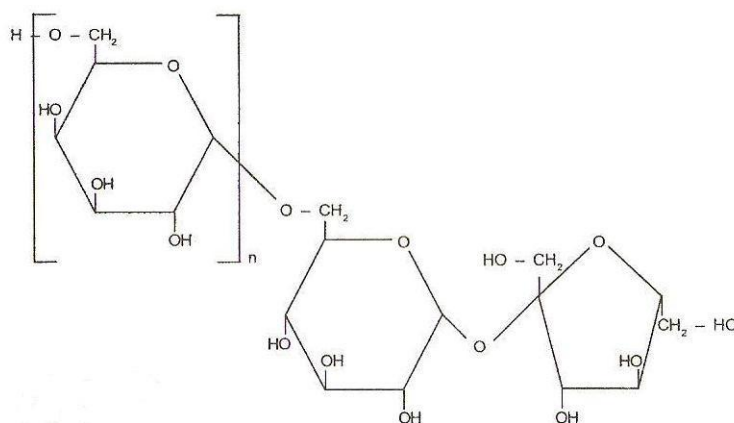
Z rozsáhlých studií o využití galaktooligosacharidů bylo zjištěno, že bakterie rodů *Bifidobacterium* spp. a *Bacteroides* spp. využívají GOS jako jediný zdroj uhlíku (Kailasapathy et al., 2011). Galaktooligosacharidy jsou přidávány do umělé výživy pro kojence, přičemž složení této výživy simuluje kvantitativní i kvalitativní skladbu příslušných oligosacharidů v mateřském mléce, obvyklý poměr GOS:FOS v kojenecké výživě je 9:1 (Vlková et al., 2009).



Obr. 7. Chemická struktura galaktooligosacharidů (Kvasničková, 2000)

2.6.4. Sójové oligosacharidy

Sójové oligosacharidy se na rozdíl od ostatních oligosacharidů extrahují přímo ze suroviny a nevyžadují enzymovou výrobu. Sójová syrovátka – vedlejší produkt z výroby sójových bílkovinných izolátů a koncentrátů – obsahuje oligosacharidy rafinosu, stachyosu a verbaskosu, dále sacharosu, glukosu a fruktosu. Rafinosa a stachyosa působí jako prebiotika, stimulují růst bifidobakterií v tlustém střevu (Kvasničková, 2000).



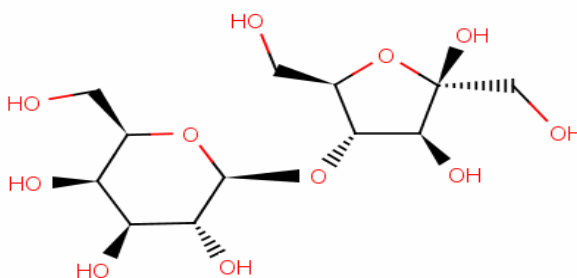
Obr. 8. Chemická struktura sojových oligosacharidů (Kvasničková, 2000)

2.6.5. Laktulosa

Laktulosa je nejdéle známým prebiotikem, které bylo použito pro zvýšení počtu komenzálních laktobacilů ve střevě kojenců. Laktulosa je disacharid vyrobený z glukosy chemickou izomerací za alkalických podmínek v přítomnosti hydroxidu sodného a kyseliny borité. Při teplotě nad 100 °C se alkalickou izomerací tvoří z laktózy laktulosa. Přirozeně se také vyskytuje v tepelně ošetřeném kravském mléce a v mateřském mléce.

Tento disacharid je schopen se dostat do tlustého střeva, ve kterém je dobře fermentovatelný (Kailasapathy et al., 2011). Bakteriální fermentace vede, stejně jako v ostatních případech, k produkci laktátu a MK s krátkým řetězcem, které snižují pH ve střevě.

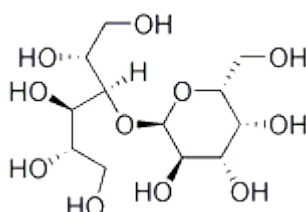
Jde o běžně vyráběné prebiotikum ve světě, které se spíše využívá jako laxativum (Vlková et al., 2009).



Obr. 9. Chemická struktura laktulosey
www.chemnet.com/cas/cz/4618-18-2/Lactulose

2.6.6. Laktitol

Laktitol je cukerný alkohol odvozený od mléčného cukru laktosy a je komerčně vyráběn katalytickou hydrogenací při vysoké teplotě a tlaku. Laktitol také vykazuje bifidogenní účinky. Je prokázáno, že snižuje aktivitu enzymů a aromatických látek působících prokarcinogenně. Laktitol také slouží jako sladidlo pro diabetiky. (Kailasapathy et al., 2011).



Obr. 10. Chemická struktura laktitolu
www.e-brojevi.udd.hr/966.htm

2.6.7. Rezistentní škrob

Škrob je složen z amylosy a amylopektinu. Rezistentní škrob se definuje jako suma škrobu a produktů degradace škrobu, které se neabsorbují v tenkém střevu zdravých jedinců. Rezistentní škrob tak tvoří frakci škrobu, která se netráví v tenkém střevu, může být však částečně fermentována mikroflórou v tlustém střevu (Kvasničková, 2000).

Rezistentní škrob se dělí primárně do 4 skupin (RS1, RS2, RS3, RS4):

- RS1 – je fyzikálně nepřístupný škrob, např. škrob v luštěninách, kde je součástí materiálu buněčných stěn nebo proteinové matrice a není přístupný enzymové hydrolýze.
- RS2 – je nativní škrob obsažený ve škrobových zrnech s typem krystalinity B nebo C (např. škrob ze syrových nikoliv uvařených brambor a z banánů)
- RS3 – je retrogradovaná amylosa. RS3 je škrob nejprve zmazovatělý, amylosa je následkem zmazovatění uvolněna do roztoku jako nahodile uspořádané šroubovice, ty po ochlazení reasociují za vzniku dvojitych šroubovic, stabilizovaných vodíkovými vazbami a obsahuje šest glukosových jednotek.
- RS4 – je chemicky modifikovaný škrob (Šárka et al., 2013).

Škroby RS1 a RS2 jsou po vhodné tepelné úpravě stravy pomalu, ale zcela stravitelné, kdežto škrob RS3 brání trávení úplně (Šárka et al., 2013).

Přirozeně se vyskytuje v technologicky neupravených potravinách, např. banánech a čočce, je také obsažen v technologicky upravených potravinách, např. chlebu (Kvasničková, 2000).

Jako prospěšné účinky rezistentního škrobu se uvádí:

- snížení pH v tlustém střevu
- tvorba MK s krátkým řetězcem v tlustém střevu
- zvýšení objemu výkalů
- prevence rakoviny tlustého střeva
- zlepšení glukosové tolerance
- snížení koncentrace lipidů v krvi (Kvasničková, 2000).

2.7. Synbiotika

Synbiotika jsou přípravky, které kombinují probiotika a prebiotika v jednom výrobku na základě toho, že jejich současné podávání podporuje růst a odolnost probiotik a tím se zlepšují jejich terapeutické vlastnosti (Shortt and O'Brien, 2004).

Název vznikl z pozorovaného jevu synergismu, což znamená, že zdravotní přínos kombinace obou účinných složek je větší než součet přínosu každé z nich aplikované samostatně.

Pro synbiotika platí údaje uvedené pro jejich jednotlivé složky. Přednostně se doporučují pro kojence a starší jedince (Kalač, 2003).

Nejjednodušším příkladem synbiotika pro lidskou výživu je jogurt s obsahem probiotických bakterií a prebiotickou oligofruktosou (Rada, 2008)

2.8. Metody identifikace mikroorganismů

Počátky bakteriální klasifikace a identifikace na konci 19. století se výhradně opíraly o fenotypové vlastnosti – první bakteriální izoláty byly klasifikovány na základě morfologických znaků, růstových požadavků a potenciálu patogenity. Později, od počátku 20. století, se k morfologickým znakům postupně přidávaly charakteristiky fyziologické, biochemické či chemotaxonomické. Od 60. let se fenotypová klasifikace rozšířila o druhý přístup – klasifikaci genotypovou. Tento přístup je založený na studiu fylogenetické příbuznosti bakterií (Uhlík et al., 2013).

K identifikaci mikroorganismů pomocí biochemických profilů slouží komerčně vyráběné identifikační soupravy (API bioMérieux, Erba - Lachema). Tyto soupravy obsahují

různé substráty, většinou se jedná o cukry nebo jejich deriváty, k nimž je inokulována suspenze studovaného kmene. Biochemické testy zahrnují také kvalitativní stanovení specifických enzymů (peptidasa, ureasa, fosfatasa). Nevýhodou těchto metod je, že nemusí být přesné a vyhodnocení trvá delší dobu (Vlková et al., 2009).

Kromě biochemického stanovení existují metody, které jsou velice citlivé a přesné, jako je metoda ELISA (Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay). Ta je založena na imunoenzymatické reakci a používá se nejčastěji pro specifické potvrzení nebezpečných patogenů. Tato metoda je velmi účinná, ale poměrně nákladná (Štursa et al., 2010).

Nejpodstatnější molekulou pro genotypickou klasifikaci se stala 16S rRNA – tedy RNA malé ribosomální podjednotky. RNA malé ribosomální podjednotky se stala základním kamenem mikrobiální taxonomie a díky ní byla odhalena drtivá většina diversity mikrobiálního světa. Analýzou primární sekvence 16S rRNA, resp. jejího genu lze klasifikovat bakterie na úrovni čeledi při přečtení 200 bází a na úrovni rodové při přečtení 400 bází (Fox et al., 1980).

Metody založené na analýzách nukleových kyselin jsou v současné době používány hlavně k vědeckým účelům. Nejjednoduššími metodami analýzy nukleových kyselin je použití oligonukleotidových sond. Jedná se o specifické úseky DNA/RNA, které přisedají na komplementární úsek DNA/RNA studovaného kmene. Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je v současnosti nejpoužívanější metodou (Vlková et al., 2009).

Metodou založenou na amplifikaci nukleových kyselin je metoda PCR (polymerázová řetězová reakce). Pomocí polymerázové řetězové reakce se amplifikují specifické úseky DNA (tzv. markery), které se pak mohou dále sekvenovat. PCR má mnoho podob a aplikací, je to metoda rychlá a citlivá (Vlková et al., 2009).

V současnosti se zavádí některé nové techniky a postupy, mezi které patří využití hmotnostní spektrometrie. Metoda hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry – MS) se v biologii a biochemii zpočátku využívala k identifikaci proteinů či peptidů. V roce 1994 se podařilo prokázat, že pomocí MALDI – TOF MS lze identifikovat celé spektrum proteinů z předem dezintegrovanych buněk. Celá podstata metody spočívá v extrakci proteinů z bakterií a následné analýze proteinových extraktů přímo MALDI – TOF MS. Takto se získávají proteinová spektra bakterií. Metoda prošla v průběhu let postupným zdokonalováním. Nyní je nejpoužívanější metoda celých buněk. Podstatou metody je odebrání kolonie a rozetření na sklíčko. Takto rozetřená kolonie je vysušena a může být provedena analýza.

Pomocí této metody jde rozlišit nejen rod a druh bakterií, ale také některé jednotlivé kmeny bakterií. Jde o metodu rychlou a přesnou (Štursa et al., 2010).

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout selektivní prostředí pro stanovení a izolaci probiotické bakterie *Lactobacillus casei* z potravin a stolice. Dále byly ověřovány možnosti identifikace této bakterie.

Hypotéza:

Hypotézou je, že médium s obsahem rhamnosy, vankomycinu a metronidazolu, které bylo úspěšně použito pro stanovení *Lactobacillus casei* v lyofilizovaných preparátech, bude také fungovat při testování mléčných kysaných výrobků a bude moci být použito k izolaci *Lactobacillus casei* ze stolice.

4. Materiál a metody

4.1. Odběr vzorků

Vzorky probiotických tablet a kysaných mléčných výrobků pro selektivní stanovení probiotické bakterie *Lactobacillus casei* byly zakoupeny v maloobchodní síti. Šlo o výrobky různých výrobců a různého složení. Se všemi vzorky bylo nakládáno tak, aby nedošlo k jejich poškození.

U vzorků mléčných výrobků byla deklarována pouze základní jogurtová kultura *a Lactobacillus casei*. Probiotické tablety obsahovaly široké spektrum probiotických bakterií, což bylo důležité při výběru vhodné živné půdy. Pro ověření možnosti využití živné půdy M – RTLV agarů k selekci *Lactobacillus casei* ze stolice, byly odebírány vzorky stolice od různých osob a zvířat. Při odběru stolice je nutné odebírat vzorek sterilně. Vzorek se odebírá do zkumavek, které se po odebrání musí udržovat v chladném prostředí.

Bylo testováno 8 výrobků probiotických tablet a 3 produkty kysaných mléčných výrobků. Dále bylo testováno několik vzorků stolice z důvodu ověření možnosti využití M – RTLV agarů pro tento typ vzorku. Z každého vzorku byl odebrán 1g (1ml) a ten byl následně kultivován při vhodných podmínkách na vybrané živné půdě.

Vybrané kolonie při různých stanoveních byly izolovány a identifikovány pomocí API 50 CHL a PCR.

U vzorků byly zjišťovány tyto znaky:

- u všech vzorků počet probiotických bakterií *Lactobacillus casei*
- u některých vzorků počet probiotických bakterií *Lactobacillus rhamnosus*
- počet laktobacilů.

4.2. Přehled vzorků

V následujících tabulkách č. 9, 10 je uveden seznam použitých vzorků pro rozbor s jejich složením a doplňujícími údaji.

Tab. 9: Charakteristika vzorků probiotických tablet (název, složení, výrobce/distributor)

Číslo vzorku	Název výrobku	Složení výrobku (deklarované obsah bakterií)	Výrobce/distributor
1	Children dophilus	<i>L. acidophilus</i> 4.10 ⁸ , <i>L. casei</i> 4.10⁸ , <i>L. rhamnosus</i> 4.10⁸ , <i>B. bifidum</i> 2.10 ⁸ , <i>B. longum</i> 3.10 ⁸ , <i>S. thermophilus</i> 3.10 ⁸	Pharma Agency s.r.o.
2	APO – Lactobacillus ATB	<i>L. casei</i> 3,3.10⁸ , <i>L. rhamnosus</i> 2,4.10⁸ , <i>L. acidophilus</i> 1,8.10 ⁸ , <i>B. breve</i> 6.10 ⁷ , <i>Lactococcus lactis</i> 4.10 ⁷ , <i>S. thermophilus</i> 6.10 ⁷ , <i>B. bifidum</i> 2.10 ⁷ , <i>B. longum</i> 2.10 ⁷ , <i>L. fermentum</i> 2.10 ⁷	Apotex
3	APO – Baby probio	<i>L. rhamnosus</i> 3,4.10⁸ , <i>L. acidophilus</i> 2.10 ⁸ , <i>B. breve</i> 1,8.10 ⁸ , <i>B. bifidum</i> 1,5.10 ⁸ , <i>B. infantis</i> 7.10 ⁷ , <i>S. thermophilus</i> 6.10 ⁷	CELL Biotech
4	Probio activ s vit. B	<i>B. longum</i> 9.10 ⁸ , <i>B. infantis</i> 9.10 ⁸ , <i>B. bifidum</i> 9.10 ⁸ , <i>L. casei</i> 9.10⁸ , <i>L. acidophilus</i> 9.10 ⁸ , <i>L. bulgaricus</i> 2,5. 10 ⁸	Biomedica spol s.r.o.
5	Syn Bio	(2,5.10 ⁸) <i>B. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i>	Pleurom Bratislava
6	Swiss Lactobacily 5 strain dophilus	<i>L. rhamnosus</i> 3,3.10⁹ , <i>B. breve</i> 1,2.10 ⁹ , <i>L. casei</i> 9.10⁸ , <i>L. acidophilus</i> 3.10 ⁸ , <i>B. longum</i> 3.10 ⁸	Swiss Herbal remedies
7	Liftea dětský probioactiv	<i>B. longum</i> 4,5.10 ⁸ , <i>B. infantis</i> 4,5.10 ⁸ , <i>B. bifidum</i> 4,5.10 ⁸ , <i>L. acidophilus</i> 4,5.10 ⁸ , <i>L. casei</i> 4,5.10⁸ , <i>L. bulgaricus</i> 1,25.10 ⁸	Biomedica spol s.r.o.
8	GS Laktobacily FORTE	(4.10 ⁹) <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>S. thermophilus</i>	GreenSwan

Tab. 10: Charakteristika vzorků kysaných mléčných výrobků

Číslo vzorku	Název výrobku	Složení (obsah bakterií)	Výrobce
9	Bílý jogurt nízkotučný albert Quality	<i>L. casei</i> , startovací jogurtová kultura	Valašské Meziříčí spol. s.r.o.
10	Bílý jogurt nízkotučný Price	<i>L. casei</i> , startovací jogurtová kultura	Valašské Meziříčí spol. s.r.o.
11	Jogurt nízkotučný - borůvka	<i>L. casei</i> , startovací jogurtová kultura	Valašské Meziříčí spol. s.r.o.

4.3. Mikrobiologický rozbor

4.3.1. Stanovení počtu mikroorganismů

Při rozbořech vzorků byla využívána technika stanovení mikroorganismů při použití tuhých živných půd. Metodou zalévání živnou půdou. Tato metoda je založena v naočkování určitého množství vzorku nebo jeho vhodného ředění na Petriho misku. Na misku byl vždy napipetován 0,5 ml vzorku, který byl následně promíchán s živnou půdou. Po promíchání a zatuhnutí živné půdy probíhala kultivace v termostatu při vhodných podmínkách. Po určité době kultivace proběhlo vyhodnocení a počítání narostlých kolonií.

Pro izolaci a kultivaci vybraných kolonií k bližší identifikaci byla použita tekutá živná média ve zkumavkách. Do zkumavky s tekutým živným médiem byla odebrána vždy jedna vybraná kolonie a ta byla kultivována při vhodných podmínkách (24 hodin, 37 °C). Po určité době kultivace byla mikroskopicky kontrolována čistota mikrobiálního druhu ve zkumavce a proběhla identifikace.

Vše je nutné provádět ve sterilním prostředí a při práci se vzorky stolice je zvláště nutné dodržovat hygienické předpisy.

4.3.2. Příprava ředící řady

Aby bylo dosaženo potřebného ředění vzorků, byly připravovány ředící řady. Lahvičky vhodné pro ředící řady byly plněny živným roztokem (9 ml) ve sterilním prostředí, aby se předešlo jejich kontaminaci. Po naplnění byly ředící řady ještě sterilovány.

Při práci bylo nutné dodržovat tyto opatření:

- víčko lahvičky bylo vždy před prací ožiháno
- při převádění suspenze vzorku s živným roztokem byla použita vždy nová sterilní jehla a injekční stříkačka.

Postup:

Ze vzorku byl odebrán 1 ml (1 g) do první lahvičky (v případě tuhého vzorku do zkumavky) v ředící řadě a promíchán. Tím vzniklo ředění 10^{-1} . Sterilní jehlou byl odebrán z ředění 10^{-1} opět 1 ml a ten převeden do další lahvičky v ředící řadě a promíchán. Vzniklo tak ředění 10^{-2} . Tímto způsobem se pokračuje až do ředění 10^{-8} nebo více podle potřeby.

Z takto připravené ředící řady byla očkována suspenze na Petriho misku.

4.3.3. Stanovení *Lactobacillus casei*

Probiotická bakterie *Lactobacillus casei* byla stanovována z mléčných výrobků, probiotických kapslí a stolice. Bakterie rodu *Lactobacillus* spp. mají velmi podobné kultivační vlastnosti a je proto těžké najít vhodnou selekční půdu.

Pro stanovení *Lactobacillus casei* z mléčných výrobků byla použita živná média MRS - LP, MRS - B.

Pro stanovení *L. casei* z probiotických tablet s širším spektrem bakterií, než tomu bylo u mléčných výrobků, byla využita živná půda M – RTLV agar. Dále byla použita živná půda MRS – V.

U vzorků stolice byla ověřována možnost využití M – RTLV agaru pro stanovení *L. casei*.

4.3.4. Používané sbírkové kultury

K ověření možnosti růstu mikroorganismů na živných médiích a jako kontroly při identifikacích byly využívány vybrané čisté sbírkové kultury mikroorganismů. Tyto kultury byly také přidávány do některých vzorků stolice k ověření funkčnosti selektivních vlastností živných půd.

Jednalo se především o bakterie rodu *Lactobacillus*: *L. casei* 1752, *L. casei* Shirota, *L. casei* (Danone), *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Yakult), *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Sbírkové kultury jsou uloženy ve sbírce mikroorganismů Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky.

4.3.5. Složení a příprava kultivačních médií

Ředící řada

Složení:

trypton	5 g
živný bujón	5 g
kvasniční extrakt	2,5 g
tween 80	0,5 ml
cystein	0,25 g

Přesně navážené množství 12,75 g bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně rozvařeno. Po rozvaření je nutná úprava pH 1 M roztokem NaOH. Živný roztok s upraveným pH se anaerobně plní do skleněných lahvíček typu penicilínka po 9 ml. Následuje sterilace.

Wilkins – Chalgren bujón se sójovým peptonem

Složení:

trypton	10 g
pepton	10 g
kvasniční extrakt	5 g
pyruvát sodný	1 g
menadione	0,0005 g
haemin	0,005 g
Bylo naváženo 33 g Wilkins – Chalgren bujónu a přidáno:	
soja pepton	0,5 g
cystein	0,05 g
tween 80	0,1 ml

Přesně navážené množství bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně rozvařeno. Živný roztok se anaerobně plní do skleněných lahvíček typu penicilínka po 9 ml. Následuje sterilace.

MRS agar

Složení:

pepton	10 g
hovězí extrakt	8 g
kvasničný extrakt	4 g
D (+) glukosa	20 g
tween 80	1 ml
citran amonný	2 g
octan sodný	5 g
heptahydrát síranu hořečnatého	0,2 g
tetrahydrát síranu manganatého	0,05 g
dihydrogen fosforečnan draselný	2 g
agar	10 g

Přesně navážené množství agaru 65,25 g bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně sterilováno.

MRS - B agar

Složení agaru je stejné jako u agaru MRS. K přesně naváženému množství MRS agaru 65,25 g je přidán 1,5 g žluče. Agar se žlučí se rozpustí v 1000 ml destilované vody a nechá se rozvařit. Po rozvaření se přidávkem kyseliny octové upravuje pH agaru na 5,6. Po sterilaci pH klesne na 5,4.

MRS - LP agar

Složení agaru je stejné jako u agaru MRS. K přesně naváženému množství MRS agaru 65,25 g jsou přidány 2 g chloridu litného a 3 g propionátu sodného. Agar s přidávanými chemikáliemi se rozpustí v 1000 ml destilované vody a je sterilován.

Rogosa agar

Složení:

trypton	10 g
kvasniční extrakt	5 g
glukosa	20 g
tween 80	1 ml
octan sodný	17 g
citran amonný	2 g
dihydrogen fosforečnan draselný	6 g
síran hořečnatý	0,575 g
síran manganatý	0,12 g
síran železitý	0,034 g
agar	20 g

Přesně navážené množství 62 g se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Po rozvaření se upravuje pH agaru kyselinou octovou na pH 5,4. Agar nesterilujeme.

M – RTLV agar

Složení:

pepton	10 g
kvasniční extrakt	5 g
dihydrogen fosforečnan draselný	6 g
citran amoný	2 g
tween 80	1 ml
octan sodný	25 g
agar	20 g
vankomycin hydrochlorid	10 mg
metronidazol	10 mg
2, 3, 5 triphenyltetrazolium chlorid TTC	30 mg
L - rhamnose	20 g
solný roztok	5 ml
destilovaná voda	950 ml
Složení sol. roz.:	
síran hořečnatý	11,5 g
sulfát železitý	0,68 g
síran manganatý	2,4 g
destilovaná voda	100 ml

Všechny složky se naváží a rozpustí v destilované vodě. pH agaru se upraví na pH 6 roztokem 1 M HCl. Roztok L - rhamnosy, vankomycinu, metronidazolu a TTC se steriluje filtrací přes membránový filtr s póry 0,2 µm a do vzniklého agaru se přidávají před zaléváním Petriho misek. Agar se rozváří.

MRS - V agar

Složení agaru je stejné jako u agaru MRS. Přesně navážené množství 65,25 g se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Před zaléváním Petriho misek se přidává do agaru antibiotikum vankomycin v koncentraci 1 mg na 1000 ml. Živná půda se steriluje. Antibiotikum se steriluje filtrací přes membránový filtr s póry 0,2 µm.

Všechny živné půdy byly před použitím zchlazeny na 45 - 50 °C.

4.3.6. Kultivační podmínky

Vzorky byly kultivovány na uvedených živných půdách za různých podmínek.

Tab. 11: Kultivační podmínky

Živná půda	Teplota kultivace	Čas kultivace	Prostředí kultivace
MRS	37 °C	72 hodin	aerobně
MRS – LP	37 °C	72 hodin	aerobně
MRS – B	37 °C	72 hodin	aerobně
Rogosa	37 °C	72 hodin	aerobně
M – RTL V	37 °C	72 hodin	anaerobně
MRS – V	43 °C	72 hodin	anaerobně
MRS – V	37 °C	72 hodin	anaerobně

4.4. Identifikace mikroorganismů

4.4.1. API 50 CHL

API 50 CHL je standardizovaný systém spojující 50 biochemických testů ke studiu sacharidového metabolismu mikroorganismů. API 50 CHL se používá ve spojení s API 50 CHL médium pro identifikaci rodu *Lactobacillus* spp. a příbuzných rodů.

Systém se skládá z 50 mikrozkušavek sloužících k pozorování fermentace. Tyto mikrozkušavky jsou naplněny substrátem patřícím do třídy sacharidů a jejich derivátů (heterosidy, polyalkoholy, uronové kyseliny). Fermentační testy jsou zaočkovány bakteriální suspenzí v API 50 CHL médium.

Během kultivace celého testu za vhodných podmínek se fermentace uvnitř mikrozkušavek projeví prostřednictvím změny barvy ve zkumavce. To je způsobeno tvorbou kyseliny za anaerobních podmínek a detekuje se pomocí indikátoru pH přítomného ve zvoleném médiu. První zkumavka v testu je bez aktivní látky (negativní kontrola).

4.4.1.1. Postup zpracování API 50 CHL

Do inkubačního boxu bylo vloženo všech 5 testovacích proužků, každý po 10 očíslovaných mikrozkušavkách. Takto připravený box byl označen datem inokulace.

Izoláty, které musí být čerstvě kultivované, byly zkontrolovány pod mikroskopem a převedeny do plastových sterilních zkumavek. Zkumavka byla odstředována v centrifuzě 10 minut. Po odstředění byl supernatant ze zkumavky odstraněn a sediment byl promýván 1 ml BifiPufu. Sediment s 1 ml BifiPufu byl opět odstředován 10 minut. Po odstředění se znovu opakovalo promývání a vzniklý roztok byl nabrán do sterilní injekční stříkačky.

Poté byl do 5 ml suspenzního média přidán vzniklý roztok až do dosažení 2. zákalového stupně podle standardu. Dvounásobné množství roztoku, které je potřebné pro dosažení 2. zákalového stupně, bylo přidáno do 10 ml inokulačního média pro API 50 CHL. Po promíchání se inokulum plní do mikrozkušavek. Zkumavky byly následně zakápnuty parafínovým olejem.

Celý inkubační box byl kultivován při 37 °C 48 hodin. Každých 24 hodin byl vyhodnocen stupeň fermentace substrátu ve zkumavkách.

Hodnocení bylo provedeno v identifikačním softwaru apiweb.

4.4.2. Izolace DNA

Izolace DNA z bakteriálních kmenů je nutná pro další identifikaci pomocí polymerázové řetězové reakce.

Kultivovaná kultura mikroorganismu byla zkontrolována pod mikroskopem. Následně bylo 1,7 ml této kultury převedeno do sterilní zkumavky typu eppendorf. Takto připravená zkumavka se vzorkem byla na 4 minuty vložena do centrifugy. Vzniklý supernatant byl slit a sediment byla smíchána se 100 µl PrepManUltra a zhomogenizována. Dále byl vzorek po dobu 10 minut temperován při 100 °C a následně chlazen 2 minuty. Zchlazená zkumavka se vzorkem byla opět vložena do centrifugy na 4 minuty. Nakonec bylo 70 µl supernatantu odpipetováno do nové sterilní zkumavky typu eppendorf.

4.4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA založena na principu replikace nukleových kyselin. Při polymerázové řetězové reakci (PCR) se namnoží hledaný úsek nukleové kyseliny (určité hledané) bakterie nebo viru pomocí polymerázy připravené z bakterie *Thermophilus aquaticus* tak, že se do reakce dodané nukleotidy zřetězují a syntetizuje nové vlákno molekuly podle hledaného vzoru. Vznikne tak řetězec z několika milionů kopií vzorového fragmentu o délce až 10 000 nukleotidů, který se detekuje (Schindler, 2010).

Amplifikace DNA v polymerázové řetězové reakci probíhá ve třech opakujících se krocích:

1. Tepelná denaturace templátu (94–98 °C), při které dojde k denaturaci vodíkových můstků dvoušroubovice DNA a vzniku dvou jednovláknových molekul DNA
2. Hybridizace (nasedání primerů) při teplotě 30–65 °C, primer tvoří za vhodných teplotních podmínek vodíkové můstky s komplementární sekvencí na templátovém vlákně.
3. Elongace (prodlužování primerů) při teplotě 65–75 °C, připojením volných nukleotidů dochází k prodlužování primerů na 3'OH konci.

PCR produkty je možné vizualizovat pomocí různých barviv, která se váží na DNA. Nejčastěji se používá etidium bromid, který se včleňuje do molekuly DNA a fluoreskuje v UV světle. Pro analýzu PCR produktu se nejčastěji používá elektroforetické separace v agarózovém či polyakrylamidovém gelu. Vzorky a standard jsou nanесeny na gel a nechají se putovat po určitý čas v gelu. Výsledek je pozitivní, jestliže došlo k amplifikaci specifického produktu, který má očekávanou délku (Vlková et al., 2009).

4.4.3.1. Postup zpracování PCR

Příprava PCR mixu (jeden vzorek):

- 12,5 µl DRAM Tack Green Muster Mix
- 1 µl primer
- 1 µl primer
- 9,5 µl H₂O
- Při použití pouze jednoho primeru bylo doplněno 10,5 H₂O, aby celkový objem PCR mixu byl 24 µl.

Příprava vzorku:

- 24 µl PCR mixu
- 1 µl DNA izolátu
- Všechny vzorky byly míchány do mikrozkušavek typu eppendorf.

Zkušavky typu eppendorf byly umístěny do termocykleru a byl spuštěn vybraný program. Poté byly vzorky odděleny v 1% agarózovém gelu, obarveny ethidium bromidem a prosvíceny pod UV světlem.

5. Výsledky

V tabulce č. 12 jsou uvedeny výsledky z kultivací 8 vzorků probiotických tablet. Kultivace vzorků probíhala na různých živných médiích.

Pro stanovení celkového počtu probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* spp. byla vybrána živná půda MRS.

Dále, byla použita selektivní živná půda M - RTLV agar. Tato živná půda by měla být schopna selektovat *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Na základě rozdílné fermentace cukru L – rhamnosa a redoxního indikátoru 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid (TTC) při kultivaci by měl být viditelný barevný rozdíl kolonií mezi *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*. *L. paracasei* a *L. casei* by měly na tomto živném médiu tvořit kolonie červené a *L. rhamnosus* kolonie bílé až světle růžové. Na základě toho jsou v tabulce pro tento agar výsledky rozděleny (M – RTLV LC, M – RTLV LR).

Tab. 12: Výsledky kultivace probiotických tablet (log KTJ/g)

Číslo vzorku	Název vzorku	Živné médium		
		MRS	M - RTLV LC	M - RTLV LR
1	Children dophilus	8,81 ± 0,02 ^a	8,73 ± 0,02 ^c	8,74 ± 0,01 ^c
2	APO – Lactobacillus ATB	7,89 ± 0,02 ^a	7,54 ± 0,02 ^c	7,19 ± 0,06 ^a
3	APO – Baby probio	8,42 ± 0,03 ^c	Neobsahuje	8,22 ± 0,05 ^b
4	Probio activ s vit. B	8,89 ± 0,03 ^d	6,59 ± 0,06 ^a	Neobsahuje
5	Syn Bio	8,39 ± 0,02 ^c	8,07 ± 0,05 ^d	Neobsahuje
6	Swiss Lactobacily 5 strain dophilus	9,82 ± 0,06 ^e	9,82 ± 0,03 ^e	9,70 ± 0,08 ^c
7	Liftea dětský probioactiv	8,12 ± 0,12 ^b	7,43 ± 0,003 ^b	Neobsahuje
8	GS Laktobacily FORTE	-	-	-

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu.

Hodnoty ve sloupcích s různými indexy se statisticky významně liší.

M – RTLV LC – nárůst *L. casei* a *L. paracasei*

M – RTLV LR – nárůst *L. rhamnosus*

Vzorek č. 8 nemohl být statisticky vyhodnocen z důvodu špatného nárůstu v několika opakováních. Mezi výrobky byl v obsahu bakterií statisticky významný rozdíl. Nárůst bakterií rodu *Lactobacillus* spp. na živném médiu MRS se pohyboval od 10^7 – 10^9 KTJ/g.

U vzorků probiotických tablet (č. 1, 3, 4, 5, 6, 7) byl obsah laktobacilů srovnatelný s údaji uvedenými na etiketě výrobku. U výrobku číslo 2 byl celkový obsah laktobacilů o jeden řád nižší.

Všechny červené kolonie (*L. casei*, *L. paracasei*), z výrobků kde byly obsaženy, na nejvyšších ředěních byly zkontrolovány pod mikroskopem. Reprezentativní kolonie byla dále podrobena identifikaci API 50 CHL. Výsledky identifikací jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tab. 13: Výsledky API izolovaných kolonií z probiotických tablet

Číslo vzorku	Výsledek API	%	T
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1	99,5	0,87
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,9	0,99
3	-	-	-
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 3	98,9	0,65
5	<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	98,9	0,80
6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,9	0,80
7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 3	97,2	0,71
8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,9	0,97

Žádná z identifikovaných kolonií nebyla určena jako *Lactobacillus casei*. U vzorků č. 1, 4, 7 byl výsledek identifikace *Lactobacillus paracasei*. I přes izolaci a identifikaci pouze červených kolonií, byla u vzorků č. 2, 6, 8 identifikována bakterie *Lactobacillus rhamnosus*. U vzorku č. 5 byla identifikovaná bakterie *Lactobacillus fermentum*, která není uvedena ve složení výrobku. U vzorku č. 3 nebyla identifikována žádná kolonie z důvodu nepřítomnosti *L. casei* ve výrobku.

Spolehlivě identifikované jsou bakterie, kde je identifikační skóre větší než 90 % a T index větší než 0,75.

Pro přesnější identifikaci kolonií byla dále využita polymerázová řetězová reakce PCR.

V následující tabulce č. 14 jsou pro kontrolu uvedeny výsledky identifikace čistých sbírkových kultur API 50 CHL.

Tab. 14: Výsledky API čistých sbírkových kultur

Čistá kultura	Výsledek API	%	T
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 3	98,9	0,65
<i>Lactobacillus casei</i> Danone	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1	99,9	0,81

Z výsledků je patrné, že API 50 CHL identifikoval spolehlivě bakterii *Lactobacillus casei* Danone jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 1, s identifikačním skóre 99,9 % a T indexem 0,81. Dobře byla identifikována také čistá kultura *Lactobacillus casei*. Tato kultura byla identifikována také jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 3.

Metoda založená na amplifikaci nukleových kyselin (PCR) byla využita k ověření identifikace bakteriálních rodů API 50 CHL. Při této metodě byla izolována DNA ze vzorků. Její úseky byly následně opakovaně namnoženy. Velikost namnoženého úseku určují dva primery.

Pro jednotlivé druhy bakterií byly použity tyto primery a teploty annealingu:

- Pro druh *Lactobacillus casei* byly použity primery Pr I a CAS II při teplotě 55 °C.
- Pro druh *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* byly použity primery LU 5 a Lpar 4 při teplotě 60 °C.
- Pro druh *Lactobacillus rhamnosus* byly použity primery LU 5 a Rhall při teplotě 60 °C (Song et al., 2000).

V následující tabulce č. 15 jsou uvedeny výsledky PCR a pro srovnání výsledky API identifikace.

Tab. 15: Výsledky PCR

Číslo vzorku	Výsledek API	PCR
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1	<i>Lactobacillus paracasei</i>
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
3	-	-
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 3	<i>Lactobacillus casei</i>
5	<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	-
6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
7	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 3	<i>Lactobacillus casei</i>
8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

Z výsledků PCR (samostatné přílohy obr. 17, 18, 19) je patrné, že dvě kolonie ze vzorků, které API 50 CHL spolehlivě identifikovalo jako *Lactobacillus paracasei* byly identifikovány jako *Lactobacillus casei*. U vzorku č. 1 byla kolonie identifikována shodně jako při identifikaci API 50 CHL. Ve výrobku z kterého je tato kolonie izolována *Lactobacillus paracasei* přítomen není. Čisté kultury použité pro kontrolu funkčnosti primerů byly identifikovány pozitivně. Bakterii *Lactobacillus rhamnosus* dokáže API 50 CHL určit spolehlivě.

Pro selekci *Lactobacillus casei* z mléčných výrobků byly využity živná média MRS – LP a MRS – B. Tyto média by měla umožňovat růst pouze bakteriím *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus acidophilus* a zároveň inhibují růst bakterií obsažených ve startovací kultuře. Ke stanovení celkového počtu bakterií rodu *Lactobacillus* spp. byla využita živná půda Rogosa. V tabulce č. 16 jsou uvedeny výsledky kultivace.

Tab. 16: Výsledky kultivace mléčných výrobků (log KTJ/g)

Číslo vzorku	Název vzorku	Živné médium		
		Rogosa	MRS - LP	MRS - B
9	Bílý jogurt nízkotučný albert Quality	7,11 ± 0,06 ^a	7,11 ± 0,01 ^a	7,12 ± 0,05 ^a
10	Bílý jogurt nízkotučný Price	7,28 ± 0,09 ^a	7,33 ± 0,03 ^a	7,37 ± 0,02 ^a
11	Jogurt nízkotučný – borůvka	5,17 ± 0,06 ^b	4,99 ± 0,03 ^a	5,13 ± 0,04 ^b

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu.

Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší.

Výrobky č. 9 a 10 vykazovaly vyrovnaný nárůst na všech použitých médiích. Nízký nárůst byl u výrobku č. 11 a tím nesplňoval terapeutické minimum 10^6 KTJ/g. U tohoto výrobku se taky nárůst na živných půdách statisticky významně lišil.

Pro kontrolu růstu na používaných živných médiích byly použity mikroorganismy z rodu *Lactobacillus* spp. V následující tabulce č. 17 jsou uvedeny všechny použité čisté kultury a výsledky jejich kultivací.

Tab. 17: Výsledky kultivace čistých kultur na různých živných médiích (log KTJ/g)

Čistá kultura	Živné médium				
	Rogosa	MRS - LP	MRS - B	MRS	M – RTLV
<i>L. casei</i> 1752	8,52 ± 0,06 ^b	8,78 ± 0,12 ^c	8,88 ± 0,04 ^c	8,85 ± 0,03 ^c	7,67 ± 0,11 ^a
<i>L. casei</i> Shirota	8,19 ± 0,03 ^a	8,83 ± 0,04 ^c	8,89 ± 0,005 ^c	8,87 ± 0,06 ^c	8,49 ± 0,05 ^b
<i>L. casei</i> Danone	9,15 ± 0,04 ^a	9,14 ± 0,08 ^a	9,22 ± 0,04 ^{ab}	9,27 ± 0,03 ^b	9,14 ± 0,02 ^a
<i>L. casei</i>	8,87 ± 0,07 ^b	9,09 ± 0,09 ^c	9,13 ± 0,06 ^c	8,95 ± 0,02 ^b	8,53 ± 0,07 ^a
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	8,48 ± 0,006 ^a	8,75 ± 0,02 ^b	8,49 ± 0,15 ^a	8,51 ± 0,008 ^a	8,41 ± 0,02 ^a
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (Yakult)	8,90 ± 0,04 ^{ab}	8,97 ± 0,004 ^b	8,79 ± 0,18 ^a	8,88 ± 0,03 ^{ab}	8,90 ± 0,04 ^{ab}
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	7,10 ± 0,05	0	0	7,60 ± 0,07	0

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu, u vzorku *L. delbrueckii* byl využit T - test. Hodnoty v řádcích s různými indexy se statisticky významně liší. 0 v tabulce znamená nulový nárůst.

Hodnoty nárůstů na různých živných půdách se statisticky významně liší. Všechny čisté kultury rostly na použitých živných půdách ve vysokých počtech $10^7 - 10^9$ KTJ/g. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* byl inhibován na třech živných půdách (MRS – LP, MRS – B, M – RTLV). Nejvyšší nárůst na všech půdách tvořila bakterie *Lactobacillus casei* Danone.

Živná půda MRS – V nebyla schopna inhibovat dostatečné spektrum bakterií které měla a výsledky jsou proto negativní.

Pro zjištění možnosti izolace *Lactobacillus casei* ze vzorků stolice byla použita živná půda M - RTLV agar.

Na tomto médiu se nepodařilo za stejných podmínek, jako byly pro probiotické tablety i za podmínek upravených izolovat *Lactobacillus casei*. Izolované kolonie z kultivované živné půdy byly kontrolovány pod mikroskopem. Některé kolonie byly určeny jako *Escherichia coli* a bakterie rodu *Clostridium* spp..

Tato živná půda byla upravována k zvýšení selekčních vlastností následovně:

- kultivace při nízkých a vysokých teplotách 15 °C, 43 °C
- různý přídavek cukrů (glukosa, rhamnosa)
- antibiotika
- anaerobní, aerobní prostředí
- pH živné půdy

Ani jedno z těchto opatření nevedlo k pozitivnímu výsledku.

6. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo ověření funkčnosti selekční živné půdy M – RTLV agar pro vzorky probiotických tablet a stolice. Dále byla testována i jiná média. Pro identifikaci izolovaných kolonií byl použit biochemický test API 50 CHL a k upřesnění polymerázová řetězová reakce PCR.

Sakai et al. (2010) se zabývali selektivním médiem M – RTLV agar pro stanovení bakterií rodu *Lactobacillus* spp. Konkrétně jde o bakterie *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Funkčnost toho média je založena na rozdílné zkvasitelnosti sacharidu L – rhamnosa mikroorganismy a redoxním indikátorem 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid (TTC).

Colombo et al. (2014) uvádějí, že redoxní indikátor 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid (TTC) je klíčové barvivo pro vizualizaci kolonií a inhibici některých bakterií mléčného kvašení. *Lactobacillus casei* není inhibován ani koncentrací 45 mg / l TTC. TTC je ovšem schopno inhibovat růst kmenu *Lactobacillus paracasei* ATCC 335 a jiných BMK.

Sakai et al (2010) dále uvádí, že inhibiční schopnost je podpořena přidávkem antibiotik vankomycinu a metronidazolu. Probiotické bakterie *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus paracasei* nefermentují sacharid přítomný v živné půdě a působí tak na ně indikátor TTC. Tvoří tak kolonie červené. Probiotická bakterie *Lactobacillus rhamnosus* sacharid přítomný v živné půdě fermentuje a vytváří tak kyselé prostředí a tím je indikátor TTC potlačen. Kolonie mají bílou až světle růžovou barvu (samostatné přílohy obr. 20). Tyto tři probiotické bakterie je agar schopen rozlišit od většiny laktobacilů a bifidobakterií. Na tomto médiu mohou růst v malém počtu bakterie *L. fermentum*, *L. sakei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*.

Výsledky této studie jsou v rozporu s mým pozorováním. Ze všech vzorků probiotických tablet byly po kultivaci odebrány všechny červené kolonie z nejvyššího ředění. Ty byly následně kontrolovány pod mikroskopem. Vždy jedna reprezentativní kolonie byla identifikována na identifikační soupravě API 50 CHL.

Z výrobku č. 3 nebyla izolována žádná kolonie, z důvodu nepřítomnosti *L. casei* ve výrobku. Ve zbylých 7 výrobcích byla ve třech případech červená kolonie identifikována jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. V dalších třech případech byla ovšem identifikována jako *Lactobacillus rhamnosus* (samostatné přílohy obr. 13) a v jednom jako

Lactobacillus fermentum (samostatné přílohy obr. 14). *Lactobacillus fermentum* ovšem nebyl přítomen ve složení výrobku.

Tato živná půda byla schopna selektovat mikroorganismy z výrobků, jak uvádí Sakai et al. (2010), ale už nebyla potvrzena její schopnost tyto bakterie barevně odlišit.

Během používání látky 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid (TTC) bylo zjištěno, že jde o velmi citlivou látku a je nutné s ní správně nakládat. Použitím kyseliny octové z důvodu změny pH živné půdy dochází k potlačení účinku TTC. Dále také při přidání TTC do živné půdy před sterilací se účinek této látky snižuje.

Při identifikaci API 50 CHL čistých sbírkových kultur *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus casei* Danone byly obě dvě spolehlivě identifikovány jako *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Identifikační souprava API 50 CHL nebyla schopna odlišit *Lactobacillus paracasei* od *Lactobacillus casei*. Tento problém spočívá zřejmě v podobnosti fermentačních profilů těchto dvou bakterií (samostatné přílohy obr. 15, 16). Z tohoto důvodu je dobré dále identifikovat jinými metodami.

Podle Song et al. (2000) byly k identifikaci pomocí polymerázové řetězové reakce využity pro *Lactobacillus casei* primery Pr I a CAS II, pro *Lactobacillus paracasei* primery LU 5 a Lpar 4 a pro *Lactobacillus rhamnosus* primery LU 5 a Rhall.

Použité primery jak uvádí Song et al. (2000) skutečně pomohly ke správné identifikaci kolonií ze vzorků (samostatné přílohy obr. 17, 18, 19).

U dvou vzorků (č. 4, 7) kde byly kolonie identifikovány pomocí API 50 CHL jako *Lactobacillus paracasei*, bylo pomocí polymerázové řetězové reakce potvrzeno, že jde o *Lactobacillus casei*. U jednoho vzorku (č. 1) byl potvrzen výsledek API soupravy a skutečně se jednalo o bakterii *Lactobacillus paracasei*. Výrobce u tohoto výrobku (č. 1) uvádí pouze *Lactobacillus casei*.

U všech kolonií (č. 2, 6, 8), které byly identifikovány jako *Lactobacillus rhamnosus* byl výsledek potvrzen.

Sakai et al. (2010) navrhuje živné médium MRS – V pro výčet *Lactobacillus casei* z fermentovaných mléčných výrobků. Médium je založeno na přidavku antibiotika vankomycinu a kultivaci při rozdílných teplotách.

Ve své práci jsem stanovoval na tomto médiu *Lactobacillus casei* z probiotických tablet. V těchto výrobcích byly obsaženy i jiné kmeny bakterií než pouze kmeny využívané při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Výsledek této studie proto nelze porovnat.

Vzhledem k typu testovaných výrobků tato půda nebyla selektivní a nelze ji doporučit pro výčet *Lactobacillus casei* z probiotických tablet. Půda umožňovala růst i jiným mikroorganismům obsaženým v tabletách.

Colombo et al. (2014) ověřil funkčnost agaru MRS – V pro výčet *L. casei* z fermentovaných mléčných výrobků. Výsledky této studie jsou pozitivní. *Lactobacillus casei* lze selektivně na této živné půdě vyčísřit, pokud je kombinován s kmeny *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Vinderola a Reinheimer (2010) uvádí možnost využití živných půd MRS - B a MRS - LP pro stanovení *Lactobacillus casei* je – li přítomen ve výrobku spolu s *Lactobacillus acidophilus* a startovacími kulturami (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) a bifidobakteriemi. Tím je půda vhodná pro stanovení z fermentovaných mléčných výrobků.

Výsledky této studie jsou srovnatelné s výsledky v této práci. Na těchto dvou živných půdách byly kultivovány tři vzorky fermentovaných mléčných výrobků. Všechny kolonie izolované z živných půd byly shodné. Pod mikroskopem nebyly pozorovány žádné koky ani bifidobakterie. Růst *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* není na této půdě možný. To bylo ověřováno naočkováním čisté kultury na obě živné půdy. Obě půdy měly negativní nárůst.

Colombo et al. (2014) ve své studii tyto výsledky potvrdil a navrhl spojení dvou živných půd MRS - B a MRS - LP. Nově vzniklá půda by při kultivaci při 43 °C byla schopna inhibovat *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus* v případě, že by se ve výrobku vyskytovaly.

Při ověřování možnosti selekce *Lactobacillus casei* ze stolice jsem využíval živnou půdu M – RTL agar jak uvádí Sakai et al. (2010). Tato živná půda nebyla schopna inhibovat všechny bakterie obsažené ve vzorcích stolice. Z nárůstu na živné půdě byly izolované bakterie rodu *Clostridium* spp. a *Escherichia coli* a další kokovité bakteriální rody. Pro omezení růstu těchto nežádoucích bakteriálních rodů byla živná půda upravována všemi možnými dostupnými prostředky.

Živná půda se vzorky byla kultivována nejprve za anaerobních podmínek při 37 °C s pH půdy 6,0. Po negativních výsledcích byla změněna teplota kultivace do teplotních extrémů, nejprve 15 °C a dále pak na 43 °C. Také byl změněn zdroj sacharidů v živné půdě. Sacharid L - rhamnosa byl nahrazen glukosou. Další možností byla změna pH živné půdy

kteřé taky nevedlo k inhibici koliformních bakteriálních rodů. Ani jedno z těchto opatření, ať už samostatně tak v kombinaci s jiným, nevedlo k zvýšení selektivních vlastností agaru.

Všechny živné půdy umožňovaly růst testovaných čistých kultur kromě *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Tato bakterie netvořila nárůst na agarech MRS - LP, MRS - B, M – RTLV. Toto zjištění je v souladu s výsledky Sakai et al. (2010) a Vinderola a Reinheimer (2010). Nejlepší nárůst na všech živných půdách tvořila probiotická bakterie *Lactobacillus casei* Danone v počtu 10^9 KTJ/g.

Spotřebitelům je doporučována denní konzumace aspoň 100 g potravin s minimálním obsahem 10^6 (tedy jeden milion) živých probiotických bakterií na 1 ml nebo 1 g výrobku. Toto je označováno jako tzv. terapeutické minimum.

Terapeutické minimum (10^6 KTJ/g) bylo splněno u dvou vzorků (č. 9, 10) fermentovaných mléčných výrobků. U vzorku číslo 11 byl obsah bakterií 10^5 KTJ/g.

U vzorků probiotických tablet (č. 1, 3, 4, 5, 6, 7) byl obsah laktobacilů srovnatelný s údaji uvedenými na etiketě výrobku. U výrobku číslo 2 byl celkový obsah laktobacilů o jeden řád nižší, než je uvedeno na etiketě výrobku.

Vzhledem k výsledkům následných identifikací kolonií z živné půdy M – RTLV agaru nelze srovnávat obsah *Lactobacillus casei* uvedený ve složení s mými výsledky.

7. Závěr

Cílem diplomové práce bylo stanovení probiotické bakterie *Lactobacillus casei* na vhodném selektivním médiu a její izolace a identifikace pomocí biochemického testu API 50 CHL a polymerázové řetězové reakce PCR. Vzorky pro stanovení byly různého charakteru. Z velké části se jednalo o vzorky probiotických tablet, dále pak vzorky fermentovaných výrobků a v neposlední řadě vzorky stolice.

Kultivace vzorků probíhala na živných půdách M – RTLV agar, MRS - LP, MRS - B, MRS – V, MRS, Rogosa.

Jako nejvhodnější médium pro stanovení *Lactobacillus casei* z fermentovaných mléčných výrobků je živná půda MRS – LP a MRS – B, pokud ovšem tento výrobek obsahuje pouze bakterie startovací kultury, *L. acidophilus* a bifidobakterie.

Z probiotických tablet je stanovení *Lactobacillus casei* náročné, vzhledem k širokému spektru bakterií, které tablety obsahují. M – RTLV agar není schopen inhibovat všechny bakterie, jiné než *L. casei*, obsažené v tabletách.

Redoxní indikátor 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid (TTC) nedokázal některé kolonie indikovat tak, jak bylo uvedeno.

M – RTLV agar není vhodné využít pro stanovení *L. casei* ze stolice. Tato živná půda umožňuje nárůst bakteriím rodu *Clostridium* spp. a *Escherichia coli*.

K identifikaci kolonií *Lactobacillus casei* je nutné použít molekulárně – genetické metody.

Většina vzorků fermentovaných mléčných výrobků splňovala hranici obsahu bakterií 10^6 . U probiotických výrobků byl obsah laktobacilů srovnatelný s hodnotami na etiketě.

8. Seznam literatury

- Al – Sheraji, S.H., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R., Hassan, F.A. 2013. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional foods*. 5. 1542 – 1553.
- Arihara, K. 2006. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat science*. 74. 219 – 229.
- Butel, M.J. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*. 1 – 4.
- Bronský, J. 2009. Probiotické kmeny v mateřském mléce. Sborník přednášek IV. Symposia společnosti pro probiotika a prebiotika. IV. 10.
- Colombo, M., Zimmermann de Oliveira, A.E., Fernandes de Carvalho, A., Nero, L.A. 2014. Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. *Food Microbiology*. 39. 89 - 95
- Čechová, L., Janalíková, M. 2007. *Obecná mikrobiologie*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Zlín. 190 s. ISBN: 978-80-7318-516-9.
- Čokášová, D., Strojný, L., Bomba, A., Siegfried, L. 2010. Probiotiká a ich vplyv vo vzťahu ku kolorektálnemu karcinómu a ateroskleróze. *Lékařský obzor*. 10. 399 – 402.
- ČSN 560094. Potravinářské výrobky. Stanovení počtu bakterií rodu *Lactobacillus*. 1988. Český normalizační institut. Praha. 8.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, E. 2003. De man, rogosa and sharpe (MRS) agar. *Progress and Industrial Microbiology*. 37. 511 – 513.
- Deshpande, G., Rao, S., Patole, S., Bulsara, M. 2010. Updated Meta-analysis of Probiotics for Preventing Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. *Pediatrics*. 125. 921 – 930.

Dias, L.G., Veloso, A.C.A., Correia, D.M., Rocha, O., Torres, D., Rocha, I., Rodrigues, L.R., Peres, A.M. 2009. UV spectrophotometry method for the monitoring of galacto – oligosaccharides production. Food chemistry. 113. 146 – 252.

European Commission. 2010. Functional foods. Publications Office of the European Union. Luxembourg. p. 24. ISBN: 978-92-79-14239-0.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. Argentina. p. 34.

Forsythe, S.J. 2010 The microbiology of safe food. Wiley – Blackwell. India. p. 476. ISBN 978-1-4051-4005-8.

Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis B.J., Stahl, D.A., Luehrsens, K.R., Chen, K.N., Woese, C.R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. Science. 209. 457 – 63.

Gibson, G.R., Fuller, R. 2000. Aspects of In Vitro and In Vivo research Approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. The Journal of Nutrition. 130. 391 – 395.

Gibson, G.R., Roberfroid, M. 2008. Handbook of Prebiotics. CRC Press. USA. p. 504. ISBN: 978-0-8493-8171-3.

Goktepe, I., Juneja, V.K., Ahmedna, M. 2006. Probiotics in food safety and human health. Taylor and Francis group. USA. p. 494. ISBN: 978-1-57444-514-5.

Goldberk, I. 1994. Functional foods. Chapman and hall. Israel. p. 571. ISBN: 978-1-4613-5861-9.

Görner, F., Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívateľov. Malé Centrum. Bratislava. 528 s. ISBN: 80-967064-9-7.

- Guarino, A., Albano, F., Ashkenazi, S., Gendrel, D., Hoekstra, H., Shamir, R., Szajewska, H. 2008. ESPGHAN/ESPID evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 46. 81 - 122.
- Hronek, M., Kuldláčková, Z., Jílek, P., Hrnčiariková, D. 2006. Probiotika v profylaxi a terapii nádorových onemocnění a vulvovaginitid. *Interní medicína pro praxi*. 3. 109 – 111.
- Hrubý, S., Turek, B. 1989. Hygienická problematika mikroflóry trávicího ústrojí u člověka. Avicenum. Praha. 136 s. ISBN: 08-067-89.
- Jardine, S. 2009. Prebiotics and Probiotics. Leatherhead Food International. United Kingdom. p. 152. ISBN: 978-1905224-52-4.
- Kailasapathy, K., Champagne, C., Moore, S. 2011. Synbiotic Yoghurt – A smart gut food: science, technology and applications. Nova Science Publishers, Inc. New York. p. 193. ISBN: 978-1-61122-517-4.
- Kalač, P. 2003. Funkční potraviny- kroky ke zdraví. Dona. České Budějovice. 130 s. ISBN: 80-7322-029-6.
- Kalliomäki, M., Collado, M.C., Salminen, S., Isolauri, E. 2008. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *American Journal of Clinical Nutrition*. 87. 534 – 538.
- Kuchta, M., Pružinec, P. 2006. Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne. Bonus CCS. Bratislava. p. 163. ISBN: 8096849174.
- Kun Lee, Y., Salminen, S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley and Sons. New Jersey. p. 596. ISBN: 978-0-470-13544-0.
- Kvasničková, A. 2000. Sacharidy pro funkční potraviny: Probiotika – Symbiotika - Prebiotika. ÚZPI. Praha. 81 s. ISBN: 80-7271-001.

Lee, Ju – Hoon., O'Sullivan, D.J., 2010. Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74. 378 – 416.

Marth, E.H., Steele, J.L. 2001. *Applied dairy microbiology*. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 744. ISBN: 0-8247-0536-X

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Mañin, M.L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspective for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. 15. 121 – 127.

Maxa, V., Rada, V. 1996. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. ÚZPI. Praha. 42 s. ISBN: 80-85120-57-7.

Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez – Humarán, L.G., Chatel, J.M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J.M., Langella, P. 2013. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology*. 16. 255 – 261.

Nevoral, J. 2005. Probiotika, prebiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*. 2. 59 – 65.

Nováková, P., Paulová, M., Buriánová, I. 2009. Role probiotických bakterií v kojeneckém věku. Sborník přednášek IV. Symposia společnosti pro probiotika a prebiotika. IV. 9.

Oliveira, R.S.R., Florence, A.R.C., Silva, R.C., Perego, P., Converti, A., Gioielli, L.A., Oliveira, M.N. 2009. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*. 128. 467 – 472.

Plocková, M., Březina, P. 1988. *Mikrobiologie mléka a tuků*. VŠCHT. Praha. 228 s.

Rada, V., Nevoral, J., Flajšmanová, K., Ročková, Š., Grmanová, M., Vlková, E., Nováková, I. 2009. Je mateřské mléko přirozeným zdrojem bifidobakterií?. Sborník přednášek IV. Symposia společnosti pro probiotika a prebiotika. IV. 11.

- Rada, V. 2008. Probiotika, prebiotika a synbiotika. Potravinářská revue. 2. 15 – 16.
- Ray, B., Bhunia, A. 2008. Fundamental food microbiology. CRC Press. Londýn. p. 492. ISBN: 978-0-8493-7529-3.
- Sakai, T., Oishi, K., Asahara, T., Takada, T., Yuki, N., Matsumoto, K., Nomoto, K., Kushiro, A. 2010. M - RTL V agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. International Journal of Food Microbiology. 139. 154 - 160.
- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. 1999. Recent progress on research and applications of non – digestible galacto – oligosacharides. International Dairy Journal. 9. 69 – 80.
- Salminen, O., Wright, A., Ouwehand, A. 2004. Lactid acid bacteria, microbiological and functional aspects. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 633. ISBN: 0-8247-5332-1.
- Savino, F., Cordisco, L., Tarasco, V., Palumeri, E., Calabrese, R., Oggero, R., Roos, S., Matteuzzi, D. 2010. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Pediatrics. 126. e526 – e533.
- Sedláček, I. 2007. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita. Brno. 270 s. ISBN: 978-80-210-4207-0.
- Shortt, C., O'Brien, J. 2004. Handbook of functional dairy products. CRC press. London. 293 s. ISBN: 1-58716-077-3.
- Schindler, J. 2010. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. Grada Publishing a.s. Praha. 248 s. ISBN: 978-80-247-3170-4.
- Schulze, J., Sonnenborn, U., Ölschläger, T. 2008. Probiotika: Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 192 s. ISBN: 978-3-8304-5356-7.

Song, Y.L., Kato, N., Liu, C.X., Matsumiya, Y., Kato, H., Wantanbe, K., 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* 187. 167 – 73.

Sungsoo Cho, S., Finocchiaro, E.T. 2010. Prebiotics and Probiotics ingredients, Health benefits and food applications. Taylor and Francis group CRC press. USA. p. 435.
ISBN: 978-1-4200-6213-7.

Sýkora, J., Schwarz, J., Siala, K. 2006. Probiotika a dětský věk. *Pediatric pro praxi.* 5. 246 – 270.

Šárka, E., Smrčková, P., Seilerová, L. 2013. Rezistentní a pomalu stravitelný škrob. *Chemické listy.* 107. 929 – 935.

Šilhánková, L. 2008. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Academia. Praha. 363 s.
ISBN: 978-80-200-1703-1.

Štursa, P., Junková, P., Strejček, M., Macek, T., Macková, M. 2010. MALDI – TOF MS snadný a rychlý způsob pro identifikaci bakterií izolovaných ze životního prostředí. *Listy cukrovarnické a řepařské.* 11. 412.

Uhlík, O., Strejček, M., Hroudková, M., Demmerová, K., Macek, T. 2013. Identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem – od kultivace k metagenomice. *Chemické listy.* 107. 614 – 622.

Vasiljevic, T., Shah, N.P. 2008. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal.* 18. 714 – 728.

Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. 2000. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *Bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International dairy journal.* 10. 271 - 275.

Vlková, E., Rada, V., Killer, J. 2009. Potravinářská mikrobiologie. ČZU v Praze. Praha. 168 s. ISBN: 978-80-213-1988-2.

Voříšek, K. 1989. Probiotika a gastrointestinální mikroflóra. ČZU v Praze. Praha. 114 s. ISBN: 80-213-007-8.

Zadrazil, K. 2002. Mlékárenství 1. vydání. ČZU a ISV. Praha. 127 s. ISBN: 80-86642-15-1.

Zbořil, V. 2005. Mikroflóra trávicího traktu- klinické souvislosti. Grada publishing. Praha. 156 s. ISBN: 80-247-0584-2.

9. Seznam použitých zkratek

C. – *Clostridium*

E. – *Enterococcus*

L. – *Lactobacillus*

Lab. – *Lactobacillus*

S. – *Streptococcus*

GIT – gastrointestinální trakt

FOS – fruktooligosacharidy

GOS – galaktooligosacharidy

RS – rezistentní škrob

MK – mastné kyseliny

TTC - 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chlorid

BMK – bakterie mléčného kvašen

ČK – čistá kultura

10. Samostatné přílohy

Použité výrobky:

Obr. 1: Vzorek č. 1



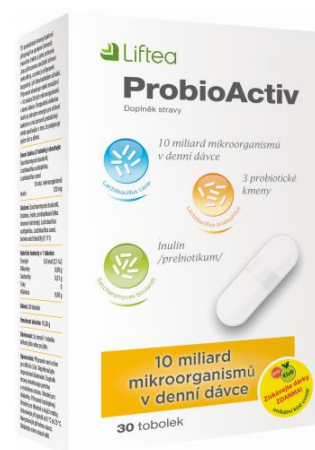
Obr. 2: Vzorek č. 2



Obr. 3: Vzorek č. 3



Obr. 4: Vzorek č. 4



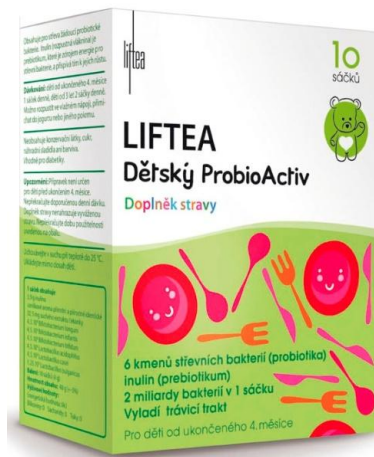
Obr. 5: Vzorek č. 5



Obr. 6: Vzorek č. 6



Obr. 7: Vzorek č. 7



Obr. 8: Vzorek č. 8



Obr. 9: Vzorek č. 9



Obr. 10: Vzorek č. 10



Obr. 11: Vzorek č. 11



API 50 CH:

Obr. 12: API 50 CH Lactobacillus casei



Obr. 13: API 50 CH Lactobacillus rhamnosus *Obr. 14: API 50 CH Lactobacillus fermentum*



Zápis fermentačního profilu API 50 CH:

Obr. 15: *Lactobacillus casei*

CE 12138 A REF.: **20011** **2012/21/02**

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pocnodzenie :

api® 50 CH BIOMÉRIEUX

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
24 h	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	3	3	3	/	/	/	3	/	/	3	3	3	3	3	3	3	3	/	3	/	3	/	3	/	/	/	2	/	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
48 h	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	3	3	3	/	/	/	3	/	/	3	3	3	3	3	3	3	3	/	3	/	3	/	3	/	/	/	2	/	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMID	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	

Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :
Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης :

Imprimé en France / Printed in France

Obr. 16: *Lactobacillus paracasei*

CE 12138 A REF.: **5622** **2012/21/02**

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pocnodzenie :

api® 50 CH BIOMÉRIEUX

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49				
24 h	/	/	/	/	3	/	/	/	3	3	3	3	/	/	/	3	/	/	3	/	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
48 h	/	/	/	/	3	/	/	/	3	3	3	3	/	/	/	3	/	/	3	/	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMID	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG					

Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :
Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

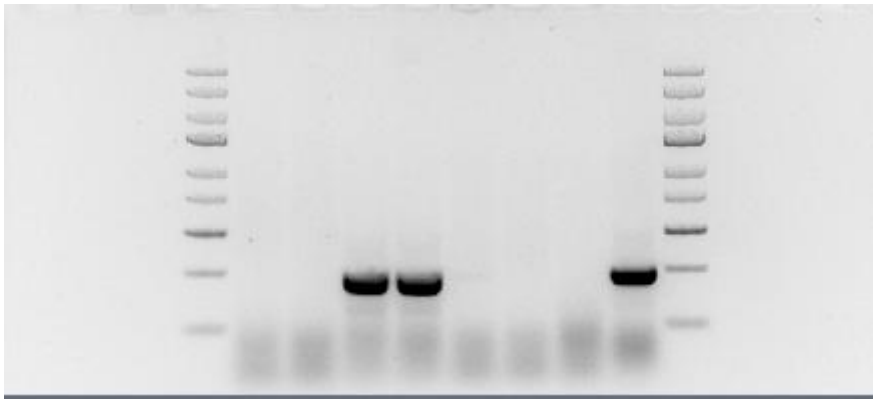
Ident. / Ταυτοποίηση :

Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης :

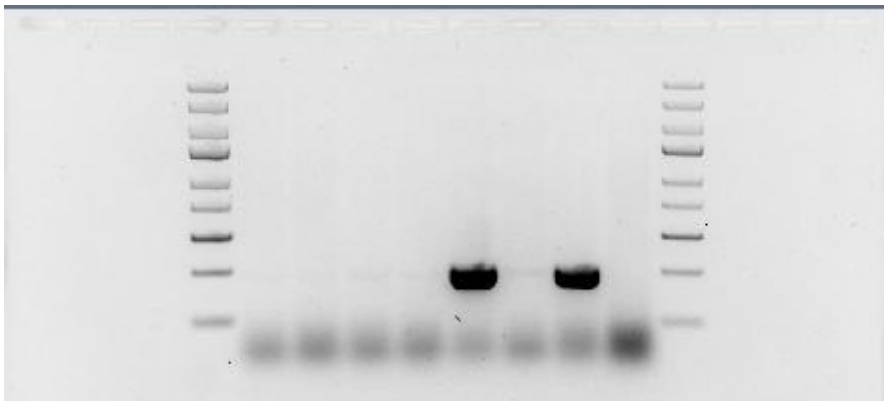
Imprimé en France / Printed in France

PCR:

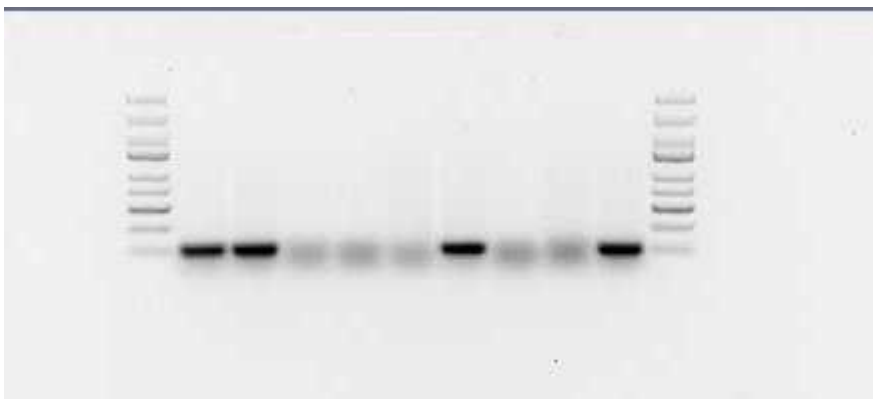
Obr. 17: Primery pro Lactobacillus casei (vz. 7, 4 + ČK)



Obr. 18: Primery pro Lactobacillus paracasei (vz. 1 + ČK)



Obr. 19: Primery pro Lactobacillus rhamnosus (vz. 2, 6, 8 + ČK)



M – RTLV agar:

Obr. 20: Ukázka kolonií na M – RTLV agaru

