

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Selektivní stanovení *Bifidobacterium bifidum* ve  
funkčních potravinách a stolici

Diplomová práce

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

**Autor práce:** Bc. Pavlína Kotasková

2012

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Selektivní stanovení *Bifidobacterium bifidum* ve funkčních potravinách a stolici“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:.....

Podpis autora práce:.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat panu prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za trpělivé vedení mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Šárce Ročkové Ph.D a Ing. Věře Bunešové Ph.D za odborné vedení a pomoc v laboratoři a všech záležitostech spojených s touto diplomovou prací.

Na závěr děkuji všem zaměstnancům Katedry Mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU Praha za příjemné pracovní podmínky.

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo nalézt selektivní médium pro stanovení druhu *Bifidobacterium bifidum*. Selektivní faktor daného média tvořil mucin, jako jediný zdroj uhlíku. Ve vědecké literatuře je prokázáno, že *Bifidobacterium bifidum* je jediný druh rodu *Bifidobacterium*, který umí mucin využít ke svému růstu. Testování bylo provedeno na funkčních potravinách a následně totožné médium bylo použito pro izolaci *Bifidobacterium bifidum* z lidské stolice.

Médium pro stanovení z funkčních potravin obsahovalo mimo mucinu ještě další selektivní faktor a to antibiotikum mupirocin. Ze získaných výsledků lze konstatovat, že tato metoda je vhodná pro izolaci *Bifidobacterium bifidum* ze vzorku funkčních potravin.

Složení média pro stanovení *Bifidobacterium bifidum* ze stolice se lišilo pouze přidáním dalšího selektivního faktoru a to kyseliny octové. Na základě výsledků, sice není metoda vhodná pro stanovení *Bifidobacterium bifidum* ze stolice, ale lze ji použít pro izolaci *Bifidobacterium bifidum*. Ze všech získaných izolátů bylo 18,5 % identifikováno jako *Bifidobacterium bifidum*.

Dalším cílem této práce bylo ověřit, zda je TOS médium vhodné pro selektivní stanovení *Bifidobacterium bifidum*. TOS médium obsahuje trans-galaktosylované oligosacharidy jako zdroj uhlíku. Rozbory byly provedeny s různými kmeny *Bifidobacterium bifidum*, které pocházely z různých zdrojů (izoláty z funkčních potravin, izoláty ze stolice a sbírkové kmeny). Na základě získaných výsledků lze říci, že TOS médium není vhodné pro selektivní stanovení *Bifidobacterium bifidum*, ani pro selektivní stanovení rodu *Bifidobacterium*. Bylo zjištěno, že ne všechny kmeny dokážou ke svému růstu využít trans-galaktosylované oligosacharidy.

Klíčová slova: *Bifidobacterium bifidum*, kojenci, stolice, funkční potraviny, stanovení

## Summary

The aim of the present work was to find the selective medium for the enumeration of the species *Bifidobacterium bifidum*. The selective factor of used media was a mucin, which was used as only one source of carbon. It is demonstrated according to the scientific literature, that the *Bifidobacterium bifidum* is only one species of genus *Bifidobacterium* who is able to utilize the mucine for its own growth and development. The testing was made on the functional food and then the same medium was used for the isolation of *Bifidobacterium bifidum* from human faeces.

Together with mucin, antibiotic mupirocin was used as the second selective factor in the medium for the enumeration of *B. bifidum* in functional foods. The results showed that this method is suitable for the enumeration and isolation of *Bifidobacterium bifidum* in samples of functional foods.

The composition of medium for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* in human faeces was different only by adding the acid acetic as the further selective factor. The results showed that the method is not suitable for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* in human faeces, but it can be used for the isolation of *Bifidobacterium bifidum*. Plates with selective agar contained 18,5 % of *Bifidobacterium bifidum*.

The second aim of this work was to verify whether the TOS medium is fit for enumeration of *Bifidobacterium bifidum*. The TOS medium contains trans-galactosylovan oligosaccharids as a sole carbon source. Analysis was made with the different strains *Bifidobacterium bifidum*, that were isolated from different sources (functional food, human faeces, and culture collection strains). The gained results showed that the TOS medium is not suitable neither for the selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, nor for the selective enumeration of the genus *Bifidobacterium*. It was discovered that some strains are limited in the utilization of trans-galactosylovan oligosaccharids for their development and growing.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, infants, faeces, functional food, enumeration

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Funkční potraviny .....	9
2.1. Obecná charakteristika .....	9
2.2. Probiotika, Prebiotika a Synbiotika .....	10
2.2.1. Probiotika.....	10
2.2.2. Prebiotika.....	13
2.2.3. Synbiotika.....	15
3. Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	15
3.1. Obecná charakteristika .....	15
3.2. Fermentační schopnosti.....	18
3.3. Výskyt .....	18
3.1. Pozitivní účinky bifidobakterií .....	21
3.2. <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	21
3.3. Stanovení rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	22
3.3.1. Selektivní média pro stanovení rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	23
3.3.2. PCR.....	24
3.3.3. Maldi Biotyper .....	26
3.3.4. Biochemické testy.....	26
4. Trávicí trakt – mikroflóra .....	27
4.1. Ústní dutina .....	28
4.2. Jícen a žaludek.....	28
4.3. Střeva .....	29
4.4. Stolice .....	29
5. Cíl práce .....	31
6. Materiál a metody .....	32
6.1. Seznam použitých funkčních potravin .....	32
6.2. Seznam použitých kmenů <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	32
6.3. Seznam použitých kmenů <i>Bifidobacterium</i> .....	33
6.4. Kultivační metody.....	33
6.4.1. Celkové počty mikroorganismů – Wilkins - Chalgren agar se sójovým peptonem (W + SP).....	34

6.4.2.	Celkové počty bifidobakterií – Wilkins - Chalgren agar se sójovým peptonem (W + SP + M) .....	34
6.4.3.	Stanovení <i>Bifidobacterium bifidum</i> – Agar M + M .....	35
6.4.4.	Porovnání růstu <i>Bifidobacterium bifidum</i> na různých zdrojích uhlíku .....	36
6.5.	Mikrobiologický rozbor .....	36
6.5.1.	Rozbory funkčních potravin .....	36
6.5.2.	Rozbory stolice.....	37
6.6.	Identifikace <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	37
6.6.1.	Fosfoketolázový test .....	37
6.6.2.	API 50 CHL test.....	38
6.6.3.	Rapid ID 32 A test.....	39
6.6.4.	Bujón s mucinem .....	40
6.6.5.	PCR .....	41
7.	Výsledky .....	43
7.1.	Rozbory funkčních potravin .....	43
7.2.	Srovnání různých zdrojů uhlíku pro růst <i>Bifidobacterium bifidum</i> - TOS a W + SP...44	
7.3.	Rozbory stolice .....	47
7.4.	Identifikace <i>Bifidobacterium bifidum</i> – MALDI Biotyper .....	50
8.	Diskuze .....	51
8.1.	Rozbory funkčních potravin .....	51
8.2.	Srovnání různých zdrojů uhlíku pro růst <i>Bifidobacterium bifidum</i> - TOS a W + SP...52	
8.3.	Rozbory stolice .....	53
9.	Závěr .....	55
10.	Citovaná literatura .....	56
11.	Použité zkratky a symboly.....	61
12.	Přílohy .....	62
12.1.	Příloha č. 1 – Příprava ředící řady .....	62
12.2.	Příloha č. 2 - Obrázek penicilínek s bujónem s mucinem.....	62
12.3.	Příloha č. 3 - Ilustrace použitých funkčních potravin .....	63
12.4.	Příloha č. 4 – Obrázek použití metody PCR .....	64

## 1. Úvod

Mikroorganismy jsou nedílnou součástí našich životů a mají pozitivní i negativní vliv na lidský organismus a na životní prostředí. Všechny tyto skutečnosti už jsou dávno známy. Společnost se snaží maximálně využít vše dobré, co nám mohou mikroorganismy nabídnout a eliminovat vše nežádoucí. V těchto směrech již bylo vykonáno mnohou pokusů a studií, ale pořád je zde spousta neznámého.

Na začátku dvacátých let dvacátého století se ve světě začaly objevovat nové potraviny, kterým se říká a říká funkční potraviny. Definice funkčních potravin dle Kalače (2003): "Funkční potravina je jakákoli potravina, která má kromě výživové hodnoty příznivý účinek na zdraví konzumenta, jeho fyzický i duševní stav. Je to potravina vyrobená z přirozeně se vyskytujících složek. Měla by se konzumovat jako součást denní stravy".

V této skupině výrobků se používají i mikroorganismy, které prospívají lidskému zdraví. Největší zastoupení v této skupině mají laktobacily, kteří patří do skupiny bakterií mléčného kvašení a bifidobakterie, které po letech studií z této skupiny byly vyjmuty a vytvořily vlastní druh.

V posledních letech je často řešeno falšování potravin a to jak klasických potravin, tak i funkčních potravin. Jsou hledány systémy a postupy, které by falšování potravin co nejvíce zamezily – kontrolní orgány, analytické, biochemické, mikrobiologické metody apod.

Na kontrolu probiotických kultur jsou například používána selektivní média, která po určité době kultivace odhalí, jestli daný výrobek obsahuje kultury, které výrobce deklaruje na obalu.

Cílem mé práce bylo vyzkoušet určité selektivní médium a vyizolovat z funkčních potravin druh *Bifidobacterium bifidum* na základě zvolených selektivních činitelů. Dále byla snaha ověřit stejné selektivní faktory při izolaci *Bifidobacterium bifidum* ze stolice kojenců.



## 2. Funkční potraviny

### 2.1. Obecná charakteristika

Kalač (2003) uvádí vymezení funkčních potravin jako: "Funkční potravina je jakákoli potravina, která má kromě výživové hodnoty příznivý účinek na zdraví konzumenta, jeho fyzický i duševní stav. Je to potravina vyrobená z přirozeně se vyskytujících složek. Měla by se konzumovat jako součást denní stravy". Pro danou účinnou látku, která se přidává do funkčních potravin, se používá termín nutraceutika (ovšem význam toho termínu se může lišit podle různých autorů). Funkční potraviny tvoří něco jako mezník mezi konvenčními potravinami a léky. Funkční potraviny však neléčí, jen se snaží udržet přirozený zdravotní stav (Kalač, 2003).

Jednotná legislativa pro danou problematiku zatím neexistuje. Pokud se potraviny vydávají do oběhu jako funkční, musí být vědecky ověřeno, jestli nemají nepříznivý vliv (např. vedlejší účinky) na zdraví člověka.

Legislativně však musí být vymezeno:

- Jaké potraviny mohou vystupovat jako funkční
- Jaké má potravina zdravotní přínosy
- Co musí být uvedeno na obalu (Kalač, 2003)

Funkční potraviny působí pozitivně proti chorobám:

- Srdečně cévní choroby
- Určité typy rakoviny
- Osteoporóza
- Poruchy trávení

Mezi významné účinné složky funkčních potravin se řadí: probiotika, prebiotika, synbiotika, antioxidanty (vitamín E, karotenoidy apod.), antikarcinogeny, vláknina, složky tuků (EPA, DPA, steroly apod.), peptidy a bílkoviny (Kalač, 2003).

První funkční potraviny byly vyvinuty již v roce 1920, kdy byla ve Švýcarsku iodizována sůl. Velkým úspěchem bylo i zamezení deficitu vitamínu A, D a B (thiamin, riboflavin, niacin) pomocí funkčních potravin. Ve 40 letech 20. století byly fortifikovány cereálie thiaminem,

riboflavinem a niacinem. V témže období Němci poprvé obohatili margarín o vitamín A, v USA začali přidávat vitamín D do mléka (Betoret, et al., 2011).

Zavedení nové funkční potraviny je velmi nákladné. Vývoj nového produktu vyžaduje detailní prostudování a provedení marketingová studie, jejímž výsledkem je určení cílové skupiny zákazníků a požadovaného množství funkční potraviny. Úspěch funkční potraviny závisí především na její chuti, vzhledu, ceně a zdravotním efektům, které zaujmou spotřebitele (Betoret, et al., 2011).

## **2.2.Probiotika, Prebiotika a Synbiotika**

Jejich hlavní funkcí je ovlivnit pozitivně střevní mikroflóru (Kalač, 2003).

### **2.2.1. Probiotika**

V roce 1958 bylo poprvé popsáno, že mikroorganismy by se mohly použít jako probiotika (Miranda, et al., 2011).

Definice podle FAO/WHO (2002): „Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v dostatečném množství, poskytují zdravotní výhody hostiteli“.

Je udáváno, že probiotické kultury mají pozitivní vliv jak na člověka, tak na zvířata (např. pozitivní působení bylo sledováno u novorozeneých telat (Heinrichs, et al., 2009)).

Mezi nejpoužívanější rody patří lactobacily a bifidobakterie, u kterých nebyl prokázán žádný negativní vliv na konzumenta (Kalač, 2003).

Probiotika mají několik prospěšných vlivů na lidský organismus:

- Udržují přirozenou střevní mikroflóru
- Zlepšují činnost imunitního systému
- Zmírňují laktózovou intoleranci
- Snižují hladinu cholesterolu v krvi
- Mají antikarcinogenní účinek
- Zvyšují nutriční hodnotu potravin

Prokázalo se u nich i několik léčebných účinků:

- Prevence zánětu močových cest
- Zmírňují problémy se zácpou
- Zabraňují průjmům – u dětí, průjem způsobený stresem nebo konzumací antibiotik

- Působí preventivně proti hypercholesterolémii
- Snižují vznik rakoviny tlustého střeva a močového měchýře
- Působí preventivně proti osteoporóze (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- Snižují projevy alergie
- Snižují zánětlivá onemocnění způsobená bakterií *Helicobacter pylori* (Schrezenmeir, et al., 2001)

V tabulce I jsou uvedeny bakteriální kmeny, které se nejvíce používají do probiotických kultur.

Tabulka I – seznam nepoužívanějších probiotických kmenů (Čurda, et al., 2012) (Kalač, 2003)

<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Bifidobacterium</i></b>	<b><i>Streptococcus</i></b>	<b><i>Enterococcus</i></b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>		<i>E. faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. reuteri</i>			

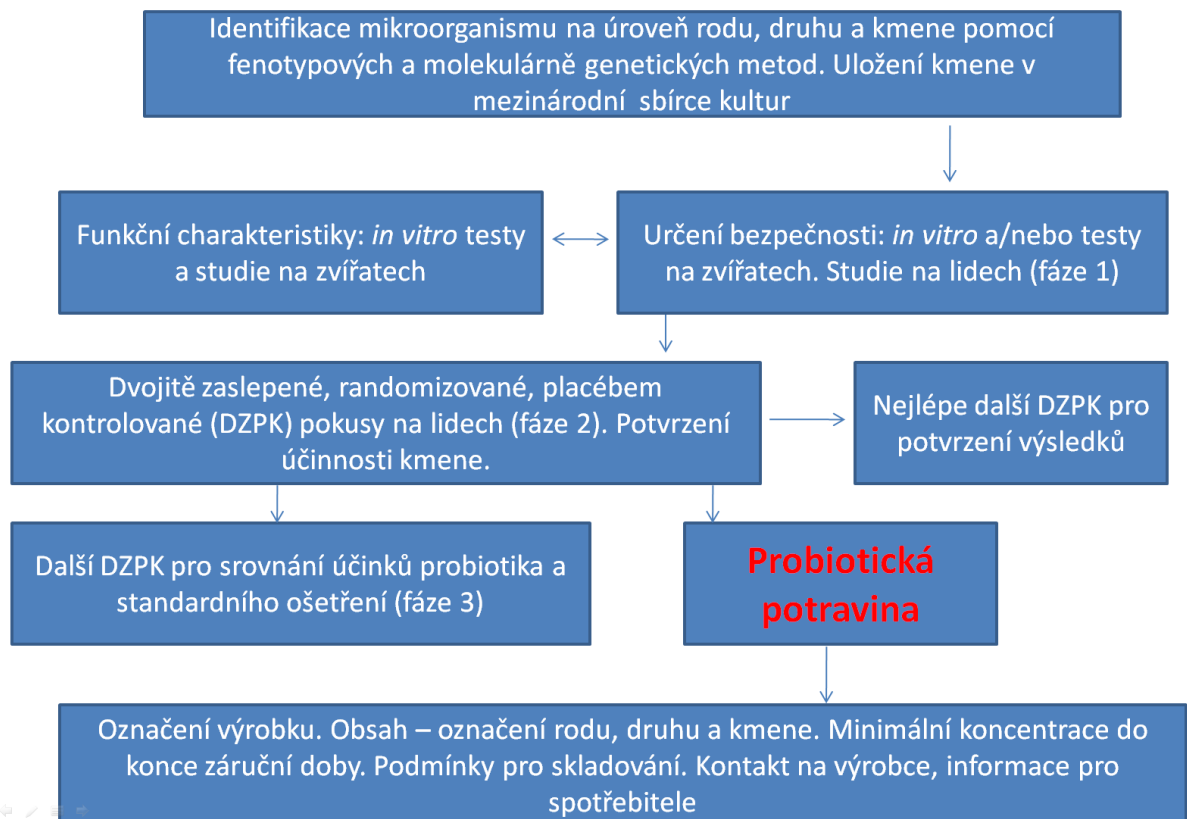
Bakterie, které patří do probiotických kultur, musí splňovat určité požadavky:

- Zdravotní – musí být lidského původu, musí být rezistentní vůči kyselinám a žluči, aby mohly kolonizovat trávicí trakt, musí působit na negativní střevní mikroflóru, jejich konzumace musí být zdravá neškodná a musí být klinicky prokázány zdravotní účinky (Rapotín, 2008)
- Technologické – musí si zachovat schopnost kolonizace lidského trávicího traktu i během skladování, sušení apod., musí se uchovat dobré organoleptické vlastnosti výrobku, musí si zachovat životaschopnost (Rapotín, 2008), nesmí podléhat mutacím a stresům vyvolanými vnějšími okolnostmi (Kalač, 2003)

Než se mohou mikroorganismy použít jako probiotika měly by projít testováním dle FAO/WHO (2002). Postup výběru probíhá v několika krocích, na obrázku 1 je uvedené schéma hodnocení probiotik pro použití v potravinách (FAO/WHO, 2002):

1. Identifikace kmene podle fenotypových a genotypových metod – musí být použity validované metody stanovení, poté je kmen uložen do mezinárodní sbírky kultur
2. Zjištění funkčních vlastností – testy se provádějí *in vitro* nebo na zvířatech, zjišťuje se bezpečnost a probiotické vlastnosti daných mikroorganismů (testy *in vitro*: rezistence vůči žaludečním kyselinám, rezistence vůči žlučovým kyselinám, antimikrobiální aktivita proti potenciálním patogenním mikroorganismům, schopnost omezit přilnavost patogenu na stěny trávicího traktu apod.)
3. Bezpečnostní kritérium – důkaz, že probiotická kultura je bezpečná a neobsahuje žádné kontaminanty (pokusy *in vitro* a *in vivo* – zvířata a první fáze pokusů na lidech)
4. Studie *in vivo* – druhá fáze pokusů na lidech zjišťuje účinnost probiotik a třetí fáze pokusů jejich efektivnost
5. Probiotická kultura – musí být potvrzena její zdravotní nezávadnost a popsána její identifikace (rod, druh, kmen), skladovací podmínky apod.

#### Schéma hodnocení probiotik pro použití v potravinách (FAO/WHO 2002)



**Obrázek 1 Schéma hodnocení probiotik pro použití v potravinách (FAO/WHO, 2002)**

### 2.2.2. Prebiotika

Existuje velké množství teorií a definic, které se týkají prebiotik. První myšlenka byla, že prebiotika budou přírodní cukry, které nebudou savci (včetně člověka) umět trávit a budou využívány pouze určitými střevními bakteriemi. Touto myšlenkou se otevřela nová perspektiva ve výživě a v potravinářském průmyslu (Reyed, 2007).

Prebiotika jsou definována podle Roberfroid (2007): „Nestravitelné složky potravin, které mají pozitivní vliv na hostitele, protože selektivně podporují růst nebo aktivitu jedné nebo omezeného počtu bakterií tlustého střeva, které mohou zlepšit zdravotní stav konzumenta“. Prebiotika se musí dostat nerozštěpené až do tlustého střeva (Kalač, 2003).

Prebiotika musí mikroflóře dodávat zdroj uhlíku a energii (Turroni, et al., 2011). Nejznámějšími prebiotiky jsou oligosacharidy, což jsou sacharidy složené ze dvou až z deseti monosacharidů (Kalač, 2003).

Oligosacharidy se dělí:

- Fruktooligosacharidy – získávají se ze sacharosy nebo řízenou enzymovou reakcí z inulinu, v tlustém střevě jsou fermentovány anaerobními bakteriemi za vzniku nižších mastných kyselin (fruktosa v této struktuře má malou energetickou hodnotu), říkají se jim tzv. rozpustná vláknina – dokážou na sebe navázat žlučové kyseliny a tím snižují množství cholesterolu v krvi (Velíšek, et al., 2009)
- Galaktooligosacharidy – vyskytují se především v mateřském mléce a ve stopovém množství v mléce kravském, v menším množství je nalezneme v luštěninách a v potravinách rostlinného původu (Velíšek, et al., 2009)
- Glucooligosacharidy – v malém množství se vyskytují ve všech potravinách, používají se jako aditivní látky, obsahují většinou glukosu a další monosacharid – zpravidla arabinosu, xylosu a rhamnosu (Velíšek, et al., 2009)
- Xylooligosacharidy – získávají se hydrolýzou arabinoxylanů, obsahují molekuly D-xylosy (Velíšek, et al., 2009)

Nejznámějšími oligosacharidy jsou sacharosa, laktosa a maltosa. Nemohou se ovšem používat jako prebiotika, jelikož jsou dobře stravitelné a jsou trávena již v tenkém střevě.

Nejpoužívanějším prebiotikem je inulin, což je triviální název a je znám takto mezi lidmi. Chemický název je fruktooligosacharid (Kalač, 2003). Inulin je vhodný zdroj uhlíku pro *Bifidobacterium bifidum* a některé druhy *Bifidobacterium longum* (Reyed, 2007).

Dalšími používanými prebiotiky jsou: galaktooligosacharidy (Russell, et al., 2011), arabinoxylan, arabinogalaktan, rafinosa (Turroni, et al., 2011), laktulosa (Russell, et al., 2011). Laktulosa je disacharid složený z jednotek laktosy (Kalač, 2003), která se ve velké míře používá v Evropě, v Japonsku a ve Spojených státech amerických (Russell, et al., 2011).

Zvláštním případem jsou sacharidy obsahující mateřské mléko. Říká se jim oligosacharidy mateřského mléka (OMM). Obsahují N-acetylglukosamin, D-glukosu, D-galaktosu, L-fukosu a kyselinu sialovou. Bifidobakterie patří mezi první mikroorganismy, které kolonizují lidský trávicí trakt, z čehož vyplývá, že tyto sacharidy umějí fermentovat (Turroni, et al., 2011) (Rockova, et al., 2011). Z dětské stolice byly vyizolovány *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum*. Zjistilo se však, že se liší jejich schopnost využívat OMM. Pravděpodobně podruh *Bifidobacterium longum* subsp *longum*, který se vyskytuje i v trávicím traktu dospělých lidí, neumí OMM využít, zatímco podruh *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* OMM využívá (Turroni, et al., 2011).

Zdravotní přínosy prebiotik:

- zvýhodňují růst žádoucí mikroflóry tlustého střeva a tím brání růstům patogenním mikroorganismům (klostridie)
- mají nízkou energetickou hodnotu - je to dáno tím, že se netráví v tenkém střevě
- zabraňují zácpě (Kalač, 2003)

Prebiotika musí splňovat tato kritéria:

1. Musí být rezistentní vůči žaludečním kyselinám, žaludeční enzymy je nesmí hydrolyzovat, nesmí být absorbovány trávicím traktem – není nutné, aby všechny složky byly rezistentní, ale je důležité, aby se dostatečné množství prebiotik dostalo do tlustého střeva
2. Střevní mikroflóra musí být schopna je fermentovat
3. Musí působit jen na střevní bakterie, které pozitivně působí na lidský organismus (Roberfroid, 2007)

Samozřejmě, že funkce prebiotik také závisí na složení probiotických kultur. Výzkumy, které se provádějí na vhodný výběr prebiotik se mohou lišit v prostředí *in vitro* a *in vivo*.

Proto jsou poslední pokusy, před schválením přípravku jako prebiotikum, prováděny *in vivo* s výběrem vhodných podmínek pro příslušný živočišný druh - člověk, hospodářská zvířata apod. (Roberfroid, 2007)

### 2.2.3. Synbiotika

Synbiotika jsou kombinací probiotik a prebiotik (Heinrichs, et al., 2009). Zvyšují možnost přežití přirozené mikroflóry a to především bifidobakteriím a laktobacilům (Bezirtzoglou, et al., 2011). Doporučují se pro kojence a starší lidi jelikož jsou citlivější vůči infekčním chorobám (Kalač, 2003).

Na základě vhodně zvolené kombinace lze posílit právě zvolenou mikroflóru, ale musí být ověřeno, zda daný mikroorganismus dokáže námi zvolené prebiotikum využít ke svému růstu. Pokud jsou použity jako prebiotikum fruktooligosacharidy a probiotikum bifidobakterie, vše je v pořádku, ale pokud by byl použit kmen *Lactobacillus casei*, nesplňuje synbiotikum požadované vlastnosti (Schrezenmeir, et al., 2001).

## 3. Rod *Bifidobacterium*

### 3.1. Obecná charakteristika

V roce 1899 (Russell, et al., 2011) byly izolovány první bifidobakterie z trávicího traktu dítěte a z mateřského mléka. Byly pojmenovány *Bacillus bifidus*. (Bifidus znamená v latině rozštěpený, rozdvojený). Orla-Jensen poprvé navrhl, že by *Bacillus bifidus* měl být klasifikovaný jako vlastní rod *Bifidobacterium*. To vše vzniklo na základě izolovaného genu, který dokazoval, že rod *Bifidobacterium* se nachází někde mezi bakteriemi mléčného a propionového kvašení (Russell, et al., 2011). V roce 1957 byla objevena jejich schopnost zkvašovat některé uhlíkaté sloučeniny (Biavati, et al., 2000).

Taxonomické zařazení:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Actinobacteria*

Třída: *Actinobacteria*

Řád: *Bifidobacteriales*

Čeleď: *Bifidobacteriaceae*

Rod: *Bifidobacterium* (Sedláček, 2007)

Bifidobakterie byly v minulosti řazeny mezi bakterie mléčného kvašení (BMK), ale liší se jejich složení nukleových bází guaninu a cytosinu – G + C od 42 % do 62% (Russell, et al., 2011).

Je známo 37 druhů bifidobakterií, které jsou rozděleny do 6 skupin. Rozdělení do skupin a identifikace byla provedena na základě 16S rRNA sekvence. Některé druhy nejsou zařazeny v žádné skupině (Turroni, et al., 2011).

1. *Bifidobacterium pseudolongum* – *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. choerinum*, *B. pseudolongum*, *B. pseudolongum* subsp. *globusum*, *B. gallicum*, *B. cuniculi*
2. *Bifidobacterium boum* – *B. thermoacidophilum* subsp. *porcinum*, *B. thermoacidophilum*, *B. thermophilum*, *B. boum*
3. *Bifidobacterium pollorum* – *B. gallinarum*, *B. saeculare*, *B. pullorum*
4. *Bifidobacterium longum* – *B. longum*, *B. longum* subsp. *suis*, *B. longum* subsp. *infantis*
5. *Bifidobacterium adolescentis* – *B. angulatum*, *B. merycicum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. ruminantum*, *B. adolescentis*
6. *Bifidobacterium asteroides* – *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. indicum*
7. Nezařazené druhy – *B. psychraerophilum*, *B. mongoliense*, *B. coagulans*, *B. magnum*, *B. tsurumiense*, *B. scardovii*, *B. breve*, *B. subtilis*, *B. bifidum*, *B. minimum*

Rod *Bifidobacterium* jsou grampozitivní nesporulující tyčinky (Bednář, et al., 1996), které se vyskytují jednotlivě, tvoří řetězce nebo shluky. Mají schopnost se větvit a to buď do tvaru písmene Y, nebo V (Russell, et al., 2011). Patogenní aktivita byla prokázána pouze u *Bifidobacterium dentium* (Bednář, et al., 1996). Kolonizují hlavně střevo, ústní dutinu a pochvu. Znaky, které je odlišují od dalších grampozitivních nesporulujících tyčinek je produkce kyseliny mléčné a octové (Greenwood, et al., 1999). Zároveň produkují malé množství etanolu, sukcinátu, mravenčanu (Šilhánková, 2008) a bifidinu. Bifidin je bakteriocin<sup>1</sup>, který má antibiotické a imunomodulační účinky. Díky produkci těchto látek, dokážou potlačit nežádoucí střevní mikroflóru jako např. bakterie *Escherichia coli*,

---

<sup>1</sup> Bakteriocin je bílkovina usmrcující citlivé druhy téhož bakteriálního druhu (Šilhánková, 2008).



*Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens* apod. (Velíšek, et al., 2009). Na obrázku 2 je mikroskopický obraz *Bifidobacterium* sp.



**Obrázek 2: *Bifidobacterium* sp.**

Optimální teplota jejich růstu je 37 – 41 °C. Nedokážou už růst pod 20 °C a nad 46 °C. Výjimku tvoří kmen *Bifidobacterium thermacidophilum*, který dokáže růst až do 49,5 °C (Maxa, et al., 1996) a *Bifidobacterium psychraerophilum*, který roste i při teplotě 4 °C (Simpson, et al., 2004). Optimální pro jejich růst je pH je 6,5 – 7 (Maxa, et al., 1996). Přičemž obvykle by pH nemělo klesnout pod 4,6 (Russell, et al., 2011) a překročit hranici 8,5 (Reyed, 2007). *Bifidobacterium bifidum* je citlivější k nízkému pH více než například *Bifidobacterium longum* nebo *pseudolongum* (Lourens-Hattingh, et al., 2001). Jsou obligátně anaerobní - v přítomnosti kyslíku mohou růst pouze *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides*. Jsou chemoorganotropní (Russell, et al., 2011). K jejich růstu je zapotřebí zdroj dusíku (aminokyseliny, peptidy apod.) a nízký redox potenciál (Lourens-Hattingh, et al., 2001). Dále potřebují ke svému růstu železo, ale dvojmocné kovové ionty mohou jejich růst inhibovat. (Ventura, 2004). Jsou katalázanegativní, vzácně může být pozitivní při růstu na vzduchu doplněném o 10 % oxidu uhličitého (Sedláček, 2007).

Růst bifidobakterií může být ovlivněn dvěma skupinami látek (Ventura, 2004):

1. Růstové faktory, které jsou metabolizovány lidským organismem nebo mikroflórou trávicího traktu (treonin, cystein, maltosa apod.)
2. Bifidogenní faktory, které dokážou bifidobakterie využít ve svém metabolismu (fruktooligosacharidy, laktoferrin, lactulosa apod.)

Rod *Bifidobacterium* je různě odolný vůči antibiotikům. Má úplnou rezistenci na streptomycin a částečnou odolnost proti penicilínu, tetracyklinu a neomycinu. Kompletně jsou vyhubeni pomocí erytromycinu nebo spiramycinu, které se používají proti bakteriálním infekcím (Reyed, 2007).

### 3.2.Fermentační schopnosti

Bifidobakterie mají enzym fruktosa-6-fosfát fosfoketolázu, který štěpí hexosu fosfát na erytrózu-4-fosfát a acetyl fosfát (Biavati, et al., 2000). Dokážou zkvašovat řadu cukrů a to za vzniku kyseliny mléčné a octové v molárním poměru 2:3 (Sedláček, 2007). Většina kmenů zkvašuje laktosu, galaktosu a rafinosu, zatímco jiné 6 - ti uhlíkaté látky, jako je např. manitol a sorbitol umí zkvašovat jen málo kmenů (Ventura, 2004). Netvoří oxid uhličitý, kyselinu máselnou ani propionovou (Sedláček, 2007). Fermentační schopnosti se liší příslušným kmenem, např. *Bifidobacterium infantis* zkvašuje pouze glukuranovou kyselinu,  $\alpha$  - L - fukosu fermentují pouze druhy *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Crociani et al., 1994).

### 3.3.Výskyt

Rod *Bifidobacterium* je důležitý pro lidské trávení a jeho zdraví. Má pozitivní vliv na organismus: stimuluje imunitní systém, redukuje cholesterol, má antimutagení a antikarcinogení účinky (Zdoroenko, et al., 2009).

Byly provedeny izoláty z lidské stolice, z kterých bylo zjištěno, že se druhově liší osídlení dospělého a dětského trávicího traktu. *Bifidobacterium adolescentis* a *Bifidobacterium longum* osídlují GIT dospělého člověka, zatímco *Bifidobacterium infantis* a *Bifidobacterium breve* byly nalezeny u dětí. V menším zastoupení byly izolovány *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium dentium*, vzácně se může vyskytnout *Bifidobacterium gallicum*. Byl zjištěn i výskyt bifidobakterií u zvířat a to u býložravců a všežravců, ale v malém zastoupení oproti jiným mikroorganismům (Endo, et al., 2010). V Tabulce II jsou uvedeny prostředí, kde byly některé kmeny bifidobakterií izolovány.

Tabulka II – výskyt určitých kmenů *Bifidobacterium*, + pozitivní nález, - negativní nález

(Crocian, et al., 1994) (Russell, et al., 2011) (Turroni, et al., 2011)

kmen	stolice dospělého člověka	stolice dítěte	ženská vagína	stolice kuřat	stolice prasat	stolice selat	stolice králíků	bachor skotu	odpadní vody	střevo čmeláka	střevo včely
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium animalis</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bifidobacterium boum</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium bombi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bifidobacterium breve</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium dentium</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium globusum</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Bifidobacterium indicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabulka II – pokračování

kmen	stolice dospělého člověka	stolice dítěte	ženská vagína	stolice kuřat	stolice prasat	stolice selat	stolice králíků	bachor skotu	odpadní vody	střevo čmeláka	střevo včely
<i>Bifidobacterium infantis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium magnum</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium minimum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium minimum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium ruminantum</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium suis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-

### 3.1. Pozitivní účinky bifidobakterií

Bifidobakterie se používají především jako probiotika. Působí pozitivně na lidský organismus – brání infekci proti patogenním mikroorganismům, stimulují imunitní systém, mají antikarcinogenní účinky a snižují cholesterol. Rod *Bifidobacterium* produkuje svým metabolismem kyseliny, tím klesá pH a to negativně působí na grampozitivní i gramnegativní patogenní mikroorganismy (Gibson, et al., 1994). Bifidobakterie produkují vitamíny a to především skupiny B (Velíšek, et al., 2009) – biotin, thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxin, kyanokobalamin a kyselinu listovou. Dokážou vytvořit enzym laktát-galaktosidasu, který zlepšuje trávení laktosy a snižuje její intoleranci (Reyed, 2007). Díky jejich působení umí tělo lépe využít železo vázané v bílkovině jako je např. laktoferrin (Ventura, 2004).

Dlouhou dobu se přidávají do fermentovaného mléka, ale využívají se i v několika dalších mléčných výrobcích jako jsou jogurty, mléko nebo sýry. Můžeme je nalézt v dětské výživě a v potravinových doplncích (Russell, et al., 2011). Často se bifidobakterie využívají v kombinaci ABT, které obsahuje mikroorganismy: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. a *Streptococcus thermophilus* (Rybka, et al., 1996).

Používají se pro obnovu původní střevní mikroflóry po nebo během konzumace antibiotik (Velíšek, et al., 2009).

Bylo objeveno, že bifidobakterie žijí v trávicím traktu s přirozenou bakteriální flórou v symbióze (oba partneři mají se soužití prospěch) nebo v komenzálistu, kde jeden z partnerů má prospěch a druhého to nijak neovlivňuje (Turroni, et al., 2011).

V roce 2009 byla provedena studie stability ve výrobku, která je důležitým parametrem pro výběr dané mikroflóry. V sušeném mléku byl stanoven počet bifidobakterií a to druhů *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum* po 24 měsících skladování při 30 °C. Bylo detekováno  $10^7$  CFU na gram výrobku (Russell, et al., 2011).

### 3.2. *Bifidobacterium bifidum*

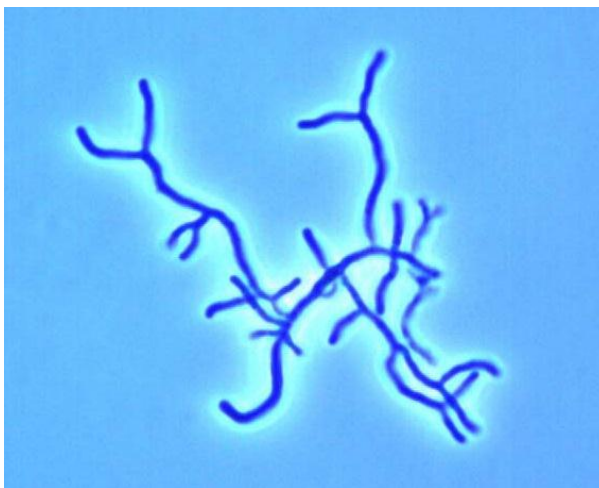
*Bifidobacterium bifidum* bylo izolováno z ženské vagíny, z lidské stolice, jak u dítěte, které je krmeno mateřským mlékem, tak i u kojence krmeného umělou výživou, dále i u dospělého člověka (Crocian, et al., 1994).

Jsou to grampozitivní nesporeující nepohyblivé tyčinky, které jsou dlouhé, větvené a tvoří shluky. Vzhled tyčinek je vidět na obrázku 3. *Bifidobacterium bifidum* je striktně

anaerobní a chemoorganotropní. Optimální teplota růstu je mezi 37 – 41 °C (VSCHT, 2012). Jsou katalasa a oxidasa negativní (Zdorovenko, et al., 2009).

Zkvašují laktosu, glukosu, galaktosu a sacharosu. Fermentují glukosu za vzniku kyseliny mléčné a octové bez přítomnosti plynu. Nedokážou využít manosu, xylosu, maltosu arabinosu (Zdorovenko, et al., 2009). *Bifidobacterium bifidum* jako jediný kmen dokáže fermentovat mucin. Mucin je výrazný zdroj uhlíku a energie pro růst bakterií (Crocian, et al., 1994).

*Bifidobacterium bifidum* kolonizuje jako jedna z prvních bakterií lidský trávicí trakt, protože umí využít zdroj uhlíku z OMM (Turrone, et al., 2011).



Obrázek 3: *Bifidobacterium bifidum*

*Bifidobacterium bifidum* bývá hodnocen jako perspektivní probiotický druh z rodu *Bifidobacterium*, který produkuje antibakteriální látky, např. proti bakteriím: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (Reyed, 2007).

### 3.3. Stanovení rodu *Bifidobacterium*

Identifikace rodu *Bifidobacterium* je založena na fenotypových a biochemických rysech: stavbě buněčné stěny, na profilu fermentovaných cukrů apod. (Ventura, 2004).

Na základě 16S rDNA sekvence lze rozeznat, rychlou metodou stanovení, 9 druhů rodu *Bifidobacterium*: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catulatum*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. lactis* (Germond, et al., 2002).

### 3.3.1. Selektivní média pro stanovení rodu *Bifidobacterium*

- **RCPB** - Reinforced Clostridial Prussian Blue (Rybka, et al., 1996)
- **M17** – médium na stanovení mléčných bakterií (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **NNLP** – neomycin, nalidixic acid, lithium chloride and paromomycine sulphate (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **Modifikovaný NNLP** (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **YN-6** – selektivní medium (Resnick, et al., 1981)
- **TOS agar** – zdroj uhlíku v tomto agaru jsou trans-galaktosylované oligosacharidy (YAKULT Pharmaceutical Industry CO., 2012)
- **L-arabinóza** (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **TOS-NNLP** (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **LP** – chlorid litný, propionát sodný (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **BL-OG** – blood glucose liver + oxgall + gentamicin (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **BIM-25** – Bifidobacterium iodoacetate medium (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **PSM** – Petuely selektivní medium (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **Modifikovaný HBSA** (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **MRS** – deMan, Rogosa and Sharpe (Rybka, et al., 1996)
- **HHD** – homofermentative heterofermentative differential (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **Modifikovaný HHD** (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **Modifikovaný TPPY** (Lourens-Hattingh, et al., 2001)
- **M – MRS** - Maltose-deMan-Rogosa-Sharpe (Rybka, et al., 1996)
- **Modifikovaný Wilkins-Chalgren agar** - s přidavkem kyseliny octové a mupirocinu (Rada, et al., 2000)
- **Modifikovaný TPY agar** - s přidavkem kyseliny octové a mupirocinu (Rada, et al., 2000)
- **TOS agar + mupirocin + kyselina octová** - (Thitaram, et al., 2005)

### 3.3.2. PCR

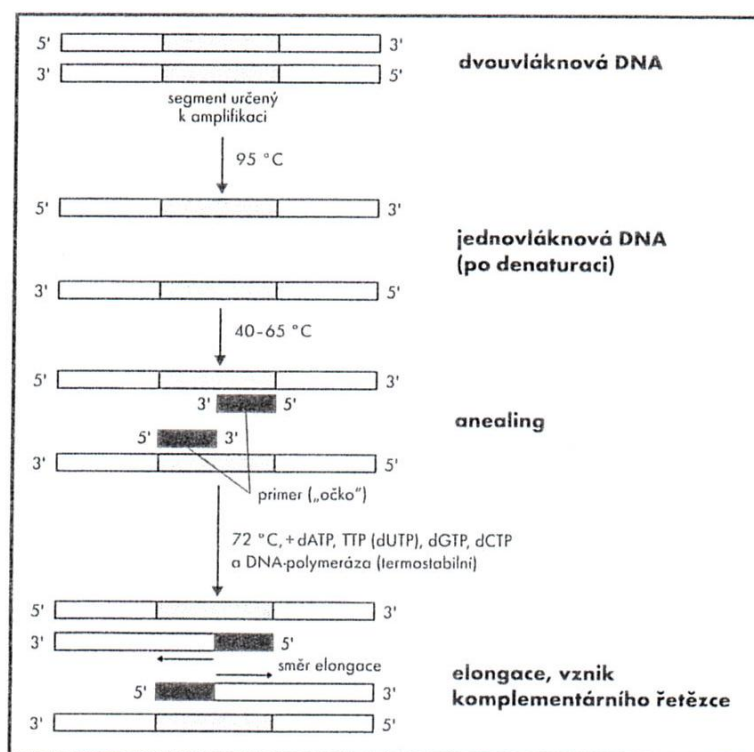
Polymerasová řetězová reakce je od roku 1986 oblíbenou metodou hlavně v oboru diagnostiky. Svoje prvenství si získala svojí rychlostí a snadností stanovení (Racek, et al., 2006).

Její použití zvýší koncentraci DNA jejím pomnožením. Enzym DNA – polymerasa dokáže k jednomu vlákně stavět vlákně komplementární. Není však schopná tvořit vlákna od začátku, tudíž musí navazovat na oligonukleotidový komplex, který se nazývá primer. V tabulce III jsou uvedeny primery pro *Bifidobacterium bifidum*. Pokud máme dva primery, které dosednou ke komplementárním úsekům obou vláken v blízkosti 3 konců, vznikne nám dvouvláknová DNA za pomoci DNA – polymerasy. Postup stanovení zahrnuje 3 kroky: denaturaci DNA, hybridizace (přiložení (annealing) primerů ke komplementární části řetězce DNA) a elongaci. Na obrázku 4 je uvedeno schéma PCR. Proces je automatizovaný a probíhá v termocyklerech (Racek, et al., 2006). Termocyklery zajišťují rychlý přechod mezi teplotami (95 °C pro denaturaci DNA, kolem 55 °C pro napojení primerů na templát, 75 °C pro syntézu DNA), součástí je většinou fluorescenční detektor, který vyhodnocuje syntetizovanou DNA (Šilhánková, 2008). Na obrázku 4 je znázorněno schéma polymerázové řetězové reakce (Racek, et al., 2006)

Teploty stanovení *Bifidobacterium bifidum*, stanovení se provádí ve 37 cyklech (Youn, et al., 2008):

1. Primer – IDH85R/IDHC2F
2. 1 cyklus – teplota 94 °C po dobu 5 minut
3. 2 – 36 cyklus:
  - a. denaturace – 94 °C po dobu 5 sekund
  - b. annealing – 69 °C po dobu 40 sekund
  - c. elongace – 72 °C po dobu 30 sekund
4. 37 cyklus – 72 °C po dobu 5 minut





Obrázek 4 Schéma PCR

Tabulka III – primery a sekvence *Bifidobacterium bifidum* (PCR druhově specifická)

Primer	Sekvence	Reference
IDH85R	AAGACACCCCGAAAGGCGT	(Kwon, et al., 2005)
IDHC2F	TCAAGGCGGAGTCGCTAGTAA	
G003f	AAGGGCTCGTAGGCGGC	(Germond, et al., 2002)
Im3r	CGGGGTGCTGCCACTTTCATG	
IDB21F	TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCT	(Kwon, et al., 2005)
IDBC1R	ATCCGAAGTACGACCGGTT	
BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	(Matsuki, et al., 1999)
BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCAAA	
IFTBIF-1	TTGCTTGGTGGTGAGAGTGGC	(Youn, et al., 2008)
IFTBIF-2	TAACCCGCATTTCCCGAG	

PCR má velmi široké uplatnění: charakterizace genů, mapování genů, analýza prehistorických DNA z fosilií, izolace určitých genů, klonování, detekce patogenních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě, prenatální diagnostika, průkaz identity v kriminalistice, určování otcovství apod. (Šilhánková, 2008).

### **3.3.3. Maldi Biotyper**

Maldi Biotyper je systém pro objektivní stanovení grampozitivních a gramnegativních bakterií, kvasinek a mnohobuněčných hub. Výsledky lze získat během několika minut bez jakýchkoliv předběžných zkoušek. Maldi Biotyper je založen na principu hmotnostní spektrometrie (Bruker, 2012).

### **3.3.4. Biochemické testy**

#### **3.3.4.1. API 50 CH test**

API 50 CH test je systém pro identifikaci mikroorganismů na základě jejich fermentačních profilů (Biomérieux, 2012). Obsahuje 50 dírek a v každé je jiný uhlíkatý substrát. Po inkubaci se pozná, který substrát byl fermentován a který nikoli.

Vyhodnocení se provádí po 24 a 48 hodinách. Výsledky se vyhodnocují podle barevných změn. Základní médium API CH/B má fialovou barvu (Davison, 2012).

Výrobce: bioMérieux SA, F-69280 Marcy l'Etoile, France

#### **3.3.4.2. Rapid ID 32 A test**

Rapid ID 32 A test je rychlá a spolehlivá metoda identifikace anaerobních bakterií. Systém je založený na enzymové degradaci substrátů pomocí bakteriálních enzymů. Rapid test je jednorázový a obsahuje 32 dehydratovaných substrátů.

Výsledky se vyhodnocují po několika hodinách dle barevných změn. Konečná identifikace je provedena pomocí identifikačního registru nebo se vyhodnotí pomocí počítačových programů (Downes, et al., 1999).

Výrobce: bioMérieux SA, F-69280 Marcy l'Etoile, France

#### 4. Trávicí trakt – mikroflóra

Mikroflóra trávicího traktu je takový ekosystém, kde se nachází přibližně 300 až 500 druhů bakterií. Po narození je trávicí trakt sterilní a bakterie ho osídlí až po prvním nakrmení (Quigley, 2010) a z prostředí (Albesharat, et al., 2001). Podle Biasucci (2010) závisí první osídlení trávicího traktu i na druhu porodu, zda se jedná o přirozený porod nebo císařský řez. Po přirozeném porodu se začíná střevní trávicí trakt osidlovat hlavně mikroorganismy z mateřské dělohy, zatím po císařském řezu až z prostředí (Biasucci, et al., 2010). Střevní mikroflóra se nejvíce mění od narození do 2 až 4 let života. Poté je už relativně stabilní (Albesharat, et al., 2001).

Mikroflóra trávicího traktu má spoustu důležitých funkcí prospěšných pro organismus:

- Syntézu živin
- Trávení potravy – správné střevní bakterie dokážou rozložit potravu, aby z ní konzument co nejlépe využil energii, a tím je omezen vznik obezity
- Absorpci potravy
- Stimulaci imunitního systému
- Kontrolu nad patogenními mikroorganismy (Russell, et al., 2011)

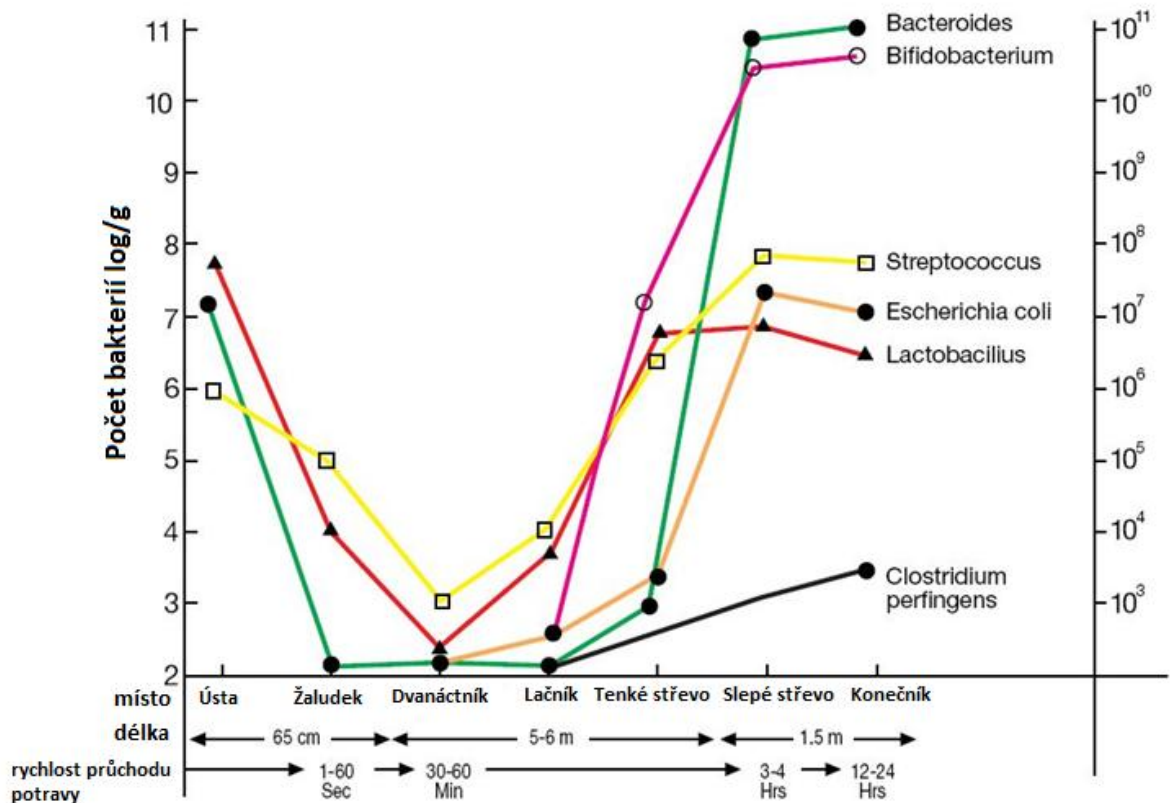
Nejvíce jsou zde zastoupeny kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Russell, et al., 2011).

V tabulce IV je souhrn anaerobních bakterií, které se nacházejí v trávicím traktu člověka.

Tabulka IV – anaerobní bakterie gastrointestinálního traktu člověka (Greenwood, et al., 1999)

Grampozitivní tyčinky	Grampozitivní Koky	Gramnegativní tyčinky	Gramnegativní koky
<i>Actinomyces</i>	<i>Coprococcus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Acidaminococcus</i>
<i>Arachnia</i>	<i>Gaffkya</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Megasphaera</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Gemmiger</i>	<i>Desulfomonas</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Fusobacterium</i>	
<i>Eubacterium</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Leptotrichia</i>	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Succinimonas</i>	
<i>Propionibacterium</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Succinivibrio</i>	
	<i>Streptococcus</i>	<i>Wolinella</i>	

Na obrázku 5 je znázorněno množství mikroorganismů, které jsou nejvíce zastoupeni v trávicím traktu člověka: *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens*.



Obrázek 5: Bakteriální zastoupení v zažívacím traktu člověka

#### 4.1. Ústní dutina

V ústní dutině je vysoký obsah snadno dostupných živin, podobně jako v tlustém střevě. Většina přítomných mikroorganismů se podílí na tvorbě zubního plaku a to především *Streptococcus mutans*. Dále je přítomna početná anaerobní mikroflóra: rody *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichie*, *Wolinella*, *Veillonella*, *Actinomycetes*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Arachnie*, *Treponena* (Bednář, et al., 1996).

#### 4.2. Jícen a žaludek

V jícnu se normální mikroflóra neproказuje, je to asi způsobeno tím, že se zde potrava dlouho nezdrží. Žaludek má kyselé prostředí, které způsobuje přítomnost kyseliny

chlorovodíkové, která omezuje výskyt bakterií. Ale je známo, že některé bakteriální druhy přes žaludek projdou dál do trávicího traktu (Bednář, et al., 1996).

### 4.3. Střeva

Ve střevě je více jak 500 druhů bakterií. Více jak 99 % střevní mikroflóry tvoří 4 hlavní skupiny: Firmicutes, Bacteroidetes, proteobakterie, aktinobakterie (Ojetti, et al., 2009). Osídlení střeva je dáno způsobem potravy (vegetariáni, vegani apod.) a také geografickou oblastí (tropy apod.).

V tenkém střevě je velmi nízká koncentrace bakterií, to je pravděpodobně způsobeno žlučí a rychlou peristaltikou střev. Zvýšená koncentrace mikroorganismů už spíše indukuje abnormální stav. Limit osídlení je pod  $10^5$  v 1 ml obsahu. Vyskytující se bakterie jsou: ústní streptokoky, enterokoky, enterobakterie a laktobacily.

V tlustém střevě a ve stolici je množství bakterií kolem  $10^9 - 10^{11}$  v 1 g obsahu. Z toho více jak 95% tvoří striktně anaerobní bakterie rodů: *Bacteriodes*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* a *Clostridium*. Tyto bakterie svými metabolismy brání růst ostatním bakteriálním druhům. Při aerobní kultivaci jsou pravidelně prokazovány enterobakterie a to především *Escherichia coli*. (Bednář, et al., 1996).

U kojenců je střevní sliznice kolonizována zejména bakteriemi rodu *Bifidobacterium*, ale pokud přejdou na umělou stravu, mikroflóra se rychle mění na podobu té dospělé (Endo, et al., 2010).

### 4.4. Stolice

Ve stolici jsou podobně jako v tlustém střevě jako hlavní mikroorganismy zastoupeny rody: *Bacteriodes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* a *Peptostreptococcus* (Russell, et al., 2011). Rod *Bifidobacterium* je převládající mikroflóra v lidské stolici (Gibson, et al., 1994).

V tabulce V jsou uvedeny obsahy základních iontů, pH a průměrné denní množství vyprodukované stolice dospělým člověkem.

Tabulka V – znázorňuje denní množství, pH a obsah základních iontů (Racek, et al., 2006)

	denní množství [ml/den]	pH	Na <sup>+</sup> [mmol/l]	K <sup>+</sup> [mmol/l]	Cl <sup>-</sup> [mmol/l]	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mmol/l]
<b>stolice</b>	50 - 150	5,9 - 8,5	1 - 12	3 - 19	1 - 3	≤ 30

Podle studie Bezirtzoglou 2011 je rozdíl v mikroflóře stolice u kojenců krmených mateřským mlékem a u krmených umělou výživou. Rod *Bifidobacterium* je v obou případech dominantní mikroflóra. U kojených dětí jsou bifidobakterie zastoupeny v 60 % u nekojených je to méně, něco kolem 30 %. U dětí krmených umělou výživou je ve velkém počtu zastoupen i rod *Bacteroides* a to kolem 28 %, zatím co u kojenců krmených mateřským mlékem jen něco okolo 11 %. Z toho vyplývá, že krmení mateřským mlékem je pro novorozence lepší, jelikož bifidobakterie mají pozitivní vliv pro lidský organismus (Bezirtzoglou, et al., 2011).

## 5. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo nalézt selektivní médium pro stanovení *Bifidobacterium bifidum* ve funkčních potravinách a ve stolici. Důvodem je ověření přítomnosti bakterie *Bifidobacterium bifidum* ve funkčních potravinách, u kterých výrobci deklarují na obalech jejich přítomnost. Dále se pokusit stejnou metodu aplikovat na izolaci *Bifidobacterium bifidum* ze vzorků stolice.

Dalším cílem bylo srovnání média TOS s používaným agarem Wilkins - Chalgren agar se sójovým peptonem. Cílem bylo zjistit, který z výše jmenovaných se hodí lépe pro stanovení *Bifidobacterium bifidum*.

### Hypotéza:

Bude použit mucin, jako hlavní zdroj uhlíku. Podle dostupných informací z odborné literatury je *Bifidobacterium bifidum* jediná bakterie z rodu *Bifidobacterium*, která ho umí využít jako zdroj energie. Mucin bude tedy jako jediný zdroj uhlíku v médiu působit jako selektivní faktor pro stanovení *Bifidobacterium bifidum*. Budou použity další selektivní faktory: mupirocin (antibiotikum) a kyselina octová (pouze pro stanovení ve stolici).

Pokud všechny kmeny *Bifidobacterium bifidum* budou využívat jako zdroj uhlíku trans-galaktosylované oligosacharidy, které jsou přítomny v TOS agaru, bude možno použít TOS agar i pro stanovení *Bifidobacterium bifidum*.

## 6. Materiál a metody

### 6.1. Seznam použitých funkčních potravin

Tabulka VI – seznam použitých funkčních potravin

Jméno	Výrobce	Datum spotřeby
APO-Baby Probio	Cell Biotech Europe A/S Havnegade 39, DK - 1058, Kodaň Dánsko	srpen 2012
Biopron junior	Valosun a. s. Kytnerova 403/5 Brno	září 2013
Infant Acidophilus	Swiss Herbal Remedies Kanada	květen 2013
Adults Dophilus	Země původu Kanada	leden 2013

Ilustrace použitých funkčních potravin jsou v příloze č. 3.

### 6.2. Seznam použitých kmenů *Bifidobacterium bifidum*

Tabulka VII – kmeny izolované z funkčních potravin

	Kmen	Zdroj
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>BM</b>	Biopron
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>Biopron 1</b>	Biopron
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>Biopron 2</b>	Biopron
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>Lepicol 1</b>	Lepicol
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>PCHD</b>	Probiotic children dophilus
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>PAD</b>	probiotic adult dophilus
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>PSB</b>	probiotik senior biotic
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>SWISS</b>	Miss
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>SYNBIO</b>	Synbio

Tabulka VIII – sbírkové kmeny

	Kmen	Zdroj
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>ATCC 29521</b>	Sbírka
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>DMS 20239</b>	Sbírka
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>DMS 20082</b>	Sbírka
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>DMS 20215</b>	Sbírka
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>DMS 20456</b>	Sbírka



Tabulka IX – kmeny izolované ze stolice

	<b>Kmen</b>	<b>Zdroj</b>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>A'3</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>AP Bif</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>DAŠ</b>	Dospělí
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>Eva V2</b>	Dospělí
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>JA8</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>JKM</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>JOV 1</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>MG4</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>OD1</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>1SVR6</b>	Dospělí
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>2M1MACH</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>2M2MACH</b>	Kojenec
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>4SV1</b>	Dospělí
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<b>4SV2</b>	Dospělí

### 6.3. Seznam použitých kmenů *Bifidobacterium*

Tabulka X – seznam použitých kmenů bifidobakterií

	<b>Kmen</b>	<b>Zdroj</b>
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp <i>longum</i>	<b>ATCC 15707</b>	Sbírka
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp <i>infantis</i>	<b>ATCC 17930</b>	Sbírka
<i>Bifidobacterium breve</i>	<b>ATCC 15700</b>	Sbírka

### 6.4. Kultivační metody

Všechny použité materiály a média byly od firmy Oxoid CZ s.r.o.

Výjimku tvoří: cystein a mucin, kteří jsou od firmy Sigma – Aldrich a TOS agar od firmy YAKULT Pharmaceutical Industry CO., LTD.

#### 6.4.1. Celkové počty mikroorganismů – Wilkins - Chalgren agar se sójovým peptonem (W + SP)

Tabulka XI – složení agaru pro celkové počty mikroorganismů

destilovaná voda [ml]	100	200
Wilkins – Chalgren agar [g]	4,3	8,6
sójový pepton [g]	0,5	1
cystein [g]	0,05	0,1
tween 80 [ml]	0,1	0,2

Tabulka XII – složení Wilkins Chalgren agar

trypton [g/l]	10
želatinový pepton [g/l]	10
kvasničný autolyzát [g/l]	5
pyruvát sodný [g/l]	1
menadion [g/l]	0,0005
hemin [g/l]	0,005
agar [g/l]	10

#### Postup přípravy:

Všechny složky v uvedené tabulce XI byly smíchány v požadovaném množství. Vzniklý roztok se nechal hodinu sterilovat při teplotě 110 °C.

#### 6.4.2. Celkové počty bifidobakterií – Wilkins - Chalgren agar se sójovým peptonem (W + SP + M)

Tabulka XIII – složení agaru pro celkové počty bifidobakterií

destilovaná voda [ml]	100	200
Wilkins – Chalgren agar [g]	4,3	8,6
sójový pepton [g]	0,5	1
cystein [g]	0,05	0,1
tween 80 [ml]	0,1	0,2

#### Postup přípravy:

Všechny složky v uvedené tabulce XIII byly smíchány v požadovaném množství. Vzniklý roztok byl povařen 20 minut ve vodní lázni a poté byl vytemperován na 50 °C a byly přidány selektivní faktory: mupirocin<sup>2</sup> (100 mg/l), kyselina octová (1 ml/l).

### **6.4.3. Stanovení *Bifidobacterium bifidum* – Agar M + M**

Tabulka XIV – složení agaru M + M

destilovaná voda [ml]	100	200
trypton [g]	0,5	1
živný bujón [g]	0,5	1
kvasničný autolyzát [g]	0,25	0,5
tween 80 [ml]	0,05	0,1
cystein [g]	0,025	0,05
technický agar [g]	2	4
mucin [g]	2	4

#### Postup přípravy:

Všechny složky uvedené v tabulce XIV byly smíchány v požadovaném množství. Mucin<sup>3</sup> je hůře rozpustný, tak bylo pro rychlejší rozpuštění použito elektromagnetické míchadlo. Bylo upraveno pH pomocí hydroxidu sodného na 7,4 a poté byl agar hodinu sterilován při teplotě 110 °C. Po sterilaci byl agar vytemperován na teplotu 50 °C a byly přidány selektivní faktory: mupirocin (100 mg/l), kyselina octová (1 ml/l), TTC (0,1 ml/100ml).

Kyselina octová byla přidávána pouze, pokud se provádí rozbor ze stolice.

---

<sup>2</sup> Mupirocin se používá od roku 1985 ve Velké Británii, ale objeven byl mnohem dříve (Udo, et al., 1999). Mupirocin je antibiotikum izolované z *Pseudomonas fluorescens*. Aplikuje se přednostně k léčení kožních nemocí (Udo, et al., 1999), a proto se neřadí mezi systémová antibiotika, ale používá se především k lokálním účelům, jako jsou např. povrchové infekce (Greenwood, et al., 1999). Dále se uplatňuje v léčbě nosních infekcí, které způsobuje *Staphylococcus aureus* (Mehtar, 1998). Toto antibiotikum má nepřímý účinek na syntézu bílkovin. Inhibuje syntézu t-RNA inaktivací izoleucyl-t-RNA syntetázy (Bednář, et al., 1996).

<sup>3</sup> Mucin je multifunkční glykoprotein, který má jako základní funkci chránit a lubrikovat povrch epitelových tkání v buněčných dutinách. Ve velkém množství se nachází ve slinách (Andrianifahanana, et al., 2006). V našich pokusech byl použit prasečí mucin.

#### 6.4.4. Porovnání růstu *Bifidobacterium bifidum* na různých zdrojích uhlíku

##### 6.4.4.1. TOS agar a W + SP agar

###### 1. TOS agar

Tabulka XV – složení TOS agaru

pepton z kaseinu [g/l]	10
kvasničný autolyzát [g/l]	1.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [g/l]	3.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [g/l]	4.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [g/l]	3.0
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O [g/l]	0.2
L-cystein HCl · H <sub>2</sub> O [g/l]	0.5
propionát sodný [g/l]	15
transgalaktosylované oligosacharidy [g/l]	10
agar [g/l]	15
pH	6,7

###### Postup přípravy:

Bylo naváženo 6,25 g TOS agaru do 100 ml destilované vody, nechal se rozpustit a sterilovat 1 hodinu při teplotě 110 °C. Po sterilaci byl agar vytemperován na teplotu 50 °C a byla přidána bromkresolová červeň (10 g/l – byl udělán zásobní roztok s etanolem a z něho byl vždy odebrán 1 ml/l).

###### 2. Agar W + SP

Byl připraven dle návodu: viz 6.4.1.

#### 6.5. Mikrobiologický rozbor

##### 6.5.1. Rozbory funkčních potravin

1. Z požadovaného vzorku byl odvážen 1g, který byl rozpuštěn v bujónu W + SP.
2. Dále byla udělána ředící řada: první ředění byl požadovaný vzorek v bujónu, z něhož byl přeočkován 1 ml do další zkumavky se živným bujónem. Pokračovalo se takto až do 9. ředění. Znázorněno schematicky v příloze č. 1.

3. Byl uvařen agar dle návodu 6.4.1. – 6.4.3.: agar pro celkové počty mikroorganismů, agar pro celkové počty bifidobakterií, agar M + M pro *Bifidobacterium bifidum*.
4. Agar M + M – hotový agar byl rozlit na velké misky (cca 10 ml na miskou), byl ponechán ztuhnout a bylo na něj přeočkováno 0,1 ml vzorku ze 4 - 8 ředění. Po naočkování byl proveden roztěr pomocí skleněné tyčinky.
5. Agar na celkové počty mikroorganismů (W + SP) a na celkové počty bifidobakterií (W + SP + M) – do malé misky bylo naočkováno 0,5 ml vzorku a bylo přelito 5 ml agaru. U agaru W + SP bylo použito ředění 7 – 9 a u agaru W + SP + M 5 – 9 ředění.
6. Kultivace byla provedena v anaerostatu po 3 dny při teplotě 37 °C.

### 6.5.2. Rozbory stolice

1. Vzorek stolice od dárce musel být zpracován do 24 hodin od odebrání. Vzorek byl odebrán do zkumavky, kde byl bujón W + SP. Zkumavka byla zvážená s bujónem dříve, než do ní byla přidána stolice, aby byla známa hmotnost vzorku.
2. Dále bylo pokračováno stejně, jako u rozboru funkčních potravin viz 6.5.1. bod 2.

## 6.6. Identifikace *Bifidobacterium bifidum*

### 6.6.1. Fosfoketolázový test

Identifikace bifidobakterií na úrovni rodu.

#### Použité roztoky:

1. Roztok 1: Bifi pufr – složení: 0,36 g  $K_2 HPO_4$  + 0,10 g  $KH_2 PO_4$  + 0,15 g cysteinu + 300 ml destilované vody, upravit pH 6,5
2. Roztok 2: 120 mg NaF + 200 mg Na-indoacetátu + 20 ml destilované vody
3. Roztok 3: 4,17 g hydroxylaminu + 30 ml destilované vody, upravit pH 6,5 pomocí 2 ml 40 % NaOH
4. Roztok 4: 3 g TCA + 20 ml destilované vody
5. Roztok 5: 2,48 ml HCl + 17,52 ml destilované vody
6. Roztok 6: 1 g  $FeCl_3$  + 62  $\mu$ l koncentrované (35 %) HCl + 20 ml destilované vody
7. Roztok 7: 290 mg fruktoso-6-fosfátu + 5,5 ml destilované vody

### Pracovní postup:

10 ml narostlé kultury bylo odstředěno po dobu 8 minut (9000 g) v odstředivce. Poté byl vzorek slit a buňky byly propláchnuty roztokem č. 1. Dále byl přidán 0,2 ml CTAB (koncentrace: 0,45 mg/ml dH<sub>2</sub>O) a vzorky se nechaly kultivovat 5 minut při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 0,5 ml roztoku č. 1, 0,125 ml roztoku č. 2 a 0,2 ml roztoku č. 7. Vzorky se nechaly kultivovat ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Aby se zastavila enzymové reakce, byl přidán roztok č. 3 0,750 ml a znovu se vzorky nechaly kultivovat 10 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku č. 4 a 5 a 0,5 ml roztoku č. 6 pro vytvoření barevné reakce.

### Výsledek:

- Pozitivní: fialové zbarvení
- Negativní: žluté zbarvení

## **6.6.2. API 50 CHL test**

Musí se pracovat maximálně asepticky. Identifikace na úrovni druhu.

### Použitá média:

- Suspenzní médium – 2 a 5 ml – demineralizovaná voda
- API 50 CHL médium 10 ml – složení je uvedeno v tabulce XVI

Tabulka XVI – složení API 50 CHL média 10 ml

polypepton [g]	10
kvasničný autolyzát [g]	5
tween 80 [ml]	1
hydrogenfosforečnan draselný [g]	2
octan sodný 5 H <sub>2</sub> O [g]	5
diamonium citrát [g]	2
síran hořečnatý 7 H <sub>2</sub> O [g]	0,2
síran hořečnatý 4 H <sub>2</sub> O [g]	0,05
bromkresolová červeň [g]	0,17
demineralizovaná voda [ml]	100

### Pracovní postup:

1. Vzorek byl stočen v odstředivce po dobu 3 minut (9000 g).
2. Vzorek byl slit a sediment promyt 0,5 ml BifiPufu a znovu slit.

3. Sediment byl znovu opatrně promíchán s BifiPufrem (pozor na vzduch, promíchává se stříkačkou) a opakovaně byl vzorek stočen po dobu 3 minut.
4. Vzorek byl slit a omyt 0,3 ml BifiPufrem, znovu slit a promíchám v 0,7 ml BifiPufrem a natáhnut do stříkačky.
5. Do 5 ml suspenzního média byl pomalu přikapáván vzorek do zákalu 2 dle zákalové stupnice (nutné si pamatovat množství vzorku).
6. Poté bylo přidáno dvakrát tolik vzorku do média API 50 CHL, opatrně bylo médium promícháno (bez přístupu vzduchu).
7. Poté byl takto připravený vzorek aplikován do kitu. Do každé komůrky bylo dáno cca 80 % jejího objemu.
8. Kit byl anaerobně uzavřen a vyhodnocení se provádí po 24 a 48 hodinách.
9. Hodnocení dle stupnice 0 – 3.

#### Výsledky:

Hodnotí se dle zbarvení:

- Negativní – fialová (0)
- Pozitivní – zelenofialová (1), zelenožlutá (2), žlutá (3)
- U komůrky 25 je pozitivní černé zbarvení

### **6.6.3. Rapid ID 32 A test**

Musí se pracovat maximálně asepticky. Identifikace je prováděna na úrovni druhu.

#### Činidla:

- Fosfátový (Bifi) pufr (FB)
- James činidlo
- NIT 1, NIT 2
- McFarland Standard
- Suspenzní médium – 2 a 5 ml – demineralizovaná voda

#### Pracovní postup:

1. Vzorek byl stočen v odstředivce po dobu 3 minut (9000 g).
2. Vzorek byl slit a sediment promyt 0,5 ml BifiPufrem a znovu slit.
3. Sediment byl znovu opatrně promíchán s BifiPufrem (pozor na vzduch, promíchává se stříkačkou) a opakovaně byl vzorek stočen po dobu 3 minut.

4. Vzorek byl slit a omyt 0,3 ml BifiPufru, znovu slit a promíchám v 0,7 ml BifiPufru a natáhnout do stříkačky.
5. Do 5 ml suspenzního média byl pomalu přikapáván vzorek do zákalu 5 dle zákalové stupnice.
6. Do každé dírky byl nakapán vzorek a po 4 hodinách inkubace při 37 °C byl znám výsledek.
7. Po uplynulé době bylo do 2 řady přidáno: 1 jamka – NIT 1 a 2; 2 jamka – James činidlo; zbytek jamek - McFarland Standard.
8. Vyhodnocení po 5 minutách dle příslušné literatury.

#### 6.6.4. Bujón s mucinem

*Bifidobacterium bifidum* je jediný druh, který umí využít mucin. Bylo to ověřeno přeočkováním do bujónu s mucinem druhy: *Bifidobacterium longum* subsp *longum*, *Bifidobacterium longum* subsp *infantis*, *Bifidobacterium breve* – po 24 hodinách nenarostly. *Bifidobacterium bifidum* narostl a je to patrné po barevné změně z fialové barvy na jasně žlutou. Barevná změna je znázorněna v příloze č. 2.

Tabulka XVII – složení bujónu s mucinem

destilovaná voda [ml]	300	900
trypton [g]	1,5	4,5
živný bujón [g]	1,5	4,5
kvasničný autolyzát [g]	0,75	2,25
tween [ml]	0,15	0,45
cystein [g]	0,075	0,225
mucin [g]	3	9

#### Postup přípravy:

Všechny složky z tabulky XVII byly smíchány v požadovaném množství. Bylo upraveno pH na 7,8 a přidána bromkresolová červen (10 g/l – byl udělán zásobní roztok s etanolem a z něho bylo vždy odebráno 1 ml/l). Do zkumavek (penicilínek) bylo napipetováno 9 ml, byly povařeny, probublány oxidem uhličitým a rychle uzavřeny. Nechaly se sterilovat 1 hodinu při teplotě 110 °C.



### 6.6.5. PCR

Byla použita rodově specifická PCR pro stanovení *Bifidobacterium bifidum*. V první fázi musela být udělána izolace DNA daného vzorku a následně samotné stanovení metodou PCR.

#### Izolace DNA

Do ependorfy byl napipetován 1 ml vzorku, který byl odstředěn v odstředivce (4000 g). Odstředěný supernatant byl slit a v ependorfce zbyl pouze pevný obsah vzorku (DNA, bílkoviny, apod.). Dále bylo přidáno 100 µl reakčního činidla (PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent) a vzorek se nechal reagovat při teplotě 100 °C 10 minut. Po uplynulé době byl vzorek znovu odstředěn a do nové ependorfy bylo napipetováno 50 µl tekutého odstředěného vzorku.

#### Metoda PCR

Příprava vzorku před stanovením:

Konečný objem vzorku byl 25 µl. Z toho 12,5 µl je PCR mix a 10,5 µl PCR vody (Fermentas), 1 µl Primer 1 a 1 µl Primer 2 (Metabios international AG) – použité primery jsou uvedeny v tabulce XVIII a nakonec byl přidán 1 µl vyizolované DNA.

PCR probíhá v termocykleru dle nastavených podmínek, stanovení probíhá ve 37 cyklech:

1. 1 cyklus – teplota 94 °C po dobu 5 minut
2. 2 – 36 cyklus:
  - a. denaturace – 94 °C po dobu 20 sekund
  - b. annealing – 59 °C po dobu 20 sekund
  - c. elongace – 72 °C po dobu 30 sekund
3. 37 cyklus – 72 °C po dobu 5 minut

Tabulka XVIII – použité primery

Druh	Primer	Sekvence	Teplota annealing	Produkty PCR (bp)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BiBIF-1	5'-CCACATGATCGCATGTGATTG-3'	59 °C	278
	BiBIF-2	5'-CCGAAGGCTTGCTCCCAAA-3'		

### Separace PCR produktu

Pro elektroforetickou separaci amplifikovaného PCR produktu byl použit 1% agarózový gel (Serva) s přídavkem GelRed (BIOTUM) pro vizualizaci produktu. Separace probíhala na horizontální elektroforéze (OWL A2, Portsmouth) při konstantním napětí 7 V.cm<sup>-1</sup>. DNA fragmenty budou vizualizovány pomocí Gel-Doc systému (BioRad). V případě pozitivní reakce s použitím primerů BiBIF-1 a BiBIF-2 vzniká PCR produkt o velikosti 278 bp. Pro kontrolu velikosti produktu bude použit Express DNA Ladder (Fermentas).  
Obrázek separace PCR je uveden v příloze č. 4.

## 7. Výsledky

### 7.1. Rozbory funkčních potravin

Rozbor byl proveden ze 4 vzorků z funkčních potravin. Informace o vzorcích jsou uvedeny v tabulce VI. U potravin byly sledovány celkové počty bakterií a celkové počty bifidobakterií. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce XIX.

Tabulka XIX – celkové počty mikroorganismů v 1 g funkční potraviny

Funkční potravina	CP log KTJ/ 1 g ± SD	CP Bif log KTJ / 1 g ± SD
<b>APO-Baby Probio</b>	8,93 ± 0,05	8,34 ± 0,07
<b>Biopron junior</b>	9,56 ± 0,00	9,36 ± 0,06
<b>Infant Acidophilus</b>	9,66 ± 0,06	9,01 ± 0,03
<b>Adults Dophilus</b>	9,93 ± 0,00	9,18 ± 0,00

V další fázi pokusu byl proveden rozbor na agaru s mucinem a mupirocinem, kde byla snaha izolovat *Bifidobacterium bifidum*. Tento pokus už byl v minulosti na katedře Mikrobiologie, výživy a dietetiky vyzkoušen, tudíž z každého vzorku byly odebrány pouze 3 izoláty.

První předběžná identifikace byla provedena mikroskopicky, kde proběhla identifikace rodu *Bifidobacterium* (mají v mikroskopu tvar větvených tyčinek do tvaru V a Y a často agregují). Na základě těchto zjištění byly vzorky přeočkovány do bujónu s mucinem a poté vždy u jednoho reprezentativního izolátu z každého vzorku funkčních potravin, byla provedena identifikace pomocí PCR. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce XX.

Tabulka XX – Identifikace izolátů ze vzorků funkčních potravin.

Funkční potravina	Izolát	Růst na mucinu	PCR
<b>APO-Baby Probio</b>	1	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<b>Biopron junior</b>	2	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<b>Infant Acidophilus</b>	3	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<b>Adults Dophilus</b>	4	-	Neidentifikováno

Pouze u výrobku Adults Dophilus se nepodařilo izolát identifikovat jako *Bifidobacterium bifidum*, a proto potvrzení identifikace bylo ještě doplněno biochemickými testy: API 50 CHL test a Rapid ID 32 A test, které taktéž vyvrátily, že by se jednalo o *Bifidobacterium bifidum*.

## 7.2. Srovnání různých zdrojů uhlíku pro růst *Bifidobacterium bifidum* - TOS a W + SP

Účelem těchto rozborů bylo dokázat, zda by se TOS agar mohl stát selektivním médiem pro stanovení *Bifidobacterium bifidum*. V tabulce XXI jsou uvedeny výsledky měření, kde jsou patrné určité růstové rozdíly.

Tabulka XXI – výsledky porovnání růstu na TOS a W + SP

Vzorek	TOS – log KTJ ± SD	W+SP – log KTJ ± SD
Biopron 2	8,52 ± 0,01	8,55 ± 0,01
JKM	8,09 ± 0,02	8,25 ± 0,05
BM	8,47 ± 0,02	8,62 ± 0,01
JOV 1	8,47 ± 0,07	8,45 ± 0,02
OD1	7,60 ± 0,03	7,46 ± 0,03
AP Bif	8,96 ± 0,05	9,16 ± 0,04
MG4	7,89 ± 0,01	7,94 ± 0,06
Eva V2	7,83 ± 0,02	7,87 ± 0,03
Lepicol 1	8,40 ± 0,01	8,56 ± 0,03

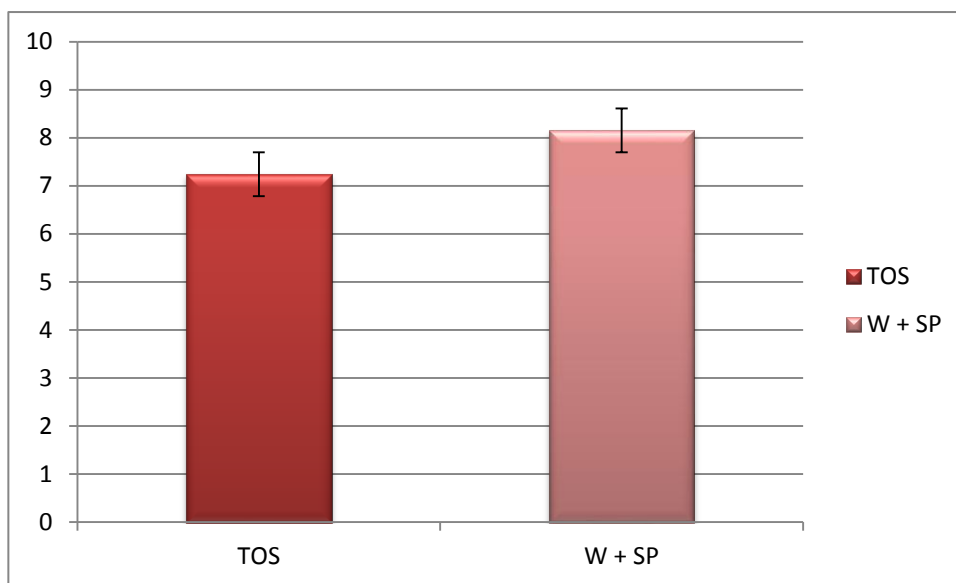
vzorek	TOS - log KTJ ± SD	W+SP – log KTJ ± SD
A'3	7,88 ± 0,05	7,90 ± 0,02
JA8	8,26 ± 0,02	8,25 ± 0,05
Biopron 1	8,50 ± 0,01	8,51 ± 0,02
DAŠ	7,34 ± 0,00	7,10 ± 0,04
ATCC 29521	0,00 ± 0,00	8,49 ± 0,03
DMS 20239	8,18 ± 0,04	7,65 ± 0,04
DMS 20082	8,23 ± 0,06	8,05 ± 0,03
DMS 20456	0,00 ± 0,00	8,01 ± 0,03
DMS 20215	7,71 ± 0,07	7,94 ± 0,01

Pozn.: Žlutě zvýrazněné vzorky na daném agaru nenarostly

Průměrné počty kolonií byly na TOS agaru 7,24 log KTJ ± 0,027 SD a na W + SP agaru 8,15 log KTJ ± 0,04. Průměrné hodnoty jsou znázorněny v grafu č. 1. Kmeny ATCC 29521 a DMS 20456 na TOS agaru vůbec nerostly, zatímco na W + SP ano.

Soubor výsledků byl vyhodnocen statistickou metodou: Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů. Na základě významnosti  $\alpha = 0,05$  však nebyla zjištěna statisticky významná chyba. Dále byly výsledky vyhodnoceny dvouvýběrovým testem s nerovností rozptylů na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a také nebyl zjištěn statistický rozdíl.

Graf č. 1 – Průměrné počty kolonií na jednotlivých agarech [log KTJ]



U dalších kmenů bylo testováno, zda bakterie *Bifidobacterium bifidum* rostou nebo nerostou na TOS agaru a W + SP. V tabulce XXII jsou uvedeny výsledky rozboru 15-ti dalších kmenů. Sbírkové kmeny byly použity pro porovnání.

Tabulka XXII – výsledky rozboru na TOS agaru a W + SP agar, + roste - neroste

	vzorek		růst	Zdroj
1	4SV1	TOS	+	dospělí
		W+SP	+	
2	4SV2	TOS	+	dospělí
		W+SP	+	
3	1SVR6	TOS	+	dospělí
		W+SP	+	
4	SYNBIO	TOS	+	Synbio
		W+SP	+	
5	PCHD	TOS	+	Probiotic children dophilus
		W+SP	+	
6	PAD	TOS	+	Probiotic adult dophilus
		W+SP	+	
7	PSB	TOS	+	Probiotik senior biotic
		W+SP	+	
8	SWISS	TOS	+	Swiss
		W+SP	+	
9	2M1MACH	TOS	+	kojenec
		W+SP	+	
10	2M2MACH	TOS	+	kojenec
		W+SP	+	
11	ATCC 29521	TOS	-	sbírka
		W+SP	+	
12	DMS 20239	TOS	+	sbírka
		W+SP	+	
13	DMS 20082	TOS	+	sbírka
		W+SP	+	
14	DMS 20456	TOS	-	sbírka
		W+SP	+	
15	DMS 20215	TOS	+	sbírka
		W+SP	+	

Pozn.: Žlutě zvýrazněné kmeny na daném agaru nenarostly

Jak je vidět v tabulce XXII, kmeny izolované z různých zdrojů na TOS agaru rostou. Nepotvrdil se pouze opakovaně růst 2 sbírkových kmenů ATCC 29521 a DMS 20456.

### 7.3.Rozbory stolice

Rozbory stolice byly provedeny na 6 - ti vzorcích, jejichž dárci byli kojenci různého věku. V tabulce XXIII jsou uvedeny doplňující informace k dárčům.

Tabulka XXIII – doplňující informace k dárčům stolice

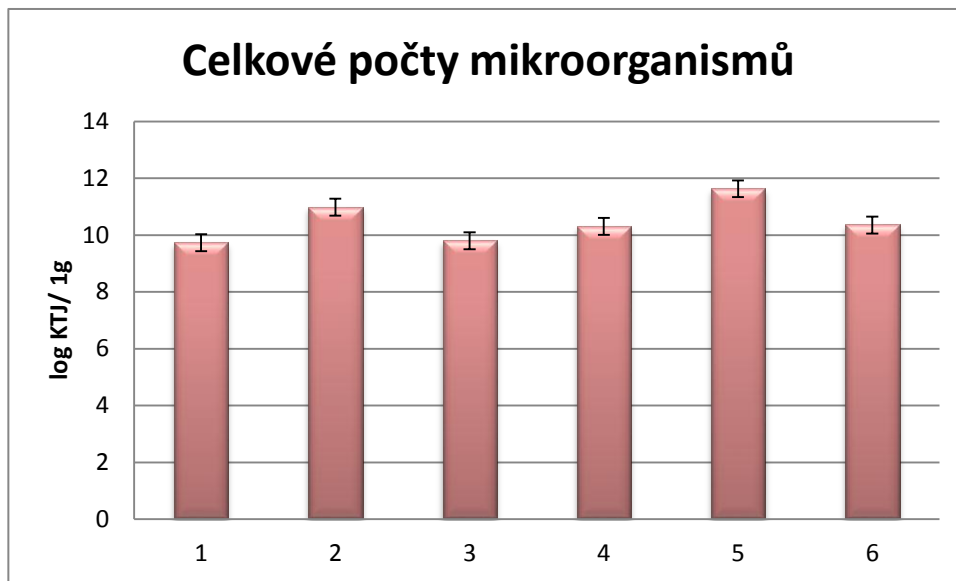
Kojenec	Datum narození	Datum odběru stolice	Stáří [dny]	Druh porodu	Strava
1	30. 7. 2011	15. 8. 2011	16	přirozený porod	kojené
2	6. 10. 2011	24. 10. 2011	18	císařský řez	kojené
3	18. 3. 2011	16. 10. 2011	213	císařský řez	zeleninové příkrmy bez Bif.
4	10. 5. 2011	16. 10. 2011	159	přirozený porod	kojené
5	6. 4. 2011	16. 10. 2011	193	přirozený porod	zeleninové a ovocné příkrmy bez Bif.
6	6. 2. 2011	16. 10. 2011	245	přirozený porod	mléčná strava s Bif.

Byly provedeny rozbory stolice, jejichž cílem bylo zjistit celkové počty mikroorganismů a celkové počty bifidobakterií. V tabulce XXIV jsou uvedeny počty kolonií. Na grafu č. 2 a č. 3 jsou znázorněny celkové počty kolonií jednotlivých vzorků stolice. Průměrná hodnota celkových počtů mikroorganismů byla  $10,46 \log \text{KTJ} \pm 0,04 \text{SD}$ .

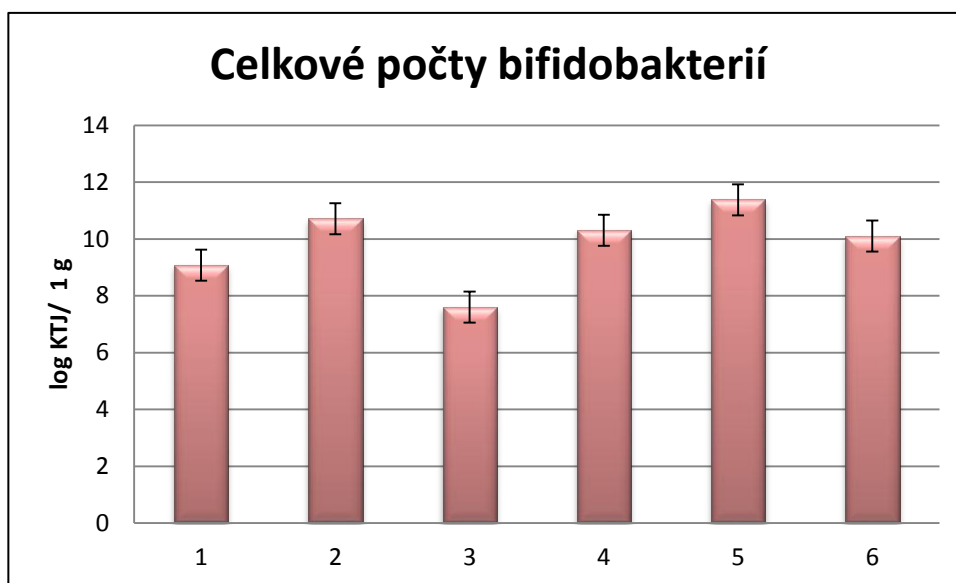
Tabulka XXIV – celkové počty kolonií v 1 g vzorku stolice

Kojenec	CP log KTJ/ 1 g ± SD	CP Bif log KTJ / 1 g ± SD	Počet bifidobakterií v %
1	9,73 ± 0,04	9,08 ± 0,03	22,3
2	10,98 ± 0,02	10,71 ± 0,08	53,7
3	9,80 ± 0,04	7,60 ± 0,00	0,63
4	10,31 ± 0,01	10,31 ± 0,00	100
5	11,63 ± 0,03	11,38 ± 0,04	56,2
6	10,35 ± 0,15	10,10 ± 0,04	56,2

Graf č. 2 - Celkové počty mikroorganismů jednotlivých vzorků stolice



Graf č. 3 – Celkové počty kolonií bifidobakterií jednotlivých vzorků stolice



Z každého rozboru z agaru M + M byly identifikovány izoláty *Bifidobacterium bifidum*. Na agaru byly rozeznatelné tři barvy kolonií – červené, růžové a bílé (díky použití TTC). Byly vzaty tři izoláty kolonie od každé barvy, z libovolného ředění.

První předběžná identifikace byla provedena mikroskopicky – identifikace rodu *Bifidobacterium*. Bohužel už v této fázi identifikace se ukázalo, že ne všechny vyizolované kolonie jsou bifidobakterie, které mají v mikroskopu tvar větvených tyčinek do tvaru V a Y a



často agregují. Byly zde viditelné koky různého druhu nebo také zástupci rodu *Clostridium*, který má tvar nevětvených tyčinek.

V další fázi byl proveden fosfoketolázový test a vzorky přeočkovány do bujónu s mucinem. Fosfoketolázový test identifikoval bifidobakterie na základě rodu a bujón s mucinem určil *Bifidobacterium bifidum*. Konečné výsledky byly ověřeny pomocí PCR. V tabulce XXV jsou uvedeny vzorky, které byly identifikovány jako *Bifidobacterium bifidum*.

Tabulka XXV – uvedené izoláty, které byly odebrány ze vzorků stolice a definovány jako *Bifidobacterium bifidum*. Značení izolátů 1/1 - první 1 znamená vzorek stolice, druhá 1 kolikátá kolonie byla odebrána.

izolát	barva kolonie	mucin	fosfoketoláza	PCR
1/1	Bílá	-	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
2/1	Bílá	+	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
2/2	Bílá	+	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
2/3	Bílá	-	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
3/1	Červená	-	+	neidentifikováno
4/1	Červená	-	+	neidentifikováno
5/1	Červená	-	+	neidentifikováno
5/2	Bílá	+	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
5/3	Bílá	+	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
5/4	Bílá	+	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
6/1	Červená	-	+	neidentifikováno
6/2	Růžová	-	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
6/3	Růžová	-	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
6/4	Bílá	+	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

#### 7.4. Identifikace *Bifidobacterium bifidum* – MALDI Biotyper

Byla provedena identifikace rychlou metodou MALDI Biotyper. Stanovení bylo provedeno na Ústavu fyziologie hospodářských zvířat Slovenské akademie věd v Košiciach panem profesorem Kmeť.

U všech vzorků, které jsou v tabulce XXVI uvedeny, byl proveden fosfokatalázový test a ověřen růst na mucinu.

Tabulka XXVI – výsledky identifikace pomocí Maldy Biotyper

	<b>Kmen</b>	<b>Izolace</b>	<b>Růst na mucinu</b>	<b>Identifikace MALDI - TOF</b>
1	4SV1	Dospělí	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
2	4Sv2	Dospělí	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
3	1SVR5	Dospělí	+	<i>Bifidobacterium longum</i>
4	1SVR6	Dospělí	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
5	Babio 5I	Babio	+	<i>Bifidobacterium animalis</i>
6	SYNBIO	SYNBIO	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
7	BCHD	PROBIOTIC CHILDREN DOPHILUS	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
8	PAD	PROBIOTIC ADULT DOPHILUS	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
9	PSB	PROBIOTIC SENIOR BIOTIC	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
10	SWISS	SWISS	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
11	APOLAC	APOLAC	+	<i>Propionibacterium acnes</i>
12	2M1 MACHA	Kojenci	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
13	2M2 MACHA	Kojenci	+	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

## 8. Diskuze

### 8.1. Rozbory funkčních potravin

Aby se zabránilo klamání spotřebitele, je potřeba vyvinout vhodné médium pro stanovení probiotických kultur ve funkčních potravinách, aby se dokázalo, že to co výrobce deklaruje na obalu je pravda. Pro identifikaci druhu *Bifidobacterium bifidum* byl zvolen mucin jako selektivní faktor a jediný zdroj uhlíku v daném médium. *Bifidobacterium bifidum* je totiž jediná bakterie, která ho umí využít ke svému růstu (Crocian, et al., 1994).

Mucin je multifunkční glykoprotein (Svensson, et al., 2010). Jeho strukturu tvoří peptidový řetězec, který se nazývá apomucin, na kterém jsou navázány stovky glykoproteinových řetězců (Jonckheere, et al., 2010). Z 80% jsou tam navázány uhlíkaté látky jako je N-acetylgalaktosaamin, N-acetylglukosaamin, fruktosa, galaktosa, kyselina sialová a obsahuje stopy manosy (Svensson, et al., 2010). Podobné složení mají i oligosacharidy mateřského mléka - obsahují N-acetylglukosamin, D-glukosu, D-galaktosu, L-fukosu a kyselinu sialovou (Rockova, et al., 2011). *Bifidobacterium bifidum* je první bakterie, která kolonizuje lidský trávicí trakt (Turrone, et al., 2011), a proto se dá předpokládat, že když umí využít pro svůj růst OMM, tak dokáže pro svůj růst využít i mucin.

Byly k dispozici 4 vzorky funkčních potravin, které obsahovaly *Bifidobacterium bifidum* (podrobnější informace o vzorkách jsou v tabulce VI).

V první fázi rozboru byly stanoveny celkové počty mikroorganismů a celkové počty bifidobakterií. Bohužel výrobci na obalu nerozlišují jednotlivé druhy bakterií, ale uvádějí pouze celkový počet probiotických kultur a to většinou v 1 tabletě  $10^9$  bakterií. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že se nálezy shodují s výrobcem. Průměrná hodnota celkového počtu mikroorganismů byla zjištěna 9,95 log KTJ v 1 g vzorku, což je téměř  $10^{10}$  bakterií.

Dále byl proveden rozbor na agaru M + M a pokus o izolaci *Bifidobacterium bifidum*. Tento pokus byl již na Katedře Mikrobiologie, výživy a dietetiky prováděn s pozitivními výsledky, takže v tomto směru šlo jen o potvrzení dřívějších měření. Povedlo se vyizolovat *Bifidobacterium bifidum* z 3 zvolených funkčních potravin, pouze z výrobku Adults Dophilus se identifikace nezdařila. Pravděpodobně se jedná o jiný druh z rodu *Bifidobacterium*.

## 8.2. Srovnání různých zdrojů uhlíku pro růst *Bifidobacterium bifidum* - TOS a W + SP

TOS agar patří mezi selektivní agary na stanovení rodu *Bifidobacterium*, je totiž udáváno, že bifidobakterie ke svému růstu dokážou využít trans-galaktosylované oligosacharidy (YAKULT Pharmaceutical Industry CO., 2012). Cílem rozboru bylo ověřit, zda je vhodný pro selektivní stanovení druhu *Bifidobacterium bifidum*. Kompletní složení média je uvedeno v tabulce XV.

Dalším použitým médiem byl W + SP, který se používá pro celkové stanovení bifidobakterií. Kompletní složení agaru je uvedeno v tabulce XI a XII.

Byl proveden rozbor s 28 kmeny, které pocházely z různých zdrojů: sbírka, izoláty z funkčních potravin a izoláty z lidské stolice. Seznamy použitých kmenů jsou uvedeny v tabulkách VII, VIII a IX.

Z výsledků je zřejmé, že většina kmenů *Bifidobacterium bifidum* umí využívat trans-galaktosylované oligosacharidy jako zdroj uhlíku. Pouze dva sbírkové kmeny ho využít neumějí: ATCC 29521, DSM 20456.

Výsledky byly vyhodnoceny statistickou metodou výběrový t-test s rovností rozptylů a výběrovým t-testem s nerovností rozptylu, na základě významnosti  $\alpha = 0,05$ . Ani u jednoho měření nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi vybranými agary.

Na základě uvedených výsledků lze říci, že není vhodné využít TOS agar a celkově všechny agary, které využívají jako zdroj uhlíku trans-galaktosylované oligosacharidy, pro selektivní stanovení *Bifidobacterium bifidum*. Ne všechny kmeny dokázaly tyto oligosacharidy využít a agar W + SP má i větší počet narostlých kolonií (průměrné počty kolonií na TOS agaru  $6,77 \log \text{KTJ} \pm 0,03 \text{ SD}$  a na W + SP agaru  $8,15 \log \text{KTJ} \pm 0,04$ ).

Z toho dále plyne, že TOS agar není ani vhodný použít pro selektivní stanovení bifidobakterií, jelikož jak se ukázalo, ne všechny kmeny dokážou ke svému růstu využít trans-galaktosylované oligosacharidy.

### 8.3. Rozbory stolice

Jelikož je agar M + M vhodný pro stanovení *Bifidobacterium bifidum* ve funkčních potravinách, byla snaha ho vyzkoušet i na identifikaci *Bifidobacterium bifidum* ve stolici. K dispozici bylo 6 vzorků stolice od kojenců různého věku (podrobné informace o vzorcích jsou uvedeny v tabulce XXIII). V první řadě byl proveden rozbor na celkové počty mikroorganismů a celkové počty bifidobakterií.

Z dostupné literatury je známo, že celkový obsah mikroorganismů v 1 g stolice je  $10^9$  –  $10^{11}$  mikroorganismů, což je stejné množství jako v tlustém střevě (Bednář, et al., 1996). Toto se podařilo potvrdit získanými výsledky z rozborů. Celkové počty mikroorganismů se také pohybovaly v rozmezí  $10^9$  –  $10^{11}$  mikroorganismů.

Bifidobakterie jsou první bakterie, které kolonizují lidský trávicí trakt, jelikož umí využít ke svému růstu OMM (Turroni, et al., 2011). Toto potvrzují získané výsledky. Z výše uvedených výsledků plyne, že 4 vzorky z rozborů vzorků stolice obsahovaly více jak 50 % bifidobakterií z celkového počtu mikroorganismů. V porovnání s dostupnou literaturou jsou získané výsledky srovnatelné se studií dle Bezirtzoglou (2011), který udává, že kojenci kojení mateřským mlékem mají v trávicím traktu 60 % bifidobakterií (celkové výsledky jsou uvedeny v tabulce XXIV). Podle studie Biasucci (2010) by se mělo osídlení trávicího traktu rodem *Bifidobacterium* lišit dle způsobu porodu. U přirozeného porodu bylo osídlení bifidobakteriemi ve všech 23 vzorcích, zatím co u císařského řezu pouze u 2 vzorků z 23. Na základě získaných výsledků v této práci se v jednom případě potvrdil menší počet bifidobakterií u kojence porozeným císařským řezem a to pouze 0,63 % bifidobakterií z celkového počtu mikroorganismů.

Úkolem stanovení bylo zjistit, jestli se agra M + M může použít na selektivní stanovení *Bifidobacterium bifidum*. Jelikož tento druh bifidobakterií je podle vědecké literatury jediný z rodu *Bifidobacterií*, který umí využít mucin jako jediný zdroj uhlíku (Crocian, et al., 1994).

První identifikace izolátů byla provedena mikroskopicky. Ne všechny izoláty byly bifidobakterie (mají typický tvar – větvené tyčinky do tvaru Y nebo V a agregují). Poté byl u protříděných vzorků proveden fosfoketolázový test, který určil rod *Bifidobacterium*. Pozitivní vzorky byly přeočkovány do bujónu s mucinem, který pomohl napovědět, zda se jedná o *Bifidobacterium bifidum*. Zda-li v bujónu s mucinem roste pouze *Bifidobacterium bifidum* bylo ověřeno přeočkováním jiných druhů bifidobakterií do penicilínky s mucinem, které po 24

hodinách kultivace při 37 °C nenarostly (*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium breve*). Konečná identifikace byla provedena metodou PCR.

Z výše uvedeného plyne, že z každého z 6 vzorků bylo odebráno 9 kolonií, tudíž celkově bylo odebráno 54 izolátů. Pouze 10 jich bylo identifikováno jako *Bifidobacterium bifidum* (výsledky jsou uvedeny v tabulce XXV). Ve výsledcích jsou uvedeny pouze izoláty, u kterých byla provedena další identifikace a nejen mikroskopické pozorování. Bohužel ze vzorků 3 a 4 se *Bifidobacterium bifidum* nepodařilo vyzisolovat.

Z uvedených údajů plyne, že výběr mucinu jako selektivního faktoru pro stanovení *Bifidobacterium bifidum* není vhodný při pokusech selektivního stanovování tohoto druhu ze stolice a pravděpodobně ani u jiných vzorků obsahující různorodé zastoupení mikroflóry. Agar s mucinem lze však použít k izolaci *B. bifidum* ze stolice.

Byla také vyzkoušena identifikace pomocí metody MALDI Biotyper, kterou provedl profesor Kmeť na Ústavu fyziologie hospodářských zvířat Slovenskej akademie vied v Košiciach. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce XXVI. U všech jmenovaných vzorků byl proveden fosfoketolázový test, vyzkoušen růst na mucinu a následně byly vzorky poslány k identifikaci metodou MALDI Biotyper.

## 9. Závěr

- Agar M + M je vhodné selektivní médium pro stanovení *Bifidobacterium bifidum* ve funkčních potravinách.
- Dle získaných výsledků TOS agar nelze zvolit jako selektivní médium pro stanovení rodu *Bifidobacterium bifidum*. Ale ani není vhodný pro selektivní stanovení bifidobakterií, když ne všechny kmeny, dokážou využít ke svému růstu transgalaktosylované oligosacharidy.
- Dle uvedených výsledků Agar M + M sice není vhodný pro stanovení druhu *Bifidobacterium bifidum* ze stolice kojenců, ale lze jej použít pro izolaci *Bifidobacterium bifidum*.

## 10. Citovaná literatura

**Albesharat, R., Ehrmann, M. A., Korakli, M., Yazaji, S., Vogel, R. F. 2001.** Phenotypic and genotypic analysis of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*. 34, pp. 148–155.

**Andrianifahanana, M., Moniaux, N. and Batra, S. K. 2006.** Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1765, pp. 189–222.

**Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J. 1996.** *Lékařská mikrobiologie*. Praha : Marvil, p. 558. ISBN: 80-238-0297-6.

**Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., Fito, P. 2011.** Functional food development: Trends and technologies. *Trends in Food Science et Technology*. pp. 1-11.

**Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., Welling, G. W. 2011.** Microbiota profile in feces of breast – and formula – fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaeroba* 2011, pp. 1–5.

**Biasucci, G., Rubini, M., Robini, S., Morelli, L., Bessi, E., Retetangos, C. 2010.** Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development*. 86, pp. 13 - 15.

**Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000.** Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 50, pp. 117 – 131.

**Biomerieux. 2012.** <http://www.biomerieux.com>. *Biomerieux corporation*. [Online] 2012. [Cited: 24. března 2012.]

**Bruker. 2012.** <http://www.bruker-sro.cz/maldi-biotyper>. *Bruker Corporation*. [Online] 2012. [Cited: 24. března 2012.]

**Crocian, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., Biavati, B. 1994.** Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 24, pp. 199 – 210.

**Čurda, L., Holubová, J., Rudolfová, J., Němečková, I. 2012.** Institut Danone. *Stabilita galaktooligosaharidů ve fermentovaných mléčných výrobcích a jejich vliv na probatické kultury. Odborná studie pro Institut Danone*. [Online] 03 19, 2012. <http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-04.pdf>.



- Davison, B. H. 2012.** Biotechnology for fuels and chemicals: the twenty-sixth symposium. *Google books*. [Online] 2012. [Cited: březem 24, 2012.]  
[http://books.google.cz/books?id=Oxl1-MMYM2kC&pg=PA337&lpg=PA337&dq=API+50+test&source=bl&ots=HapcOvbmKt&sig=6pT-jwsh3JK\\_hdsuKjZED\\_-ryrU&hl=cs&sa=X&ei=5v9ZT6\\_EPMOLswaLpqCNDA&ved=0CEcQ6AEwBTgU#v=onepage&q=API%2050%20test&f=false](http://books.google.cz/books?id=Oxl1-MMYM2kC&pg=PA337&lpg=PA337&dq=API+50+test&source=bl&ots=HapcOvbmKt&sig=6pT-jwsh3JK_hdsuKjZED_-ryrU&hl=cs&sa=X&ei=5v9ZT6_EPMOLswaLpqCNDA&ved=0CEcQ6AEwBTgU#v=onepage&q=API%2050%20test&f=false).
- Downes, J., King, A., Hardie, J., Phillips, I. 1999.** Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic Gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 6, 5, pp. 319–326.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Dicks, L. M. T. 2010.** Diversity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in feces of herbivores, omnivores and carnivores. *Anaerobe*. 16, pp. 590 – 596.
- FAO/WHO. 2002.** *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. s.l. : Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002.
- Germond, J. E., Mamin, O. , Mollet, B. 2002.** Species specific identification of nine human *Bifidobacterium* spp. in reces. *Syst Appl Microbiol*. 25, pp. 536–543.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1994.** Dietary Modulation of Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125, pp. 1401-1412.
- Greenwood, D., Slack, R. C. B. 1999.** *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha : GRADA Publishing, p. 686. ISBN: 80-7169-365-0.
- Heinrichs, A. J., Jones, C. M., Elizondo-Salazar, J. A., Terrill, S. J. 2009.** Effect of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. *Livestock Science*.
- Jonckheere, N., Van Seuningem, I. 2010.** The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*. 92, pp. 1 - 11.
- Kalač, P. 2003.** *Funkční potraviny*. DONA s.r.o., str. 130. ISBN: 80-7322-029-6.
- Kwon, H. S., Yang, E. H., Lee, S. H., Yeon, S. W., Kang, B. H., Kim, T. Y. 2005.** Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species – specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA, FEMS. *Microbiol Lett*. 250, pp. 55–62.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. 2001.** Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 11, pp. 1–17.

- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., Oyaizu, H. 1999.** Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA – gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol.* 65, pp. 4506 – 4512.
- Maxa, V., Rada, V. 1996.** *Význam Bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví.* Praha : Ústav zemědělských a potravinářských informací, p. 42. ISBN: 80-85120-57-7.
- Mehtar, S. 1998.** New strategies for the use of mupirocin for the prevention of sepsis infection. *Journal of Hospital Infection.* 40, pp. 39-44.
- Miranda, R. O., Neto, G., G., de Freitas, R., de Carvalho, A., F., Nero, L. A. 2011.** Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm™ AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology.* 28, pp. 1509 - 1513.
- Ojetti, V., Gigante, G., Ainora, M. V., Fiore, F., Barbaro, F., Gasbarrini, A. 2009.** Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. *Digestive and Liver Disease Supplements.* 3, pp. 35-39.
- Quigley, E. M. M. 2010.** Prebiotics and probiotics, modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research.*
- Racek, J., Eiselt, J., Friedecký, B., Holeček, V., Nekulová, M., Rušavý, Z., Senft, V., Šavlová, M., Těšínský, P., Verner, M. 2006.** *Klinická biochemie.* Praha : Galén, 2006. p. 329. ISBN 80-7262-324-9.
- Rada, V. and Petr, J. 2000.** A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods.* 43, pp. 127–132.
- Rapotín. 2008.** *Výrobní zemědělská praxe a potravinářské biotechnologické úprava pro zvýraznění pozitivních zdravotních vlivů mléka a mléčných výrobků.* Rapotín : Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., 2008. str. 91. ISBN: 978-80-87144-03-9.
- Resnick, I. G. and Levin, M. A. 1981.** Quantitative Procedure for Enumeration of Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol.* pp. 427-432.
- Reyed, M. 2007.** The Role of Bifidobacteria in Health. *Journal of Medicine and Medical Sciences.* 2 (1), pp. 14–24.
- Roberfroid, M. 2007.** Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition.* 137, pp. 830–837.
- Rockova, S., Nevoral, J., Rada, V., Marsik, P., Sklenar, J., Hinkova, A., Vlkova, E., M., Marounek 2011.** Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. *International Dairy Journal.* 21, pp. 504–508.

- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., C., Stanton 2011.** Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 149, pp. 88–105.
- Rybka, S., Kailasapathy, K. 1996.** Media for the enumeration of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*. 8-9, Vol. 6, pp. 839-850.
- Sedláček, I. 2007.** *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita, 2007. str. 207. ISBN 80-210-4207-9.
- Schrezenmeir, J., M., de Vrese. 2001.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *American Society for Clinical Nutrition*. 2001, 73, pp. 361 - 364.
- Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2004.** *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, 54, pp. 401–406.
- Svensson, O., Arnebrant, T. 2010.** Mucin layers and multilayers - \physicochemical properties and applications. *Cuurrent Opinion in Colloid a Interface Science*. 15, pp. 395 - 405.
- Šilhánková, L. 2008.** *Mikrobiologie pro potravináře*. Praha : Academia, 2008. str. 363. ISBN 976-80-200-1703-1.
- Thitaram, S. N., Siragusa, G. R., Hinton Jr, A. 2005.** Bifidobacterium-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. *Letters in Applied Microbiology*. 41, pp. 355 - 360.
- Turróni, F., van Sinderen, D., M., Ventura. 2011.** Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology*. 149, pp. 37–44.
- Udo, E. E. PhD, Farook, V. S. PhD, Mokades, E. M. MB, BCH, Jacob, L. E. MSc, Sanyal, S. C. PhD, MB, BS 1999.** Molecular Fingerprinting of Mupirocin-Resistant Methilicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Burn Unit. *Int J Infect*. 3, pp. 82 - 87.
- Velíšek, J., Hajšlová, J. 2009.** *Chemie potravin I*. Tábor : Osis, 2009. p. 580. ISBN 978-80-86659-15-2.
- Ventura, M., van Sinderen, D., Fitzgerald, G., F., Zink, R. 2004.** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. 86, pp. 205 - 223.
- VSČT. 2012.** <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/bifi-b.htm>. *Bifidobacterium bifidum*. [Online] VSČT, 2012. [Citace: 24. březem 2012.]

**YAKULT Pharmaceutical Industry CO., LTD. 2012.** <http://www.yakult.co.jp/yipi/en/tos.html>. *TOS Propionate agar medium*. [Online] YAKULT Pharmaceutical Industry CO., LTD, 2012. [Cited: duben 3, 2012.]

**Youn, S. Y., Seo, J. M., Ji, G. E. 2008.** Evaluation of the PCR method for identification of *Bifidobacterium species*. *Letters in Applied Microbiology*. 46, pp. 7–13.

**Zdorovenko, E. L., Kachala, V. V., Sidarenka, A. V., Izhik, A. V., Kisileva, E. P., Shashkov, A. S., Novik, G. I., Knirel, Y. A. 2009.** Structure of cell wall polysaccharide of probiotic bifidobacteria *Bifidobacterium bifidum* BIM B-465. *Carbohydrate Research*. 344, pp. 2417 – 2420.

## 11. Použité zkratky a symboly

Agar M + M – mupirocin, mucin

ATCC – American Type Culture Collection

B – Bifidobacterium

Bif. – bifidobakterie

BMK – bakterie mléčného kvašení

CP – celkové počty

CTAB - citridium bromid

DPA – dokosapentaenová

DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismem

E – Enterococcus

EPA – eikosapentaenová kyselina

GIT – Gastrointestinální trakt

Hod. – hodina

KTJ – kolonie tvořící jednotky (CFU – colony forming unit)

L – Lactobacillus

OMM – oligosacharidy mateřského mléka

rRNA – ribosomová RNA

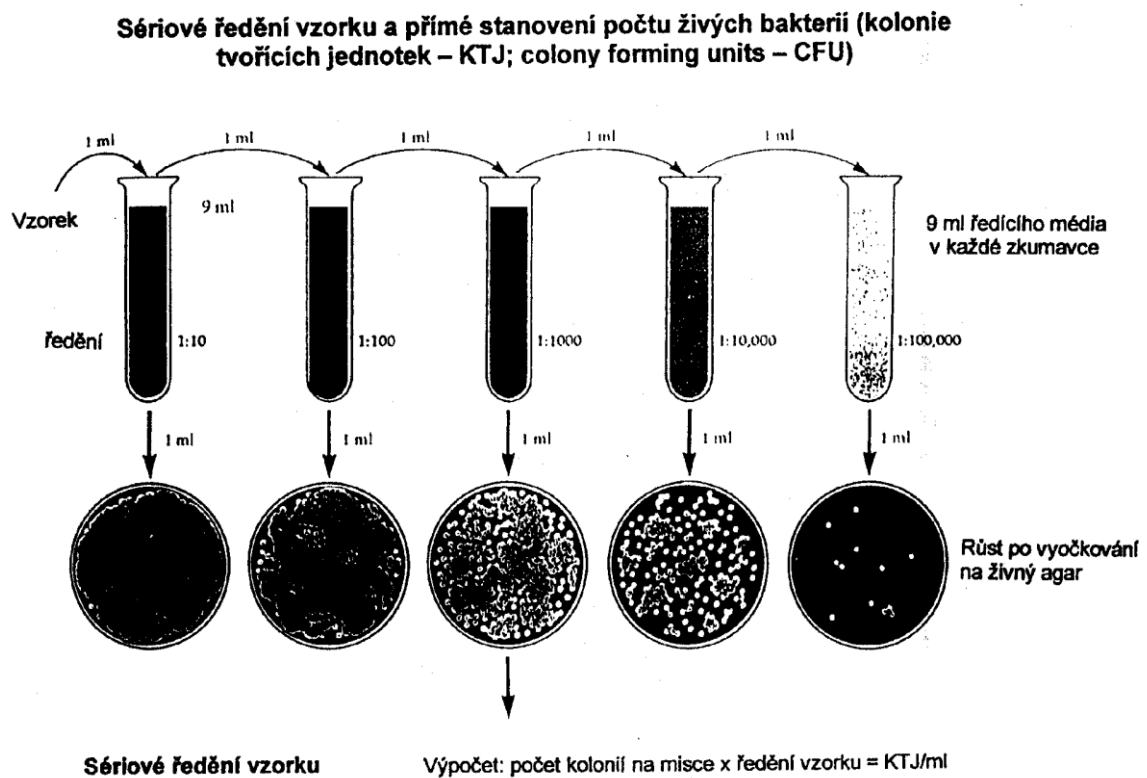
S – Streptococcus

TOS – trans-galaktosylované oligosacharidy

TTC – trifenyltetrazonium chlorid

## 12. Přílohy

### 12.1. Příloha č. 1 - Příprava ředící řady



### 12.2. Příloha č. 2 - Obrázek penicilínky s bujónem s mucinem



Penicilínka s fialovým obsahem je bujón s mucinem před naočkováním a se žlutým obsahem je po naočkování druhu *Bifidobacterium bifidum* a kultivaci po 24 hodinách při 37 °C.

### 12.3. Příloha č. 3 - Ilustrace použitých funkčních potravin



Obrázek 6 APO - Baby Probio



Obrázek 7 Biopron Junior

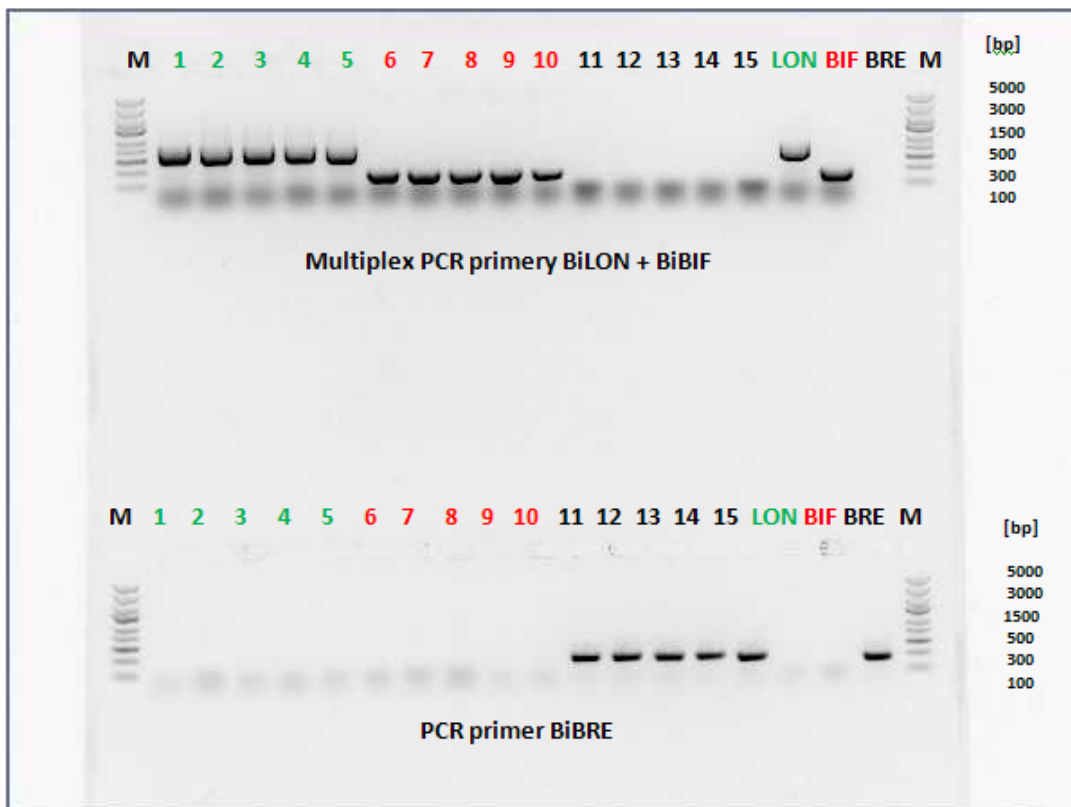


Obrázek 8 Infant acidophilus



Obrázek 9 Adults Dophilus

#### 12.4. Příloha č. 4 – Obrázek použití metody PCR



Na obrázku je vidět pozitivní výsledek PCR pro *Bifidobacterium bifidum*. Bylo použito více primerů v multiplexu a na první pohled byla vidět různá velikost produktů PCR.