

Organic Compounds), což jsou parametry tepelných zdrojů pro tyto sušárny. Dochází totiž k nejednotnému vykazování emisí ze spalin, někdy k tepelným zdrojům, někdy k sušárnám, což je pak neporovnatelné. Rozhodnutí obsahovala také předepsané limity emisí CO, NO_x, SO₂ u žádostí bez naměřených hodnot emisí (vždy jedinkrát) a v případě TOC u dvou zařízení. Hodnoty spotřeby vody a energie v zařízeních mlékárenského průmyslu, uvedené v žádostech o integrované povolení, jsou uvedeny v tab. 1 a tab. 2.

Obecně je třeba konstatovat, že v legislativních dokumentech (Směrnice Rady 96/61/ES, Zákon č. 76/2002 Sb., a Vyhláška č. 554/2002 Sb.) není nikde stanovena metodika sledování spotřeby vody. Existuje pouze požadavek vyplnit v rámci žádosti kapitolu "Pitná voda", kde je vyjádřena spotřeba vody na jednotku produkce s možností volného výkladu pro každého žadatele o Integrované povolení, včetně požadavku specifikovat "zdroj pitné vody". Požadované údaje jsou uváděny jako "průměrné hodnoty - l.s⁻¹", "maximální příkon m³.s⁻¹", "příkon vyjádřený m³.rok⁻¹" a nejdůležitější údaj charakterizující zařízení - "spotřeba na jednotku produkce".

Výsledkem analýzy spotřeby vody v mlékárenském průmyslu je přehled spotřeb vody, většinou brány za celé zařízení. Vykazovaná spotřeba vody na jednotku produkce se vesměs pohybuje v množství jednotek litrů na jednotku produkce, aniž by jednotka produkce byla jednotně definována. Ve dvou případech se objevuje spotřeba stonásobně vyšší, v jednom dokonce tisícinásobně vyšší, což vede k podezření, že jde o technický omyl. Je směšována technologická spotřeba se sanitací, sociálními potřebami vody, použitím vody v chladicích okruzích a podobně. Je třeba v další práci se zaměřit na to, zda v mlékárenském oboru se vůbec uplatňuje voda, která se stává součástí výrobku, nikoliv voda používaná pro sanitační a další účely. Pro porovnání na úrovni BAT se jeví jako nejdůležitější vykazování spotřeby vody na jednotku zpracovaného mléka. To jsou totiž data navzájem porovnatelná a mají vztah k prevenci znečišťování životního prostředí nebo čerpání přírodních zdrojů.

Podobně je tomu se spotřebou energie, uváděnou formou spotřeby elektřiny a tepla, a to na jednotku výroby a jako roční spotřeba (tab. 2). I zde se vykazuje spotřeba na různé zvolené základy: na přijaté mléko, mléčné výrobky, sušárenský provoz, výrobu sýrů a tvarohů, máslo aj. Hodnoty se pohybují (při vyjádření údajů na jednotku výroby) od setin kWh po stovky, v jednom případě dokonce řádově v tisících kWh. Mnohem menší rozdíly jsou u vykazování tepla, v hodnotách GJ/jednotku produkce; hodnoty se pohybují mezi desetínami GJ/jedn. (s minimem 0,006 GJ/výrobek) do desítek GJ/výrobek. Pro účely stanovení hodnot pro BAT technologie bude nutné sjednotit způsob vykazování, aby byly k dispozici srovnatelné hodnoty.

Závěr

Emise byly v drtivé většině tvořeny tuhými znečišťujícími látkami, vzhledem ke zpracovávané surovině se jedná o úlet sušeného mléka, tedy biologicky snadno degradovatelný

materiál. Charakteristickým jevem u naměřených hodnot emisí je jejich relativně vysoký rozptyl, který činil 4 - 8 řádů, v závislosti na použitém měřítku (rozměru). Spotřeba vody, většinou vyjádřená na celé zařízení, se pohybuje v řádu jednotek na jednotku produkce, aniž by ale jednotka produkce byla jednotně specifikována. Podobně je tomu u spotřeby energií (elektřina, teplo).

Příspěvek vznikl na základě podpory projektu MŠMT č. 2B08017 "Stanovení vybraných BAT/BREF pro oblast potravinářských zařízení"

Přijato do tisku 15. 9. 2010

Lektorováno 4. 10. 2010

IZOLACE A IDENTIFIKACE POTENCIÁLNÍCH PROBIOTICKÝCH KMENŮ Z BIOPTICKÝCH VZORKŮ A VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE PRO MĚŘENÍ NĚKTERÝCH PROBIOTICKÝCH VLASTNOSTÍ

Dráb, V.¹, Kunová, G.², Nevoral, J.³, Bronský, J.³

¹ - MILCOM a.s., Praha

² - Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

³ - Pediatrická klinika FN Motol-Praha

Isolation and identification of bacteria from biopsy samples as potential probiotics strains and use of flow cytometry to measure some probiotic properties

Abstrakt

Na pracovišti Pediatrické kliniky Fakultní nemocnice v Praze - Motole byl zajištěn odběr vzorků sliznice tlustého střeva od dětských pacientů v širokém spektru gastroenterologických diagnóz (nespecifické střevní záněty, chronické průjmky, krvácení do trávicího traktu, polypy apod.). Vzorky byly podrobeny mikrobiologickému vyšetření, kde cílem bylo vyizolovat a dále pak charakterizovat, identifikovat a otestovat některé vlastnosti těchto kmenů za účelem získání nových, potenciálně probiotických kmenů. Pro screening probiotických vlastností bakterií byly porovnávané výsledky získané průtokovou cytometrií s klasickou plotnovou metodou při stanovení míry odolnosti různých kmenů bakterií (kmeny laktobacilů a bifidobakterií ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora) vůči solím žlučových kyselin a vůči působení nízkého pH. Odebráno bylo 56 vzorků od 27 pacientů

a získaných bylo celkem 890 izolátů, ze kterých bylo 690 klasifikovaných do rodů *Bifidobacterium* (413), *Lactobacillus* (217), *Streptococcus* (56) a *Pseudomonas* (4). Dvě stě izolátů, většinou gram pozitivních koků zůstává zatím neklasifikovaných. Různé bakteriální kmeny byly různě odolné vůči působení nízkého pH. Výsledky počtu živých buněk získané průtokovou cytometrií po působení nízkého pH (3), byly vyšší, než hodnoty získané plotnovou metodou. Mezi počtem životaschopných buněk stanoveným po kultivaci v bujónu s obsahem žlučových solí (0,3, 0,7 a 1%) klasickou plotnovou metodou a průtokovou cytometrií existovala výrazná korelace.

Abstract

For the purpose of isolation and characterization of new potentially probiotic bacteria of human origin, samples of colon mucosa from the pediatric clinic of the Faculty Hospital in Prague - Motol were obtained. Samples come from pediatric patients from a wide range of gastroenterological diagnosis (non-specific inflammatory bowel disease, chronic diarrhea, polyps, etc.). Samples were subjected to microbiological analysis which focused on isolation and then characterization, identification and test of some probiotic properties of these strains. So far 56 samples from 27 patients were collected and 890 strains were isolated. Using PCR methods, 690 isolates were classified into 4 genera: 413 to the genus *Bifidobacterium*, 217 to the genus *Lactobacillus*, 56 to the genus *Streptococcus* and 4 to the genus *Pseudomonas*. Two hundreds isolates is still remaining unclassified, mostly gram positive cocci. Within screening of probiotic properties, the isolates from biopsy samples are characterized in terms of resistance to low pH using a classical plate count method and flow cytometry (FC). Regarding the comparison of plate count method and FC to determine the number of cells after cultivation at low pH (3), the numbers obtained by FC were higher. There was a significant correlation between the number of viable cells cultivated in broth containing bile salts (0.3, 0.7 and 1%) using plate count method and FC.

Úvod

Probiotika jsou charakterizována jako živé mikrobiální kultury, které po aplikaci v zažívacím traktu příznivě působí na zdravotní stav hostitele (Fuller, 1989). Z praktického hlediska je velmi významné, že nové kmeny mikroorganismů s žádoucími probiotickými vlastnostmi mohou být do lidského střeva dodávány potravou, potravinovými doplňky nebo terapeutickými preparáty. V literatuře bylo popsáno dvanáct důležitých kritérií pro výběr potenciálně probiotických kmenů (Collins a spol., 1998). Tato kritéria lze shrnout do následujících bodů: kmen musí být bezpečný, životaschopný a metabolicky aktivní v gastrointestinálním traktu. Proto se při hledání potenciálních probiotických kmenů pozornost zaměřuje i na schopnost kmenů přežít průchod žaludkem a tenkým střevem, odol-

nost vůči solím žlučových kyselin, schopnost kolonizovat gastrointestinální trakt adhezí a růstem na sliznicích, produkovat antimikrobiální látky. Výběr je založen na *in vitro* prováděných testech simulujících podmínky v gastrointestinálním traktu (Fang He a spol., 2001, Ouwehand a spol., 2002, Zhong a spol., 2004). Průtoková cytometrie je jednou z použitelných rychlých metod umožňujících stanovit míru poškození buněk účinkem různých vnějších faktorů, jako jsou působení vysokého tlaku (Ananta a spol., 2004), žlučových solí (Amor a spol., 2002), antibiotik (Dolganic a spol., 2001) nebo bakteriocinů (Budde a Rasch, 2001).

Cílem práce bylo získat soubor izolátů lidského původu pro následné testování a odzkoušet možnosti aplikace průtokové cytometrie pro stanovení míry poškození buněk účinkem různých typů stresu (soli žlučových kyselin, nízké pH) na základě stanovení změn v poměru mezi živými a mrtvými buňkami.

Materiál a metody

Odběr bioptických vzorků

Do studie byly zařazeni pouze pacienti splňující indikace k provedení endoskopického vyšetření za účelem upřesnění diagnózy, kteří dali souhlas s provedením výkonu. Vzorky byly odebírány z náhodných částí tlustého střeva bez ohledu na rozsah endoskopického nálezu během rutinního kolonoskopického vyšetření prováděného u pacientů z důvodu diagnostiky nebo léčby pro jejich základní onemocnění. Získané vzorky byly ihned po odběru vloženy do transportního média, skladovány za anaerobních podmínek v chladu při zpracování do 24 hodin nebo při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ při delším intervalu mezi odběrem a analýzou vzorků. Transportní médium bylo voleno tak, aby umožňovalo přežití širokého spektra bakterií mléčného kvašení a aktinobakterií včetně striktních anaerobů. Vzorky tkání byly za sterilních podmínek rozdrčeny sterilními tloučky (sterile tissue grinder, Merck) a homogenizovány.

Mikrobiologické stanovení jednotlivých skupin mikroorganismů.

Pro izolaci jednotlivých mikrobiálních skupin byla používána příslušná selektivní média za využití zkušeností získaných během řešení projektů EP 6038 (Dráb a spol., 1996-2000), QE 1382 (Dráb a spol., 2001-2004) a QF 3169 (Španová a spol., 2003-2007) a z příslušné odborné literatury.

- 1) celkové počty *Enterobacteriaceae* stanovené na EMB agaru (HiMedia), kultivace $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 hodin, aerobně
- 2) celkový počet anaerobních bakterií stanovený na Wilkins Chalgreen Anaerobic agaru, (HiMedia) + cys-tein (0,05 %) kultivace $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, anaerobně

Koky (především rod *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*)

- 3) **(M17)** M17 agar (MILCOM), kultivace $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 72 h nebo $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 hodin, aerobně
- 4) **(SB)** Slanetz Bartley (Merck), kultivace $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, aerobně

- Tyčinky** (především rod *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*)
- 5) **(ARC)** RCM agar (Oxoid) + 0,3 g/l aniline blue, pH před sterilací upraveno na pH 7,10 + mupirocin (výsledná koncentrace 100 mg/l), kultivace 37 °C, 3 dny, anaerobně
 - 6) **(57-V)** MRS agar (MILCOM) + vankomycin (50 mg/l) kultivace 37 °C, 3 dny, anaerobně
 - 7) **(RCA55-C)** RCM agar (Oxoid) pH před sterilací upraveno HCl na pH 5,50 + clindamycin (1 mg/l) kultivace 42 °C, 3 dny, anaerobně
 - 8) **(HHD-V)** Lactic Bacteria Differential broth (HiMedia) + 0,1 % Tween 80 + 1,2 % agar + vankomycin (50 mg/l) kultivace 37 °C, 3 dny, anaerobně
 - 9) **(HHD-L3)** Lactic Bacteria Differential broth (HiMedia) + 0,1 % Tween 80 + 1,2 % agar + levofloxacin (20 mg/l) kultivace 37 °C, 3 dny, anaerobně

Rovněž se očkovovalo do tekutých živných půd (P1-P5) za účelem selektivního pomnožení cílových skupin bakterií mléčného kvašení:

- (P1)** Lactic Bacteria Differential broth (HiMedia) + 0,1 % Tween 80 + clindamycin (výsledná koncentrace 1 mg/l) kultivace 37 °C 24-48 hodin
 - (P2)** MRS57 bujón (Merck) + vankomycin (50 mg/l) kultivace 37 °C 24-48 hodin
 - (P3)** M17 bujón (Merck), kultivace 37 °C 24-48 hodin
 - (P4)** RCM bujón (Merck) + mupirocin (100 mg/l), kultivace 37 °C 24-48 hodin
 - (P5)** MRS57 bujón (Merck), kultivace 37 °C 24-48 hodin
- Růst kvasinek a plísní byl potlačen přidávkem pimarinu (9 mg/l), růst gramnegativních mikroorganismů přidávkem kyseliny nalidixové (40 mg/l), redox potenciál byl v případě potřeby snížen přidávkem L-cystein hydrochloridu na výslednou koncentraci 0,05 % (m/v). Po pomnožení vzorků následovalo klasické desítkové ředění na příslušná živná média. Po přečištění izolátů přes příslušná neselektivní média a odpíchnutí typických kolonií z odečitatelných ředění bylo provedeno barvení podle Grama a zjištěna morfologie buněk (tyčinky, koky).

Identifikace izolovaných kmenů pomocí rodově (druhově) specifické PCR.

Při zavádění PCR metod jsme vycházeli z publikovaných metod. Rodově specifická PCR pro *Bifidobacterium* (Roy a Sirois, 2000), pro *Carnobacterium* (Macián a kol., 2004), pro *Enterococcus* (Deasy a kol., 2000), pro *Lactobacillus* (Dubernet a kol., 2002), pro *Lactococcus* (Deasy a kol., 2000), pro *Leuconostoc* (Jang a kol., 2003), pro *Streptococcus* (Picard a kol., 2004), pro *Pseudomonas* (Pesaro a Widmer., 2006), pro *Pediococcus* (Pfannebecker a Frohlich, 2008), pro *Propionibacterium* (Rossi a kol., 1999) a druhově specifická PCR pro *Streptococcus thermophilus* (Lick a spol., 2001). Metody byly optimalizovány na naše podmínky především úpravou koncentrací primerů, dNTP, hořčíku a polymerasy, případně změnou teploty a času nasedání primerů a volbou různých polymeras či enhancerů PCR (betain, BSA, DMSO, Tween 20). Zavedené PCR metody byly následně rovněž odzkoušeny s různě naředěnou DNA matricí získanou z hrubého lyzátu buněk.

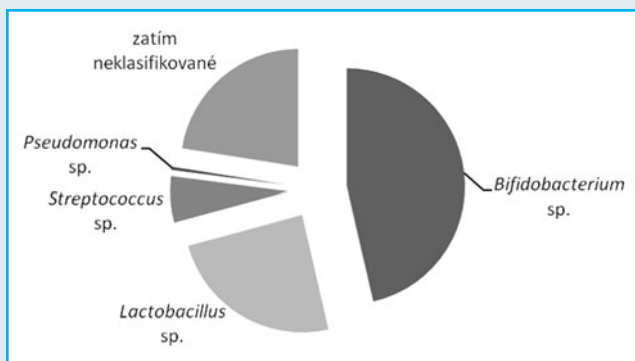
K amplifikaci PCR směsi byl použit programovatelný cyklátor Biometra TProfessional Cycler (Biometra, Göttingen, Německo). Separace amplikonů byla prováděna pomocí gelové elektroforézy na agarose s použitím zařízení pro elektroforézu Scie - Plas, model HU 10W (Scie - Plas Inc., Warwickshire, UK) a zdroje elektrického napětí pro elektroforézu Biometra PS 305T (Biometra, Göttingen, Německo) nebo PowerPac 3000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Amplikony byly rozděleny pomocí gelové elektroforézy na 1,5 % gelu (90V/90 minut) a vizualizovány obarvením ethidium bromidem (0,5 g/ml) a následnou UV-transiluminací pomocí dokumentačního zařízení Gene Genius 12 (Syngene, Cambridge, Velká Británie). Výsledky byly uloženy v TIFF formátu a zpracovány pomocí Zoner Photo Studio 10 (ZONER software, Brno, ČR). Ke zpracovávaným vzorkům byla vždy přiřazena negativní kontrola (vzorek bez DNA) z důvodu kontroly kontaminace jednotlivých komponent pro PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita purifikovaná DNA příslušného typového kmene.

Aplikace průtokové cytometrie pro měření odolnosti bakterií mléčného kvašení vůči solím žlučových kyselin a vůči nízkému pH.

Pro testování byly použity kmeny laktobacilů a bifidobakterií ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM), přičemž pro testování odolnosti vůči nízkému pH byla použita i část získaného souboru (kmeny laktobacilů a bifidobakterií). Při testování odolnosti vůči solím žlučových kyselin bylo nejprve 9 ml narostlé kultury odstředěno při 4000 g po dobu 10 minut a buňky byly dvakrát promyty fyziologickým roztokem (8,5 g NaCl / l). Objem suspenze byl následně upraven na objem 1 ml pomocí fyziologického roztoku. Při testování odolnosti vůči nízkému pH bylo 9 ml narostlé kultury odstředěno při 4000 g po dobu 10 minut a buňky byly zalaty stejným objemem MRS bujónu o pH 3 (úprava pH pomocí HCl). Po rozmíchání byly stanoveny počty po naředění v PBS7P (čas 0) a po 3 hodinách kultivace při 37 °C plotnovou metodou a FC. Stanovení počtů buněk metodou průtokové cytometrie bylo prováděno z 3 až 5 desítkového ředění ve fyziologickém roztoku. Stanovení počtu plotnovou metodou bylo prováděno na MRS agaru po anaerobní kultivaci 72 hodin při 37 °C. L-cystein hydrochlorid byl přidáván k MRS agaru na výslednou koncentraci 0,05 % (m/v). Anaerobní atmosféra byla vytvořena pomocí sáčků Anaerogen (Oxoid, Basingstoke, VB).

Příprava vzorků pro stanovení odolnosti vůči solím žlučových kyselin.

Bujóny s různou koncentrací žlučových solí byly připraveny z MRS bujónu (Merck) a solí žlučových kyselin (L55, Oxoid). Ve všech bujónech bylo upraveno pH na hodnotu 6,5 a bujóny byly sterilovány mikrofiltrací (0,22 µm). Sto mikrolitrů suspenze promytých buněk bylo přidáno k 9 ml MRS bujónu pH 6,5 s koncentrací žlučových solí 0, 0,3, 0,7 a 1,0 %. Po rozmíchání byly odebrány vzorky

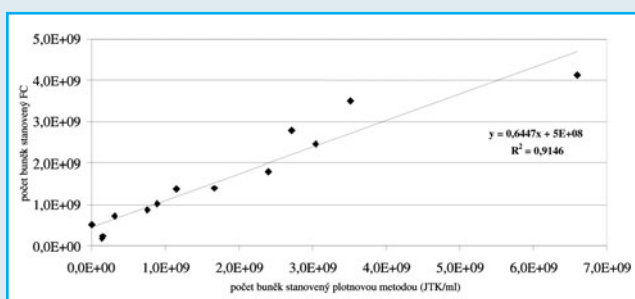


Obr. 1 Klasifikace izolátů za pomoci PCR:

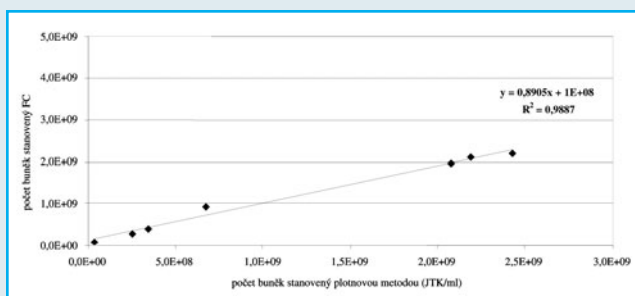
pro stanovení výchozí koncentrace buněk plotnovou metodou a průtokovou cytometrií. Po odebrání vzorku byly bujóny kultivovány 3 hodiny při 37 °C. Poté byl opět stanoven počet buněk pomocí plotnové metody a průtokové cytometrie. Stanovení počtů buněk metodou průtokové cytometrie bylo prováděno z 3 až 5 desítkového ředění ve fyziologickém roztoku. Stanovení počtu plotnovou metodou bylo prováděno na MRS agaru po anaerobní kultivaci 72 hodin při 37 °C.

Příprava vzorků před počítáním pomocí průtokové cytometrie.

Jednotlivé vzorky byly naředěny na koncentraci přibližně 10^5 - 10^6 cfu/ml fyziologickým roztokem a barveny pomocí LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability kit (L7012, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA). Před měřením bylo smícháno potřebné množství fluorescenčních barviv SYTO 9 a PI v poměru 1 díl SYTO 9 : 4 díly ředící roztok: 5 dílů PI. Pro barvení vzorků byly použity 3 μ l směsi na 1000 μ l



Obr. 2 Korelace mezi stanovením odolnosti vůči 0,3 % solí žlučových kyselin pomocí plotnové metody a průtokové cytometrie



Obr. 3 Korelace mezi stanovením odolnosti vůči 0,7 % solí žlučových kyselin pomocí plotnové metody a průtokové cytometrie

vzorku a po inkubaci ve tmě při pokojové teplotě po dobu minimálně 30 minut byla odečtena fluorescence na průtokovém cytometru.

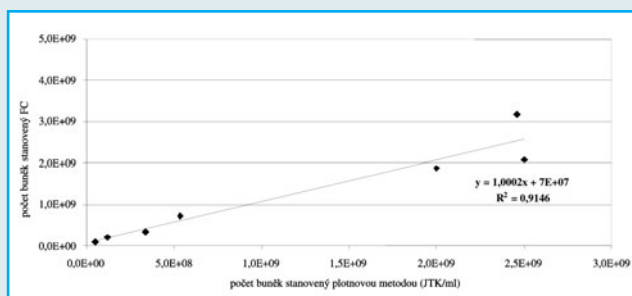
Stanovení počtů metodou průtokové cytometrie.

Analýza byla prováděna na průtokovém cytometru CyFlow Space (Partec GmbH, Münster, Německo) vybaveném dvěma lasery (blue solid-state laser - 20 mW 488 nm a red diode laser - 25 mW 638 nm). Průtok byl nastaven na méně než 500 částic za vteřinu. Data byla analyzována pomocí software FloMax v. 2.4 f (Partec GmbH, Münster, Německo).

Výsledky a diskuze

Během roku 2008 a 2009 bylo odebráno celkem 56 vzorků od 27 pacientů (13 dívek a 14 chlapců). Průměrný věk pacientů byl 10,3 let v rozmezí od několika měsíců věku do 18 let. Získaných bylo celkem 890 izolátů, ze kterých bylo 690 klasifikovaných za pomoci PCR metod do 4 rodů: 413 izolátů *Bifidobacterium*, 217 *Lactobacillus*, 56 *Streptococcus* a 4 *Pseudomonas*. 200 izolátů, většinou gram pozitivních koků zůstává zatím neklasifikovaných. Žádný z testovaných kmenů nebyl zařazen k rodům *Enterococcus*, *Pediococcus* nebo *Weissella*. 563 z celkového počtu 890 kmenů bylo izolováno z přímého očkování na půdy (141 izolátů z ARC+M agaru, 129 izolátů z MRS agaru, 99 ze Slanetz-Bartley, 116 z M17 agaru, 40 z HHD+V agaru, 23 z HHD+L agaru a 15 izolátů z RCA+C agaru), dalších 327 kmenů bylo získaných po pomnožení v bujóněch a následné kultivaci na živných půdách. Všechny izolované kmeny mají své identifikační číslo (označení), je zdokumentován jejich původ a jsou uchovávány trojmo, při teplotě - 44 nebo -70 °C.

Jak je patrné z obr. 5 a 6, různé bakteriální kmeny byly různě odolné vůči působení nízkého pH. Zatímco v případě *Lbc. salivarius* CCDM 216 byla prakticky celá populace mrtvá po 3 h působení pH 3, v případě *Lbc. paracasei* CCDM 211 došlo k přesunu části populace do stavu živých nekultivovatelných buněk. Výsledky počtu živých buněk získané průtokovou cytometrií po 3 h kultivace při pH 3 a 37 °C byly vyšší, než hodnoty získané plotnovou metodou. Příčinou je podle našeho názoru různě velká populace živých nekultivovatelných buněk vzniklá během



Obr. 4 Korelace mezi stanovením odolnosti vůči 1,0 % solí žlučových kyselin pomocí plotnové metody a průtokové cytometrie

Tab. 1 Výsledky odolnosti laktobacilů izolovaných z bioptických vzorků vůči nízkému pH v MRS bujónu (pH3)

Označení izolátů	0 h KTJ/ml	3 h KTJ/ml	% odolných buněk
K1TM5-10P	6,94E+08	7,02E+08	101,2
K1TM5-11P	6,93E+08	5,27E+08	76,0
K1TM5-12P	1,13E+09	6,90E+08	61,1
K1TM5-15P	7,48E+08	4,74E+08	63,4
K1TM5-16P	9,90E+08	6,06E+08	61,2
K1TM5-17P	4,85E+08	5,56E+08	114,6
K1TM5-18P	1,00E+09	5,05E+08	50,5
K1TM5-18P2	1,19E+09	1,28E+09	107,6
K1TM5-19P	6,66E+08	3,65E+08	54,8
K1TM5-20A	1,07E+09	7,23E+08	67,6
K1TM5-20P	6,68E+08	5,58E+08	83,5
K1TM5-23P	5,46E+08	5,64E+08	103,3
K1TM5-24P	9,20E+08	6,70E+08	72,8
K1TM5-25P	1,04E+09	9,86E+08	94,4
K1TM5-26P	5,75E+08	5,13E+08	89,2
K1TM5-27P	8,56E+08	6,52E+08	76,2
K1TM5-28P	9,60E+08	5,57E+08	58,0
K1TM5-29P	8,05E+08	5,66E+08	70,3
K1TM5-30P	8,00E+08	6,74E+08	84,3
K1TM5-31P	1,00E+09	7,65E+08	76,5
K1TM5-32P	9,70E+08	6,19E+08	63,8
K1TM5-4P	1,25E+09	7,62E+08	61,0
K1TM5-5P	1,17E+09	7,60E+08	65,0
K1TM5-6P	7,00E+08	5,69E+08	81,3
K1TM5-9P	5,58E+08	5,21E+08	93,4
K1TM6-1P	7,80E+08	5,07E+08	65,0
K1TM6-8P	6,78E+08	4,92E+08	72,6
K1TM6-13P	7,87E+08	7,34E+08	93,3
K1TM6-14P	9,80E+08	7,24E+08	73,9
K1TM6-21P	8,10E+08	9,00E+08	111,1
K1TM6-22P	7,00E+08	7,86E+08	112,3
K1TM6-2P	1,40E+09	1,21E+09	86,4
K1TM6-2P	2,75E+09	8,79E+08	32,0
K1TM6-3P	1,09E+09	1,00E+09	91,7
K1TM6-7P	9,30E+08	6,26E+08	67,3
K2TM4-1P	5,44E+08	3,83E+08	70,4
K2TM4-2P	3,37E+08	4,28E+08	127,0
8-57-7A	7,17E+08	5,45E+08	76,0
K1TN7-10P5	1,71E+08	8,20E+07	48,0
K1TN7-4P4	6,60E+08	3,97E+08	60,2
K2TN7-9P	4,50E+07	8,50E+06	18,9
DM1TA3-P	7,10E+07	9,90E+07	139,4
DM1TA6-P	5,40E+08	2,46E+08	45,6
DM2TB-1P	3,55E+08	2,91E+08	82,0
DM2T7-1P1	1,17E+09	5,41E+08	46,2
SP1T7-3P1	9,30E+08	7,02E+08	75,5
SP1TA2-P1	1,50E+09	1,30E+09	86,7
JD2TA1-P	2,98E+08	2,27E+08	76,2
PE1TB-P	5,61E+08	4,77E+08	85,0
PHM-7E1	7,90E+07	7,00E+07	88,6
AVNA1-P	2,18E+09	1,91E+09	87,6
AVZ61-P	5,50E+08	5,77E+08	104,9
AVNA3-P	7,90E+08	4,08E+08	51,6
T1PLAH-P	2,53E+09	2,46E+09	97,2

Tab. 2 Výsledky odolnosti bifidobakterií izolovaných z bioptických vzorků vůči nízkému pH v MRS bujónu (pH3)

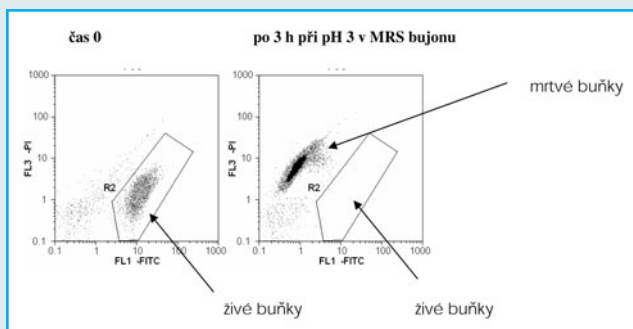
Označení izolátů	0 h KTJ/ml	3 h KTJ/ml	% odolných buněk
K2KV-TOS-8A	2,09E+08	<1x10 ⁵	<0,05
P2LS-TOS-6A	2,52E+08	5,0x10 ⁴	0,02
1-ARC-7A	4,50E+08	<1x10 ⁵	<0,02
K2KV-ARC-6B	1,27E+08	<1x10 ⁴	<0,01
P4TS-TOS-7A	5,30E+06	<1x10 ⁴	<0,2
9-57-5A	9,20E+07	<1x10 ⁴	<0,01
5-ARC-7A	1,19E+09	<1x10 ⁴	<0,01
7-MRS57-7D	8,70E+07	<1x10 ⁴	<0,01
6-57-5A	6,10E+07	<1x10 ⁴	<0,02
K2KV-TOSPA-6A	3,55E+07	<10 ²	<0,01
P2TS-TOSPA-6B	1,03E+07	<10 ²	<0,01
9-ARC-6A	5,60E+06	<10 ²	<0,01
3-ARC-7A	1,46E+08	<1x10 ⁴	<0,01
T1KV-TOSPA-7B	5,31E+07	<10 ³	<0,01
3-MRS57-6A	1,16E+08	<10 ²	<0,01
2-ARC-3C	1,46E+08	<10 ²	<0,01
P4TS-ARC-8A	6,80E+06	<10 ²	<0,01
7-ARC-5C1PP	1,93E+08	<10 ¹	<0,01
K2KV-TOS-8AP	9,30E+07	<10 ¹	<0,01
P3LS-TOSPA-6C	3,00E+08	<10 ²	<0,01
2-ARC-3A	3,60E+06	<10 ²	<0,01
P2TS-ARC-8A	2,75E+07	1x10 ²	<0,01
P4TS-TOS-7A	7,62E+06	2,05x10 ³	0,03
T2KV-TOSPA-6B	4,80E+06	<10 ²	<0,01

kultivace ve stresujícím prostředí. Tato populace není s použitím výše zmíněného kitu u všech kmenů dobře odlišitelná od živých buněk jak je patrné na obrázku 2. Přítomnost poškozených nebo živých nekultivovatelných buněk způsobená působením různých stresujících podmínek byla v případě průtokové cytometrie pozorována řadou dalších autorů (Bunthof a kol., 2001; Rault a kol., 2007; Zotta a kol., 2009). Na rozdíl od našich výsledků zjistili Zotta a kol. (2009) dobrou shodu mezi výsledky plotnové metody a průtokové cytometrie při vystavení testovaných bakterií kyselému prostředí. Příčinou mohlo být trochu jiné spektrum testovaných druhů (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*) než v našem případě (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*), protože v případě bifidobakterií byly rozdíly mezi výsledky plotnové metody a průtokové cytometrie největší.

Mezi počtem životaschopných buněk stanoveným po 3 h kultivaci při 37 °C v MRS bujónu pH 6,5 obsahujícím 0,3, 0,7 a 1,0% solí žlučových kyselin klasickou plotnovou metodou a průtokovou cytometrií existovala výrazná korelace. Za účelem testování odolnosti kmenů vůči působení solí žlučových kyselin lze tedy klasickou plotnovou metodu nahradit metodou průtokové cytometrie.

Závěr

Získané izoláty jsou uchovávány ve vhodných kryoprotektivních médiích, ke každému kmenu je vedena dokumen-



Obr. 5 Vliv působení nízkého pH na počet živých buněk v populaci stanovený průtokovou cytometrií s využitím kitu LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability pro *Lbc. salivarius* CCDM 216

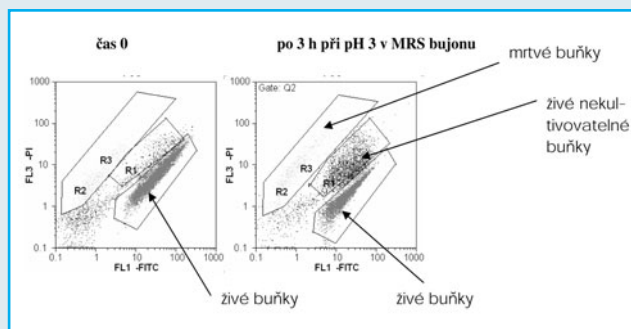
tace o jeho původu (věk pacienta, diagnóza, místo odběru, použité selektivní médium, mikroskopický vzhled, rodové zařazení). Po vytipování bakteriálních kmenů, které budou vykazovat vhodné probiotické vlastnosti, budou hledány cesty jak tyto nově získané kmeny udržovat, maximalizovat jejich výtěžnost a vhodně zapracovat do funkčních potravin, bude navržen design jejich klinického odzkoušení prokazující jejich zdravotní benefit u rizikové skupiny pacientů, např. se zánětlivým onemocněním trávicího traktu či jinými gastrointestinálními obtížemi a na zdravotně příznivé efekty u běžné populace. Informace získané při testování metod budou využity při charakterizaci nových, námi izolovaných kmenů.

Poděkování:

Tato práce byla podporována grantem 2B08068 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR a výzkumným záměrem MSM 2672286101.

Literatura:

- AMOR, K.B., BREEUWER, P., VERBAARSCHOT, P., ROMBOUITS, F.K., AKKERMANS, A.D., DE VOS, W.M., ABEE, T.: Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured and dead bifidobacterium cells during bile salts stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2002, s. 5209-5216.
- ANANTA, E., KNORR, D., HEINZ, V.: Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiol.*, 21, 2004, s. 567-577.
- BUDDE, B.B., RASCH, M.: Comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, 63, 2001, s. 65-72.
- BUNTHOF, C.J., BLOEMEN, K., BREEUWER, P., ROMBOUITS, F.M., ABEE, T.: Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2001, s. 2326-35.
- COLLINS, J.K., THORNTON, G., O'SULLIVAN, G.: Selection of probiotic strains for human application. *Int. Dairy J.*, 8, 1998, s. 487-490.
- DOLGANIUC, A., PANA, M., GHITA, M., STAVARU, C., OLINESCU, A.: Flow cytometric determination of *Enterococcus* spp. susceptibility to four antimicrobial agents. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.*, 60, 2001, s. 307-322.
- DEASY, B.M., REA, M.C., FITZGERALD, F., COGAN, T.M., BERESFORD, T.P.: A rapid PCR method to distinguish between *Lactococcus* and *Streptococcus*. *System. Appl. Microbiol.*, 23, 2000, s. 510-522.
- DUBERNET, S., DESMAYRES, N., GUÉGUEN, M.: A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.*, 214, 2002, s. 271-275.



Obr. 6 Vliv působení nízkého pH na počet živých buněk v populaci stanovený průtokovou cytometrií s využitím kitu LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability pro *Lbc. paracasei* CCDM 211

- FANG HE, OUWEHAND, A.C., ISOLAURI, E., HASHIMOTO, H., BENNO, Y., SALMINEN, S.: Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 30, 2001, s. 43-47.
- FULLER, R.: Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 1989, s. 365-378.
- JANG, J., KIM, B., LEE, J., HAN, H.: A rapid method for identification of type *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. *J. Microbiol. Meth.*, 55, 2003, s. 295-302.
- LICK, S., DRESCHER, K., HELLER, K. J.: Survival of *Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Göttingen minipigs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2001, s. 4137-4143.
- MACIÁN, M.C., CHENOLL, E., AZNAR, R.: Simultaneous detection of *Carnobacterium* and *Leuconostoc* in meat products by multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 2004, s. 384-394.
- OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S., TÖLKKÖ, S., ROBERTS, P., OVASKA, J., SALMINEN, E.: Resected human colonic tissue: New model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 9, 2002, s. 194-186.
- PESARO, M., WIDMER, F.: Identification and specific detection of a novel pseudomonadaceae cluster associated with soils from winter wheat plots of a long-term agricultural field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2006, s. 37-43.
- PFANNEBECKER, J., FRÖHLICH, J.: Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *Int. J. Food Microbiol.*, 128, 2008, s. 288-296.
- PICARD, F.J., KE, D., BOUDREAU, D.K., BOISSINOT, M., HULETSKY, A., RICHARD, D., OUELLETTE, M., ROY, P.H., BERGERON, M.G.: Use of tuf sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 2004, s. 3686-95.
- RAULT, A., BÉAL, C., GHORBAL, S., OGIER, J.C., BOUIX, M.: Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, 55, 2007, s. 35-43.
- ROSSI, F., TORRIANI, S., DELLAGLIO, F.: Genus- and species-specific PCR-based detection of dairy propionibacteria in environmental samples by using primers targeted to the genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1999, s. 4241-4214.
- ROY, D., SIROIS, S.: Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 191, 2000, s. 17-24.
- ZHONG, S.S., ZHANG, Z.S., WANG, J.D., LAI, Z.S., WANG, Q.Y., PAN, I.J., RWN, Y.X.: Competitive inhibition of adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* to intestinal epithelial cell line Lovo by purified adhesin of *Bifidobacterium adolescentis* 1027. *World J. Gastroenterol.*, 10, 2004, s. 1630-1633.
- ZOTTA, T., PARENTE, E., RICCIARDI, A.: Viability staining and detection of metabolic activity of sourdough lactic acid bacteria under stress conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 2009, s. 1119-1124.

Přijato do tisku 2. 8. 2010

Lektorováno 30. 8. 2010