

Mikrobiologická kvalita syrového mléka je nejvíce závislá na způsobu dojení, na kvalitní hygieně vemene před dojením a na zdravotním stavu ovcí. Průběh laktace nemá na sledování mikrobiologických parametrů vliv. Při hodnocení látkového složení mléka byl zjištěn zvyšující se obsah tuku, bílkovin, kaseinu a tukuprosté sušiny. Obsah kaltozy v průběhu laktace klesal.

Ze zjištěných CPM se prokázalo, že je reálné limit CPM  $1,5 \cdot 10^6$  KTJ/ 1 ml dle Nařízení ES 853/2004 splnit i na malých farmách. Je k tomu důležité zajistit kvalitní hygienu vemene, krmné dávky a vyloučit nemocná zvířata. Nadojené mléko je nutné co nejrychleji zchladit na teplotu 4°C. Splnění výše uvedených požadavků vede ke z kvalitnění vstupní suroviny pro další technologické zpracování ovčího mléka na farmách.

### Poděkování

Práce byla podporována prostředky projektu MZe QH72286 a výzkumným záměrem MSM 2672286101.

Literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku 11. 11. 2010

Lektorováno 23. 11. 2010

## OVĚŘENÍ SELEKTIVITY MUPIROCINU PRO STANOVENÍ BIFIDOBACTERIÍ

L. Volná<sup>2</sup>, L. Dymáčková<sup>1</sup>, I. Lacmanová<sup>1</sup>, V. Dráb<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MILCOM a.s., Praha

<sup>2</sup> Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha

### Checking on mupirocin selectivity for bifidobacterium determination

#### Abstrakt

Vliv mupirocinu na 21 typových kmenů bifidobakterií byl stanoven na půdách ARC, ARCP a TOS. Počty kolonie tvořících jednotek byly na třech porovnávaných půdách srovnatelné na hladině významnosti 95 % s výjimkou kmene *Bifidobacterium gallicum* LMG 11596<sup>T</sup>, jehož růst byl na půdě ARCP slabší. Kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* CCM 4988<sup>T</sup> prokázal dobrou růstovou schopnost pouze na půdě TOS. Při pozorování vlivu mupirocinu byl stanoven mírný inhibiční vliv na růst v případě 4 kmenů bifidobakterií na hladině pravděpodobnosti 95 %.

V případě inokulace směsných kultur a kmenů z jiných rodů než *Bifidobacterium* na půdy ARC a ARCP byla zaznamenána přítomnost kolonií různých tvarů, velikostí a různé intenzity modré barvy. Na půdě TOS byly ve většině případů detekovány drobné bílé kolonie velikosti menší než 0,5 mm. Po přidavku mupirocinu do živné půdy byl růst všech testovaných kmenů a kultur významně inhibován s výjimkou kmene *Propionibacterium freudenreichii*

subsp. *shermanii* CCDM 160 na půdách ARC-M a ARCP-M a keřirové kultury. V tomto případě jsou vyšší hodnoty na půdách s mupirocinem způsobeny pravděpodobně přítomností kvasinek v MTO36LV kultuře.

#### Abstract

In this study selective enumeration of bifidobacteria using lithium mupirocin was tested. The effect of mupirocin on 21 strains of bifidobacteria was determined on ARC, ARCP and TOS media. Counts of colonies on media without addition of mupirocin were equivalent at probability level 95 % excepting *Bifidobacterium gallicum* LMG 11596<sup>T</sup>, which level of growth was lower on ARCP medium. Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* CCM 4988<sup>T</sup> was able to grow merely on TOS medium. There was determined slight inhibitory effect of mupirocin on 4 tested bifidobacteria strains at probability level 95 %.

In case of inoculation of mixed cultures and strains from other genera on ARC and ARCP media, there were detected colonies of different shapes, sizes and with different intensity of blue colour. On TOS medium were detected mostly small white colonies with diameter less than 0,5 mm. The growth of all tested strains and cultures was markedly inhibited by addition of mupirocin to growth media exception *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* CCDM 160 on ARC-M and ARCP-M, and MTO36LV. In case of MTO36LV were detected higher counts of colonies probably due to presence of yeasts.

#### 1. Úvod

Různé kmeny rodu *Bifidobacterium* jsou spolu s dalšími bakteriemi a v současnosti i některými kvasinkami označovány jako probiotické mikroorganismy. Dle definice uvedené WHO a FAO v roce 2001 jsou probiotické mikroorganismy "živé mikroorganismy, které mají při podání v dostatečném množství pozitivní vliv na zdraví svého hostitele". Za dostatečné množství je považován denní příjem  $10^8$ - $10^9$  KTJ/ml (Shah, 2000), což je ekvivalentní denní konzumaci 100 g probiotického výrobku s koncentrací  $10^6$  KTJ/ml probiotických mikroorganismů. Legislativně ošetřená je tato skutečnost vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. V této vyhlášce je požadavek na kysané mléčné výrobky s bifidokulturou přítomnost bifidobakterií v minimální koncentraci  $10^6$ /g výrobku a to po celou dobu trvanlivosti. Jelikož nejčastěji používanými probiotickými mikroorganismy v mléčných výrobcích jsou právě různé kmeny bifidobakterií vyskytující se spolu s dalšími druhy bakterií, je tedy nutné jejich selektivní stanovení v těchto produktech.

Pro stanovení bifidobakterií byla vyvinuta řada médií s různou citlivostí, selektivitou a použitelností. Jejich přehled je uveden v práci Roy a kol. (2000). V roce 2000 byla publikována práce navrhuje pro stanovení bifidobakterií použití litné soli mupirocinu (Rada a Koc, 2000). Selektivita mupirocinu pro stanovení bifidobakterií byla

potvrzena i řadou dalších autorů (Dráb a kol., 2005; Grand a kol., 2003, Simpson a kol., 2004). Na základě těchto prací byla v roce 2007 presentována studie popisující vývoj standardní metody pro stanovení bifidobakterií v mléčných výrobcích (Bulletin IDF 411/2007) a na základě výsledků této studie byla zahájena příprava normy pro stanovení presumptivních bifidobakterií ve fermentovaných i nefermentovaných mléčných výrobcích, sušeném mléce, dětské výživě a kyselinových kulturách. Jedná se o normu ISO 29981:2010, která byla na počátku roku 2010 schválena a v průběhu roku 2010 se tedy očekává její uvedení do praxe (ČSN ISO 29981). V této normě je doporučováno použití TOS propionate agar media vyráběného firmou Yakult (YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO., LTD., Japonsko) s přísadkou 50 mg/l lithium mupirocinu.

Cílem této práce bylo zjistit schopnost růstu různých typových kmenů bifidobakterií na tomto médiu, ověřit jeho selektivitu a růst na této půdě porovnat s dalšími používanými médii pro stanovení bifidobakterií založenými na běžně dostupných komerčních sušených médiích.

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Použité kmeny

Jednotlivé typové a referenční kmeny byly získány z různých sbírek mikroorganismů CCM (Česká sbírka mikroorganismů, Brno, ČR), CCDM (Sbírka mlékařenských mikroorganismů Laktoflora, Tábor, ČR), LMG (BCCM/LMG, Gent, BEL). Dále byly použity směsné kultury FD (Chr. Hansen, Hoersholm, DK) a keřirová kultura MTO36LV (MILCOM a.s., Praha, ČR).

### 2.2 Úchova kmenů

Pro dlouhodobé uchování kmenů byly používány vhodné kultivační bujóny smíchané s 20 % 85 % glycerolu a rozplněné po 1,35 ml do kryozkumavek. Po sterilaci kryozkumavek při 121 °C po dobu 20 minut, bylo do zkumavek přidáno přibližně 10 µl 5 % roztoku L-cystein hydrochloridu a 0,2 ml suspenze kmene. Po hodině stání při pokojové teplotě za občasných obrátek zkumavek byly zkumavky uloženy při -70 °C do doby použití.

### 2.3 Kultivace kmenů a stanovení počtu

Všechny druhy rodu *Bifidobacterium* byly kultivovány v MRSC bujónu (Merck 1.10661 + 2g/l  $\text{NaHCO}_3$ ), při 37 °C z kultur uchovávaných při -70 °C v kryozkumavkách. Při kultivaci byl přidáván L-cystein hydrochlorid na výslednou koncentraci 0,05 % (m/v). Kultivační podmínky ostatních kmenů jsou uvedeny v Tab. 1. Po obnovení (inokulum 10 %) byly kmeny dvakrát přeočkovány a kultivovány za optimálních podmínek do začátku stacionární fáze. Směsné kultury MTO36LV a FD byly připraveny zaočkováním granulátu do 10 % RSM (Promil, ČR).

Následně byly kmeny a směsné kultury očkovány na jednotlivé živné půdy a kultivovány při 37°C po dobu 72 hodin v anaerobní atmosféře vytvořené pomocí generátorů anaerobní atmosféry Anaerogen (Oxoid, Basingstoke, VB).

Tab. 1 Vývoj obchodních cen vybraných mlékařenských výrobků v Kč/llkg

Druh	Označení	Teplota růstu	Médium	0,05 % cystein
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CCM 7192 <sup>T</sup>	37°C	MRSC	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCM 7193 <sup>T</sup>	37°C	MRSC	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833 <sup>T</sup>	37°C	MRSC	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	CCM 7088 <sup>T</sup>	37°C	MRSC	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCM 7190 <sup>T</sup>	37°C	MRSC	+
<i>Lactobacillus buchneri</i>	CCDM 1819 <sup>T</sup>	30°C	MRSC	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG 6896 <sup>T</sup>	37°C	M17	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	LMG 6897 <sup>T</sup>	30°C	M17	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 847 <sup>T</sup>	37°C	MRSC	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCM 1877 <sup>T</sup>	30°C	M17	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	CCM 2078 <sup>T</sup>	30°C	MRSC	-
FD kultura		25°C	RSM	-
Keřirová kultura	MT036 LV	25°C	RSM	-
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	CCDM 160	30°C	YEL	-

Legenda: + s přísadkou, - bez přísadky cystein hydrochloridu

Pro stanovení byly použity níže uvedené živné půdy:

**TOS** - TOS propionate agar medium (YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO., LTD., Tokyo, Japonsko) navážka 62,5 g na 1000 ml.

**ARC** - RCM agar 52,5 g (Oxoid CM0151), 0,3 g aniline blue (Sigma-Aldrich), pH 7,10.

**ARCP** - příprava shodná s ARC + přísadka 5 g propionátu sodného / 1000 ml média (Sigma Aldrich, Postfach, Švýcarsko).

**Zásobní roztok lithium mupirocinu** - koncentrace 1g/l mupirocin (AppliChem GmbH Darmstadt, Německo) + 2 g/l LiCl (Sigma-Aldrich, Postfach, Švýcarsko) + 30 g/l T.C.S bujónu (BIO-RAD 64144), rozpuštění v ultrazvukové lázni při 40 °C, sterilace mikrofiltrací 0,22 µm, skladování při -20°C.

Ke všem půdám byl přidán před analýzou 5 % roztok L-cystein hydrochloridu sterilovaný mikrofiltrací na výslednou koncentraci 0,05 % (m/v) a roztok lithium mupirocinu na výslednou koncentraci 100 mg/l.

Růst každého testovaného kmene byl stanoven nejprve třikrát na každé z výše uvedených půd bez mupirocinu a následně byl porovnáván růst na každé půdě obsahující 100 mg/l mupirocinu vzhledem k růstu na samotné půdě.

### 2.4 Vyhodnocení výsledků

Dle normy ČSN P ENV ISO 13843 (2002) pro validaci mikrobiologických metod byla stanovena shodnost a relativní výtěžnost půd.

Po logaritmické transformaci počtů kolonie tvořících jednotek (KTJ) byl k průměrným hodnotám přiřazen interval spolehlivosti dle vzorce  $t_{(\alpha/2, n-1)} S_d / \sqrt{n}$  (Paulson, 2008), kde  $t$  je tabelovaná hodnota studentova rozdělení na hladině významnosti 95% pro  $n-1$  stupně volnosti,  $S_d$  je směrodatná odchylka a  $n$  počet měření. Shodnost výsledků byla stanovena jako směrodatná odchylka tří nezávislých

měření. Pro porovnání růstu bifidobakterií na trojici půd ARC, ARCP a TOS bez přidavku mupirocinu byly použity logaritmické hodnoty tří nezávislých měření pro jednotlivé kmeny bifidobakterií. Vyhodnocení bylo provedeno na základě jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA). U kmenů, jejichž hodnoty testového kritéria nespádaly do oboru kritických hodnot a byla tedy prokázána odlišnost počtů KTJ, byl použit LSD test pro bližší identifikaci půd, na nichž byl růst bifidobakterií právě statisticky odlišný.

Pro vyhodnocení vlivu mupirocinu na růst bifidobakterií na půdách ARC, ARCP a TOS byly vypočteny průměrné rozdíly logaritmických hodnot pro půdy bez mupirocinu a s přidavkem mupirocinu a dále jejich standardní nejistota. Na základě těchto statistických ukazatelů byl proveden Studentův párový jednostranný t-test pro stanovení statisticky významného rozdílu růstu jednotlivých kmenů bifidobakterií na půdách bez mupirocinu a s mupirocinem. Pro výpočet byl použit vzorec  $t = d/s_d \cdot \sqrt{n}$  (Paulson, 2008), kde  $d$  je průměrná hodnota rozdílů log počtů KTJ detekovaných na půdě bez mupirocinu a s přidavkem mupirocinu,  $s_d$  je směrodatná odchylka  $d$  a  $n$  je počet měření. Statistické testy byly provedeny na 95 % hladině významnosti. Dále byla stanovena relativní výtěžnost půd (poměr počtů KTJ na selektivní a referenční půdě uvedený v procentech).

### 3. Dosažené výsledky

Schopnost růstu na třech různých půdách bez mupirocinu a dále s přidavkem mupirocinu byla porovnávaná u 21 typových kmenů bifidobakterií. Seznam těchto kmenů spolu s průměrnými hodnotami logaritmu počtů KTJ a směrodatnými odchylkami je uveden v Tab. 2.

Dále byl pozorován růst na těchto půdách u 12 kmenů z různých rodů a u dvou směsných kultur. Byly vybrány zástupci takových druhů, které jsou často použity ve fermentovaných mléčných výrobcích. Seznam těchto kmenů a kultur je uveden v tab. 1.

Typový kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* CCM 4988<sup>T</sup> nerostl na půdě ARC ani ARCP, zatímco na TOS médiu po 72 h kultivace tvořil bílé kolonie ve tvaru disku o velikosti 0,5-1,5 mm. Stejný typ kolonií byl pozorován na půdě TOS i v případě ostatních kmenů bifidobakterií. Kolonie detekované na půdách ARC a ARCP byly slabě namodralé až našedlé disky o velikosti 0,5 až 3 mm.

Míra růstu jednotlivých kmenů na trojici porovnávaných půd byla stanovena na základě výsledků jednofaktorové analýzy rozptylu uvedených v tab. 3. Hodnota testového kritéria přesahovala tabelovanou hodnotu ( $F_{\text{tab}}=5,14$ ) pouze v případě kmene *Bifidobacterium gallicum* LMG 11596<sup>T</sup>.

**Tab. 2** Průměrné hodnoty log (KTJ) ml<sup>-1</sup> spolu s intervaly spolehlivosti a směrodatnými odchylkami pro jednotlivé kmeny bifidobakterií

Druh	Kmen	ARC		ARC-M		ARCP		ARCP-M		TOS		TOS-M	
		průměr počtů <sup>a</sup>	SD	průměr počtů <sup>a</sup>	SD	průměr počtů <sup>a</sup>	SD	průměr počtů <sup>a</sup>	SD	průměr počtů <sup>a</sup>	SD	průměr počtů <sup>a</sup>	SD
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 10140 <sup>T</sup>	9,19±0,16	0,06	9,17±0,06	0,02	9,17±0,23	0,09	9,13±0,10	0,04	9,07±0,12	0,05	8,92±0,37	0,15
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	CCDM 350 <sup>T</sup>	9,33±0,21	0,08	9,34±0,10	0,04	9,34±0,12	0,05	9,32±0,13	0,05	9,32±0,17	0,07	9,32±0,16	0,07
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	CCM 7208 <sup>T</sup>	8,04±0,30	0,12	8,06±0,34	0,14	8,05±0,38	0,15	8,12±0,24	0,10	8,07±0,29	0,12	8,04±0,30	0,12
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	CCM 4989 <sup>T</sup>	9,31±0,30	0,12	9,31±0,33	0,13	9,32±0,31	0,13	9,32±0,36	0,15	9,28±0,32	0,13	9,30±0,34	0,14
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	CCDM 312 <sup>T</sup>	8,51±0,10	0,04	8,47±0,19	0,07	8,47±0,21	0,09	8,47±0,25	0,10	8,50±0,21	0,08	8,51±0,24	0,10
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	CCM 7207 <sup>T</sup>	9,15±0,80	0,32	9,13±0,85	0,34	9,12±0,74	0,30	9,12±0,78	0,31	9,14±0,86	0,35	9,17±0,72	0,29
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>Infantis</i>	CCDM 232 <sup>T</sup>	9,02±0,08	0,03	9,03±0,06	0,02	9,03±0,07	0,03	8,99±0,17	0,07	9,02±0,07	0,03	9,05±0,17	0,05
<i>Bifidobacterium dentium</i>	CCDM 318 <sup>T</sup>	9,09±0,05	0,02	9,08±0,10	0,04	9,13±0,14	0,05	9,11±0,13	0,05	9,06±0,33	0,13	9,05±0,40	0,16
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	CCM 4988 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	8,44±0,07	0,03	8,44±0,25	0,10
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CCM 4987 <sup>T</sup>	8,05±0,11	0,04	8,02±0,18	0,07	8,07±0,27	0,11	8,03±0,16	0,06	8,03±0,08	0,03	8,01±0,16	0,06
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	LMG 21689 <sup>T</sup>	9,33±0,53	0,21	9,30±0,70	0,28	9,31±0,54	0,22	9,23±0,81	0,33	9,28±0,58	0,23	9,29±0,59	0,24
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	LMG 13197 <sup>T</sup>	9,03±0,33	0,13	9,03±0,17	0,07	9,07±0,09	0,04	9,04±0,27	0,11	9,05±0,35	0,14	9,05±0,32	0,13
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	LMG 21775 <sup>T</sup>	8,99±0,03	0,01	8,94±0,14	0,06	8,98±0,40	0,16	8,91±0,24	0,10	8,95±0,10	0,04	9,00±0,10	0,04
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	LMG 21814 <sup>T</sup>	9,20±0,22	0,09	9,24±0,23	0,09	9,22±0,21	0,09	9,19±0,22	0,09	9,15±0,41	0,17	9,16±0,33	0,13
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	LMG 21395 <sup>T</sup>	9,50±0,20	0,08	9,44±0,39	0,16	9,47±0,12	0,05	9,42±0,23	0,09	9,56±0,12	0,05	9,56±0,01	0,00
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	LMG 11041 <sup>T</sup>	8,23±0,71	0,29	8,25±0,64	0,26	8,24±0,73	0,29	8,25±0,77	0,31	8,24±0,75	0,30	8,25±0,79	0,32
<i>Bifidobacterium breve</i>	LMG 13208 <sup>T</sup>	8,71±0,19	0,08	8,69±0,19	0,08	8,70±0,21	0,08	8,69±0,25	0,10	8,70±0,06	0,03	8,72±0,16	0,07
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	LMG 23609 <sup>T</sup>	9,15±0,19	0,08	9,13±0,21	0,08	9,13±0,11	0,04	9,03±0,14	0,06	9,14±0,25	0,11	9,15±0,19	0,08
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	LMG 11596 <sup>T</sup>	9,10±0,09	0,04	9,13±0,02	0,01	9,04±0,18	0,07	9,05±0,12	0,05	9,17±0,05	0,02	9,17±0,04	0,02
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	CCM 7094 <sup>T</sup>	8,28±0,27	0,11	8,30±0,22	0,09	8,23±0,32	0,13	8,25±0,40	0,16	8,38±0,08	0,32	8,39±0,06	0,24
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	LMG 11574 <sup>T</sup>	9,68±0,18	0,07	9,67±0,29	0,12	9,67±0,14	0,06	9,64±0,22	0,09	9,71±0,15	0,06	9,68±0,14	0,06

Pozn. a - průměrná hodnota ze tří nezávislých měření (log KTJ.ml<sup>-1</sup>) ± interval spolehlivosti

**Tab. 3** Výsledky párového t-testu pro půdy bez mupirocinu a s přidavkem mupirocinu (-M), jednofaktorové ANOVY pro půdy ARC, ARCP a TOS a relativní výtěžnosti půd

Druh	Označení	ARC/ARC-M		ARCP/ARCP-M		TOS/TOS-M		ANOVA (F hodnota)
		t-tes	Relativní výtěžnost	t-test	Relativní výtěžnost	t-test	Relativní výtěžnost	
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 10140 <sup>T</sup>	0,654	95,07	1,38	89,53	1,911	73,77	2,477
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	CCDM 350 <sup>T</sup>	-0,207	100,46	2,36	97,40	0,084	99,69	0,041
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	CCM 7208 <sup>T</sup>	-0,839	104,73	-1,84	112,99	3,223	93,42	0,048
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	CCM 4989 <sup>T</sup>	-0,191	101,27	-0,2	102,04	-6,272	104,57	0,063
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	CCDM 312 <sup>T</sup>	1,195	92,98	0,466	99,45	-2,198	104,30	0,164
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	CCM 7207 <sup>T</sup>	0,886	99,72	-0,23	102,29	-0,543	101,07	0,005
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	CCDM 232 <sup>T</sup>	-0,297	101,92	1,519	91,05	-1,759	106,98	0,194
<i>Bifidobacterium dentium</i>	CCDM 318 <sup>T</sup>	1,087	95,90	0,642	95,38	0,405	98,76	0,62
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	CCM 4988 <sup>T</sup>	-	-	-	-	0,094	100,60	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	CCM 4987 <sup>T</sup>	1,595	93,84	1,337	91,32	0,76	96,30	0,179
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	LMG 21689 <sup>T</sup>	0,97	96,13	1,225	91,32	-3,802	102,26	0,051
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	LMG 13197 <sup>T</sup>	-0,037	98,28	0,787	94,29	0,400	98,03	0,071
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	LMG 21775 <sup>T</sup>	1,668	91,21	1,571	81,83	-5,122	112,26	0,102
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	LMG 21814 <sup>T</sup>	-3,767	109,65	1,624	93,45	-0,603	101,13	0,295
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	LMG 21395 <sup>T</sup>	0,615	90,13	1,501	89,07	-0,718	100,55	1,472
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	LMG 11041 <sup>T</sup>	-0,753	101,51	-1,445	104,93	-0,415	103,71	0,001
<i>Bifidobacterium breve</i>	LMG 13208 <sup>T</sup>	3,064	95,85	1,243	97,71	-0,736	104,76	0,029
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	LMG 23609 <sup>T</sup>	3,021	95,10	6,416	79,21	-0,23	100,95	0,065
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	LMG 11596 <sup>T</sup>	-1,400	106,08	-0,439	103,64	0,045	99,78	5,797
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	CCM 7094 <sup>T</sup>	-0,663	102,39	-0,843	107,68	-0,041	92,38	0,422
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	LMG 11574 <sup>T</sup>	0,417	98,89	1,253	94,52	3,242	92,69	0,366

Pozn.: tabelované hodnoty  $t_{tab}=2,92$ ,  $F_{tab}=5,14$   
hodnoty relativní výtěžnosti jsou uvedeny v procentech

LSD testem byla prokázána inhibice růstu tohoto kmene na půdě ARCP bez přidavku mupirocinu. U ostatních kmenů bifidobakterií byly počty KTJ na trojicích půd srovnatelné.

Pro stanovení inhibičního vlivu mupirocinu v testované koncentraci 100 mg/l na růst typových kmenů bifidobakterií byla hodnocena míra růstu jednotlivých kmenů na půdě bez mupirocinu a na půdě s přidavkem mupirocinu Studentovým jednostranným t-testem. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 3. Hodnoty testového kritéria spadaly do oboru kritických hodnot ( $t_{tab}=2,92$ ) téměř u všech testovaných kmenů bifidobakterií a na hladině významnosti 95 % tedy nebyla zjištěna statisticky významná odlišnost růstu na půdách bez mupirocinu a s přidavkem mupirocinu. Výjimkou byly pouze 4 kmene - *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* CCM 7208<sup>T</sup>, *Bifidobacterium thermophilum* LMG 11574<sup>T</sup>, *Bifidobacterium breve* LMG 13208<sup>T</sup> a *Bifidobacterium crudilactis* LMG 23609<sup>T</sup>. V případě prvních dvou jmenovaných kmenů byl prokázán inhibiční vliv mupirocinu na půdě TOS, hodnoty KTJ na této půdě po přidavku mupirocinu klesly téměř o desetinu řádu. U kmene *Bifidobacterium breve* LMG 13208<sup>T</sup> a *Bifidobacterium crudilactis* LMG 23609<sup>T</sup> byl stanoven slabší růst na půdě ARC-M, pokles byl však o méně než desetinu řádu. Patrnější vliv mupirocinu byl detekován u kmene *Bifidobacterium crudilactis* LMG 23609<sup>T</sup> na půdě ARCP-M, jehož počty KTJ klesly téměř o pětinu řádu. Relativní výtěžnosti půd s přidavkem mupirocinu pro jednotlivé kmene bifidobakterií jsou uvedeny v tab. 3.

Pro ověření selektivity metody byla provedena stejná stanovení u 12 vybraných kmenů z různých rodů a u dvou

směsných kultur (Tab. 1). Na půdě ARC bez přidavku mupirocinu byla prokázána dobrá růstová schopnost všech kmenů s výjimkou typového kmene *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* CCM 2078<sup>T</sup>, který nerostl na žádné z testovaných půd. Na půdě ARCP byl růst kmenů mírně inhibován, v porovnání s ARC půdou se hodnoty počtů KTJ u některých kmenů pohybovaly o 1-3 řády níže. Typové kmene *Lactobacillus helveticus* CCM 7193<sup>T</sup>

**Tab. 4** Růst jednotlivých kmenů a kultur na půdách s přidavkem mupirocinu

Druh	Kmen	ARC-M	ARCP-M	TOS-M
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CCM 7192 <sup>T</sup>	+	+	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCM 7193 <sup>T</sup>	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833 <sup>T</sup>	-	-	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	CCM 7088 <sup>T</sup>	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CCM 7190 <sup>T</sup>	-	-	-
<i>Lactobacillus buchneri</i>	CCM 1819 <sup>T</sup>	-	+	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG 6896 <sup>T</sup>	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	LMG 6897 <sup>T</sup>	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	CCDM 847 <sup>T</sup>	+	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CCM 1877 <sup>T</sup>	-	-	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	CCM 2078 <sup>T</sup>	-	-	-
FD kultura	FD	-	-	-
Kefirová kultura	MT036 LV	+	+	+
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	CCDM 160	+	+	+

Vysvětlivky: + pozitivní výskyt, - negativní výskyt

a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG 6897<sup>T</sup> byly na půdě ARCP zcela inhibovány. Kmeny tvořily na obou půdách kolonie různých tvarů, velikostí a různých odstínů modré. V případě půdy TOS byly detekovány drobné bílé kolonie o velikosti 0,5 mm, případně obtížně počítatelné bodové kolonie. Výjimkou byl kmen *Streptococcus thermophilus* LMG 6896<sup>T</sup>, který tvořil na půdě TOS kolonie o velikosti 1 mm. Po přidavku mupirocinu do všech testovaných živných půd došlo u většiny kmenů k naprosté inhibici jejich růstu, u některých kmenů byl však růst inhibován jen částečně. Schopnost růstu jednotlivých kmenů na půdách s přidavkem mupirocinu je uvedena v tab. 4.

Na půdě ARC M byly počty KTJ nižší o 5 a více řádů v porovnání s počty na půdě bez mupirocinu, v případě stejného porovnání u půd ARCP a TOS byl růst kmenů přidavkem mupirocinu inhibován o 6 a více řádů. Kmeny pozitivní na půdách s mupirocinem tvořily drobné kolonie různých tvarů o velikosti 0,5 mm až obtížně počítatelné bodové kolonie. Jediný kmen, který prokázal velmi dobrou růstovou schopnost i na půdách s mupirocinem, byl *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* CCDM 160, jehož hodnoty na půdách ARC a ARCP bez mupirocinu i s mupirocinem byly srovnatelné. Odlišná morfologie kolonií CCDM 160 na půdě ARCP-M (drobné bodové kolonie) od morfologie kolonií bifidobakterií činí tyto dva rody na této půdě snadno odlišitelné. V případě půdy ARC-M byly však detekovány různé druhy kolonií, některé zaměnitelné s koloniemi rodu *Bifidobacterium*. Na půdě TOS s přidavkem mupirocinu byl růst CCDM 160 variabilní a v průběhu různých měření byla stanovení počtů KTJ velmi odlišná. V případech pozitivního růstu však byly detekovány drobné bodové kolonie snadno odlišitelné od kolonií rodu *Bifidobacterium*.

Směsné kultury FD a MTO36LV prokázaly dobrou růstovou schopnost na půdách bez mupirocinu. V důsledku přítomnosti více kmenů bakterií ve směsných kulturách a dále i kvasinek v keřirové kultuře bylo detekováno více druhů kolonií v rámci jedné půdy. Přidavkem mupirocinu byl růst MTO36LV kultury inhibován maximálně o 3 a více řádů. Vysoké počty na půdách s mupirocinem byly pravděpodobně způsobeny růstem kvasinek. Při stanovení bifidobakterií v keřirové kultuře by tedy měly být použity suplementy inhibující právě růst kvasinek. Na TOS půdě tvořila kultura drobné bodové kolonie odlišitelné od kolonií rodu *Bifidobacterium*. Růst FD kultury byl přidavkem mupirocinu do růstového média zcela inhibován.

#### 4. Závěr

Všechny testované kmeny bifidobakterií prokázaly schopnost růstu na půdě TOS, na půdách ARC a ARCP je však schopnost růstu bifidobakterií pravděpodobně druhově specifická a některé druhy či kmeny nemusí být na těchto půdách zachyceny. Po přidavku mupirocinu byl detekován slabý druhově specifický inhibiční efekt.

Růst kmenů z ostatních rodů byl na trojici testovaných půd bez přidavku mupirocinu druhově specifický. Morfologie kolonií na půdě TOS byla téměř ve všech případech rozdílná od morfologie kolonií bifidobakterií a jednotlivé rody byly snadno odlišitelné. Po přidavku mupirocinu byl růst všech testovaných kmenů a kultur na půdě TOS jednoznačně inhibován. V případě půd ARC a ARCP byla morfologie některých kmenů shodná s morfologií bifidobakterií, po přidavku mupirocinu do těchto dvou půd nedošlo k inhibici u kmene z rodu *Propionibacterium*.

#### Poděkování

Tato práce vznikla díky finanční podpoře Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci grantů 2B06053, 2B08068 a výzkumného záměru MSM 2672286101.

#### Literatura

- BULLETIN IDF č. 411/2007 - Selective enumeration of bifidobacteria in dairy products: Development of a standard method - E-Form
- DRÁB, V., CHMELÁŘ, D., MAREK, P., SEDLÁČEK, I., TYKVART, J., *Využití probiotik v mléčných výrobcích pro zvýšení jejich kvality, nutriční hodnoty a zdravotní bezpečnosti*. 2005. ([http://www.mze.vyzkum.infobanka.cz/zpravy/7435.aspx/Zprava\\_RU\\_2004\\_ZZ2004\\_1382.doc](http://www.mze.vyzkum.infobanka.cz/zpravy/7435.aspx/Zprava_RU_2004_ZZ2004_1382.doc))
- FAO/WHO, *Probiotics in food: Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. FAO food and nutrition paper, 2002. 85. (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>)
- GRAND, M., M. KÜFFER, AND A. BAUMGARTNER, *Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products*. European Food Research and Technology, 2003. 217(1): p. 90-92.
- ISO, *Jakost vod - Pokyny pro validaci mikrobiologických metod*. ČSN P ENV ISO 13843, ČNI, Praha, 2002.
- ISO, *Milk products. Enumeration of presumptive bifidobacteria*. Colony count technique at 37°C. ISO 29981:2010.
- RADA, V., K. SIROTEK, AND J. PETR, *Evaluation of selective media for bifidobacteria in poultry and rabbit caecal samples*. Zentralbl Veterinarmed B, 1999. 46(6): p. 369-73.
- RADA, V., KOC, J., *The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products* *Milchwissenschaft*, 2000. 55(2): p. 65-67.
- ROY, D., *Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products*. International Journal of Food Microbiology, 2001. 69(3): p. 167-182.
- SHAH, N. P., *Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Symposium: Probiotic bacteria*. Journal of Dairy Science, 2000. 83(4): p. 894-907.
- SIMPSON, P.J., ET AL., *The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed*. Journal of Microbiological Methods, 2004. 57(1): p. 9-16.
- PAULSON, D. S., *Biostatistics and Microbiology: A Survival Manual*. Springer, New York. ISBN: 978-0-387-77281-3, 2008. p. 213.
- TABASCO, R., PAARUP, T., JANER, C. PELÁEZ, C., REQUENA, T., *Selective enumeration and identification of mixed cultures of Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, L. acidophilus, L. paracasei subsp. paracasei and Bifidobacterium lactis in fermented milk*. International Dairy Journal, 2007. 17:p. 1107-1114.
- VYHLÁŠKA MZe ČR č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. 2003. ([http://eagri.cz/public/eagri/ws\\_content?contentKind=regulation&section=1&id=55418&name=77/2003](http://eagri.cz/public/eagri/ws_content?contentKind=regulation&section=1&id=55418&name=77/2003))

Přijato do tisku 5. 11. 2010

Lektorováno 23. 11. 2010