

Výsledky

Výsledky týkající se jejich prevalence v odebraných střezech jsou znázorněny graficky (graf 1). Nejvíce zastoupenými byly rody *Staphylococcus* sp. a *Bacillus* sp. Druh *Bacillus cereus* byl zachycen zejména na výrobně tvarohů, ale také v solných lázních, nebo na výrobně sterilovaných výrobků. Stafylokoky byly nejčastěji izolovány ze stěrů pocházejících z prostředí sýrárny (lisovací tvořítka, porcovna a balička sýrů, solné lázně), ale také z prostředí máselárny, či UHT provozu.

Podrobnější výsledky, samotná metodika a seznam literatury jsou k dispozici u autorů.

Poděkování

Tato práce byla podporována projektem 2B08074 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR a výzkumným záměrem MSM č. 2672286101. Poděkování patří i mlékárnám za spolupráci při odběrech vzorků.

Přijato do tisku 10. 7. 2011

Lektorováno 22. 7. 2011

SLEDOVÁNÍ REZISTENCE KMENŮ BIFIDOBAKTERIÍ VŮČI MODELOVÝM PODMÍNKÁM ZAŽIVACÍHO TRAKTU

Kejmarová M., Drbohlav J., Šalaková A., Kunová G., Peroutková J.

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Monitoring of selected *Bifidobacterium* strains resistance to the model conditions of intestinal tract

Abstrakt

Cílem práce bylo testovat odolnost vybraných kmenů *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium* ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® a zkoumat jejich chování v simulovaných podmínkách zaživacího traktu. Tak jako v předešlých dvou letech, byl opět sledován vliv nízkého pH, žaludeční šťávy - pepsinu, pankreatické šťávy - pankreatinu a žlučových solí na počty sledovaných bakterií. Výsledky ukazují, že testované kmeny jsou většinou odolné vůči uvedeným inhibitorům. Sledované bakterie přežívají simulované podmínky trávicího traktu v dostatečném množství a jsou vhodné pro další využití a rozšíření spektra využívaných bifidobakterií v probiotických potravinách.

Klíčová slova: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium*, pepsin, pankreatin, žlučové soli, hydrofobicita

Abstract

The evaluation of resistance of selected *Bifidobacterium* strains, concretely *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium* was the aim of this work. The strains originated from Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora®. The ability to survive in conditions of intestinal tract as well as in the last two years was observed. It was tested influence of low pH, gastric enzyme pepsin, pancreatic juice pankreatin and bile salt in relation to density of bacteria. The results show, that tested strains have good resistance to inhibitors mentioned above. Tested bifidobacteria survived conditions of intestinal tract in high and sufficient density and therefore they are suitable for next usage and widening of spectrum of bifidobacteria in probiotic food.

Key words: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium*, pepsin, pankreatin, bile salts, hydrophobicity

Úvod

V naší další práci pro rok 2011 jsme se opět zaměřili na sledování rezistence vybraných kmenů, a to bifidobakterií, ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora®, která je součástí Českého genofondu mikroorganismů a malých živočichů a rostlin podle zákona č. 252/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů, v simulovaných podmínkách zaživacího traktu člověka. Bifidobakterie patří ke známým a významným probiotickým mikroorganismům. Pro výzkum jsme zvolili 5 kmenů *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, 4 kmeny *Bifidobacterium longum*, 5 kmenů *Bifidobacterium species* a 1 kmen *Bifidobacterium dentium*. Tak jako v minulém roce, tak i letos, jsme sledovali rezistenci vůči nízkému pH, žluči a žlučovým solím, žaludeční šťávě a pepsinu, pankreatické šťávě podle stejné, již uvedené metodiky v r. 2009 a 2010. Dalším naším záměrem bylo otestovat možnosti stanovení další probiotické vlastnosti - hydrofobicity. Určení hydrofobicity dává možnost ověření schopnosti bakterií vázat se na buňky střevní sliznice a tím způsobem napomáhat obrannému systému hostitele v ochraně proti střevním infekcím.

V roce 2010 se zabývali studiem probiotických vlastností:

Qingqing Li a kol. (2010) - zkoumali rezistenci vůči nízkému pH a žluči u *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Qg08. Kmen vykázal 84 % rezistenci vůči pH 2 po 4 hodinách inkubace a 90 % rezistenci vůči žluči. Dále zjistili, že tento kmen je aerotolerantní a byl zařazen mezi komerční probiotické kmeny.

Li Jia e kol. (2010) hodnotili *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis* s ohledem na jejich citlivost vůči nízkému pH žaludku (3,0 - 3,5 pH) a žlučovým solím (o koncentraci 0,15 a 0,60 %). Jejich citlivost, životaschopnost vyjádřili hodnotou log CFU/ ml. První 3 kmeny vykázaly vysokou životaschopnost buněk při pH 3,5 (5,5 log CFU/ ml za 5 hodin) a při koncentraci

žlučových solí 0,6 % (4,5 log CFU/ ml za 3 hodiny). Kmen *B. adolescentis* měl nižší životaschopnost.

Bekeris, M. a kol. (2010) hodnotili rezistenci probiotických bakterií *Bifidobacterium lactis* Bb-12 a *Lactobacillus acidophilus* v jednoduchém modelu trávicího traktu, který vytvořili s 0,46 % ovesného filtrátu o pH 2, ke kterému přidali 4 % vodný roztok prebiotik (inulinu, maltodextrinu a laktulózy). Sledovali fermentaci uvedených probiotických bakterií při 37 °C po dobu 30- 60 minut v tomto prostředí. Obě kultury měly dobrou rezistenci v tomto systému, ale *B. lactis* Bb-12 mělo o něco vyšší rezistenci než *L. acidophilus*. Na základě této práce bychom mohli v budoucích letech dále zjišťovat u kmenů Sbírký Laktoflora® i ochranný účinek některých prebiotik na zvýšení rezistence našich probiotických bakterií a využít tento poznatek v praxi. Význam prebiotik pro zvýšení denzity bakterií je znám.

Alp, G. a Aslim, B. (2010) hledali souvislosti mezi rezistencí vůči žlučovým solím a nízkým pH s produkcí exopolysacharidů (EPS) u bifidobakterií izolovaných z dětských feces a z mateřského mléka. Izolovali, identifikovali a testovali 15 kmenů *B. breve*, 11 kmenů *B. bifidum*, 3 kmeny *B. pseudocatenulatum* a 2 kmeny *B. longum*. Zjistili pozitivní korelace mezi produkcí EPS a rezistencí vůči žlučovým solím a nízkému pH. Tento výzkum ukázal, že vyšší produkce EPS může významně selektovat probiotické kmeny s vyšší rezistencí vůči podmínkám v trávicím traktu.

Charalambos Kotzamanidis a. kol. (2010) hodnotili hydrofobicitu, tvorbu EPS a adhezenci na Caco-2 buňky u vybraných kmenů laktobacilů. Zjistili, že kmen *Lactobacillus plantarum* 2035 měl z této skupiny nejvyšší hydrofobicitu 61 % a také nejvyšší schopnost adhezence na Caco-2 buňky. Další kmen *L. reuteri* DC 421 měl hydrofobicitu 43 % a také vysokou schopnost adhezence na Caco-2 buňky. Z těchto výsledků lze soudit, že vyšší procento hydrofobicity ukazuje na vyšší adhezenci - schopnost vázat se na stěnu střevní sliznice a tím příznivě ovlivnit zdraví konzumentů. Z tohoto článku jsme převzali metodiku stanovení hydrofobicity.

Materiál a metody

- Přehled testovaných kmenů ze sbírky Laktoflora®:
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* (CCDM: 93, 107, 239, 241, 366)
Bifidobacterium longum (CCDM: 219, 367, 369, 372)
Bifidobacterium species (CCDM: 370, 486, 492, 775, 879)
Bifidobacterium dentium (CCDM 318)
- Přístroje:
pH metr HAACH, autokláv PS 20A, termostaty BT 120, vodní lázeň Julabo TW 12, odstředivka Labnet-Spectrafuge 6C, spektrofotometr Biochrom Libra S22
- Chemikálie a roztoky:
pepsin - SIGMA P 7000; pankreatin- SIGMA p 3292; žlučové soli OXOID; NaCl; sterilní destilovaná voda; 0,2M HCl; 0,2M KCl; 0,1M KH₂PO₄; 0,1M NaOH; PBS- fosfátový pufr; 0,1 M KNO₃; xylén
- Postup práce

Lyofilizované kultury použitých kmenů byly nejprve obnoveny několikanásobným přeočkováním v MRS bujonu o pH 6,2 s 1 % cysteinu a pěstovány za anaerobních podmínek. Pak bylo provedeno mikroskopické vyšetření a byly stanoveny počty bifidobakterií. Následovala příprava primární suspenze a stanovení rezistence vůči pH 3, rezistence vůči žlučovým kyselinám, žaludeční šťávě, pankreatické šťávě po dobu 30 minut při 37°C. Stanovení rezistence bylo založeno na kultivačních metodách. Plotny byly očkované přelivem a inkubovány za specifických kultivačních podmínek vhodných pro bifidobakterie (37°C po dobu 72 hodin, anaerobně na MRS 6,2 pH). Po kultivaci byly vyhodnoceny počty KTJ/ ml, logaritmus KTJ se porovnal s kontrolou a vyjádřil v procentech. Zhodnocení rezistence: ≥ 90- 100 % bakterie jsou rezistentní, 50- 90 % bakterie jsou tolerantní, ≤ 50% bakterie jsou inhibované. Pracovali jsme podle již ověřené metodiky, kterou jsme uvedli v článku: Stanovení odolnosti vybraných kmenů laktobacilů vůči modelovým podmínkám trávicího traktu v Mlékařských listech č. 122 (2010). U rezistence vůči žluči jsme upravili metodiku jen s využitím žlučových solí OXOID jako v r. 2009. Pro stanovení hydrofobicity jsme využili metodu, kterou použili Kotzamanidis a. kol. (2010). Suspenzi buněk napěstovanou v MRS bujonu pH 6,2 anaerobně jsme odstředili při 3000 ot. 10 min, 2x promyli PBS pufr a resuspendovali v 0,1 M KNO₃ na koncentraci buněk cca 10⁸ = původní suspenze. Změřili jsme absorban- ci - A₀ původní suspenze kultury při 600 nm. Do zkumavky jsme odměřili 6 ml původní suspenze, přidali 2 ml xylénu a vortexovali po dobu 2 minut, pak nechali stát 20 minut při pokojové teplotě. Po oddělení fází jsme odpipetovali vodní fázi a opět změřili absorban- ci při 600 nm - A₁. Procento hydrofobicity jsme vypočítali: H% = (1- A₁/ A₀) . 100.

Zhodnocení hydrofobicity: čím vyšší je procento hydrofobicity probiotických buněk, tím lepší je jejich schopnost vázat se (adherovat) na buňky střevní sliznice. Schopnost adhezence je základní požadovanou vlastností pro probiotické bakterie.

Tab. 1 Kontrola denzity sledovaných kmenů po 3. přeočkování v MRS bujonu

Kmen CCDM	MRS bujon KTJ/1 ml/log	MRS bujon pH
CCDM 93	1,2 . 10 ⁹ /9,08	4,82
CCDM 107	1,3 . 10 ⁹ /9,11	4,66
CCDM 239	1,4 . 10 ⁹ /9,15	5,11
CCDM 241	3,0 . 10 ⁹ /8,48	4,78
CCDM 366	7,0 . 10 ⁹ /8,85	4,51
CCDM 219	3,1 . 10 ⁹ /8,49	4,80
CCDM 367	1,5 . 10 ⁹ /8,18	4,69
CCDM 369	4,4 . 10 ⁹ /8,64	4,51
CCDM 372	7,4 . 10 ⁹ /8,87	4,59
CCDM 370	1,2 . 10 ⁹ /9,08	4,57
CCDM 486	6,4 . 10 ⁹ /8,81	4,69
CCDM 492	1,7 . 10 ⁹ /9,23	4,54
CCDM 775	1,0 . 10 ⁹ /9,00	4,41
CCDM 879	1,2 . 10 ⁹ /9,08	4,41
CCDM 318	8,0 . 10 ⁹ /8,90	4,32

Tab. 2 Denzita vybraných kmenů vystavených účinku inhibitorů, jejich kontrol, rezistence kmenů a jejich hydrofobicita

Kmen CCDM	pH 3 log KTJ/ ml	Žal. šťáva log KTJ/ ml	Pankr. šťáva log KTJ/ ml	1 % žluč. soli log KTJ/ ml	Průměrná hydrofobicita %
93	K 8,70/ 8,71 R= 100 %	K 8,70/ 7,54 0 R= 87 %	K 8,70/ 8,43 R= 97 %	K 8,56/ 6,57 R= 77 %	60 %
107	K 8,78/ 8,79 R= 100 %	K 8,78/ 7,38 R= 84 %	K 8,78/ 7,68 R= 88 %	K 8,59/ 6,11 R= 71 %	51%
239	K 8,61/ 8,49 R= 99 %	K 8,61/ 7,57 R= 88 %	K 8,61/ 8,53 R= 99 %	K 8,76/ 7,26 R= 83 %	58 %
241	K 7,20/ 7,15 R= 99 %	K 7,20/ 6,15 R= 85 %	K 7,20/ 7,18 R= 99,7 %	K 8,20/ 4,90 R= 60 %	56 %
366	K 8,62/ 8,46 R= 98 %	K 8,62/ 6,78 R= 79 %	K 8,62/ 8,38 R= 97 %	K 7,95/ 6,28 R= 79 %	54 %
219	K 7,98/ 7,57 R= 95 %	K 7,98/ 7,40 R= 93 %	K 7,98/ 7,72 R= 97 %	K 8,08/ 8,04 R= 99 %	58 %
367	K 8,60/ 8,52 R= 99 %	K 8,60/ 8,15 R= 95 %	K 8,60/ 8,32 R= 97 %	K 7,86/ 6,45 R= 82 %	63 %
369	K 8,15/ 8,15 R= 100 %	K 8,15/ 7,38 R= 91 %	K 8,15/ 8,11 R= 99,5 %	K 7,63/ 7,28 R= 95 %	58 %
372	K 8,40/ 8,36 R= 99,5 %	K 8,40/ 7,46 R= 89 %	K 8,40/ 8,41 R= 100 %	K 7,49/ 7,23 R= 96 %	62 %
370	K 8,23/ 8,23 R= 100 %	K 8,23/ 7,60 R= 92 %	K 8,23/ 8,11 R= 99 %	K 7,89/ 6,98 R= 88 %	55 %
486	K 8,62/ 8,66 R= 100 %	K 8,62/ 8,36 R= 97 %	K 8,62/ 8,42 R= 98 %	K 7,56/ 6,88 R= 91 %	49 %
492	K 8,48/ 8,45 R= 99,7 %	K 8,48/ 8,00 R= 94 %	K 8,48/ 8,43 R= 99,4 %	K 8,20/ 6,74 R= 82 %	63 %
775	K 8,76/ 8,72 R= 99,5 %	K 8,76/ 8,70 R= 99,3 %	K 8,76/ 8,74 R= 99,8 %	K 8,26/ 6,75 R= 82 %	68 %
879	K 8,42/ 7,87 R= 94 %	K 8,42/ 5,00 R= 59 %	K 8,42/ 8,40 R= 99,8 %	K 8,30/ 8,23 R= 99 %	67 %
318	K 8,45/ 8,46 R= 100 %	K 8,45/ 8,30 R= 98 %	K 8,45/ 8,36 R= 99 %	K 8,38/ 8,18 R= 98 %	57 %

Výsledky a diskuse

Kmeny dosahují velmi dobrou denzitu - řádově 10^8 , 10^9 . Pro její udržení je nutné přísně zachovat anaerobní podmínky kultivace.

Uvedené kmeny bifidobakterií vykazují velmi dobrou odolnost nebo toleranci vůči podmínkám v trávicím traktu od 59 % u CCDM 879 vůči žaludeční šťávě po 100 % u CCDM 93, 107, 369, 370, 486, 318, především vůči pH 3. Obecně nižší odolnost je vůči žluči - žlučovým solím, nejnižší 60 % je u CCDM 241. Odolnost vůči pankreatické šťávě je u všech kmenů vysoká 88 - 100 %.

Ohledně hydrofobicity můžeme konstatovat, že hydrofobicita všech kmenů je vyrovnaná, pohybuje se od nejnižší 49 % u CCDM 486 po nejvyšší 68 % u CCDM 775.

Závěr

Kmeny testovaných bakterií *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium* ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® jsou rezistentní nebo tolerantní vůči simulovaným podmínkám v trávicím traktu. Z hodnot hydrofobicity můžeme usoudit, že více než polovina všech buněk kmenů bifidobakterií je schopna se adherovat na sliznici střeva a tím příznivě ovlivnit zdraví konzumenta. Testované bakterie mají dobré růstové schop-

nosti při zachování důsledného anaerobního prostředí. K dalšímu využití bychom navrhovali kmen CCDM 775, který vykazuje jak vysokou rezistenci, tak hydrofobicitu a má dobré růstové schopnosti.

Výzkum byl řešen v rámci výzkumného záměru MSM 2672286101.

Literatura:

- ALP, G., ASLIM, B. (2010): Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. Isolated from infants reeces and breast milk. *Anaerobe*, 16, (2), s. 101 - 105.
- BEKERIS, M. GRUBE, M. UPITE, D. KAMINSKA, E. LINDE, R. PELCE, E. DANILEVICS, A. GAVARE, M. KARKLINA, D. (2010): The rezistence of some prebiotics and probiotic bacteria in the stomach model environment. *Latvijas Lauksaimniecibas Universitate- Raksti*, 24, s. 55 - 64. 11ref
- CHARAMBOLOS KOTZAMANIDIS, ANDREAS KOURELIS, EVANTHIA LITOPOULOU-TZANETAKI, NIKOLAOS TZANETAKIS, MINAS YIANGOU (2010): Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 140, s. 154 - 163.
- LI JIA, SHIGWEDHA, N., MWANDEMELE, O.D. (2010): Use of dacid-, dbile-, zacid-, and zbile -values in evaluating bifidobacteria with regard to stomach pH and bile salt sensitivity. *Journal of Food Science*, 75, (1), s. M14 - M18.
- QINGQING LI, QIHE CHEN, HUI RUAN, DONGSHENG ZHU, GUOQING HE (2010): Isolation and characterisation of an oxygen, acid and bile resistant *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Qq08. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, (8), s. 1340 - 1346.

Přijato do tisku 6. 6. 2011

Lektorováno 12. 7. 2011