

IZOLACE A VLASTNOSTI NOVÝCH KMENŮ BIFIDOBAKTERIÍ A LAKTOBACILŮ ZÍSKANÝCH Z KOLOSTRA, SLIN A EXKREMENTŮ MLÁDAT KRMENÝCH KOLOSTREM

Ivana Hyršlová¹, Gabriela Krausová¹, Jana Smolová¹, Monika Štemberková²

¹ - Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o., Praha

² - Česká zemědělská univerzita v Praze

Isolation and characteristics of new bifidobacteria and lactobacilli strains isolated from colostrum, saliva and faeces of colostrum fed cubs

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá izolací nových kmenů bifidobakterií a laktobacilů a testováním jejich vlastností s možností uplatnění do nových výrobků. K izolaci byly vybrány různé zdroje - kravské kolostrum, sliny telat a exkrementy telat, selat a kojenců krmených kolostrum/mateřským mlékem. Po identifikaci kmenů na MALDI-TOF byly sledovány potenciální probiotické vlastnosti zahrnující adhezenci ke směsi HT-29MTX a Caco-2, hydrofobicita, autoagregaci, rezistenci vůči vybraným antibiotikům a růst v přítomnosti komerčních prebiotik. Získané výsledky ukazují pozitivní adhezní vlastnosti kmenů *Lactobacillus reuteri* izolovaných z kravského kolostra a stolice kojenců.

Klíčová slova: Kolostrum, hydrofobicita, prebiotika, autoagregace, probiotika

Abstract

The aim of this study was to isolate new bifidobacteria and lactobacilli strains and to characterize their properties for application in new products. Isolates were obtained from different sources (colostrum, saliva and faeces of colostrum fed cubs) and identified using MALDI-TOF. Strains were assessed for probiotic potential properties including adherence to mixture of HT-29MTX and Caco-2, hydrophobicity, autoaggregation, antibiotic resistance and effect of commercial prebiotics on growth of tested strains. Our results indicated that *Lactobacillus reuteri* isolated from bovine colostrum and faeces have positive adherence properties.

Keywords: Colostrum, hydrophobicity, prebiotics, autoaggregation, probiotics

Úvod

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány v adekvátním množství, působí prospěšně na zdraví hostitele (FAO/WHO, 2002). V současné době dochází k velkému rozvoji potravin s obsahem probiotik. Mezi nejčastěji používaná probiotika patří kmeny z rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Probiotické mikroorganismy jsou spojovány s prevencí nebo léčbou celé řady onemocnění, jako jsou bakteriální nebo virová průjmová onemocnění, zánětlivé onemocnění střev, laktosová intolerance, alergická onemocnění, snížená imunita, infekce způsobená *Helicobacter pylori* a další (Sidira *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2016). Pro zařazení izolovaného kmene mezi probiotické mikroorganismy je nutné splnit celou řadu kritérií - přežít v podmínkách gastrointestinálního traktu, kde jsou kmeny vystaveny působení enzymů v ústní dutině, nízkému pH v žaludku, žlučovým a pankreatickým sekretům. Dále musí adherovat a kolonizovat na sliznici střevního epitelu a kolonizovat střevo, mít antimikrobiální účinek vůči patogenním mikroorganismům, být citlivé k antibiotikům a další (Davoodabadi *et al.*, 2015). Ke stanovení adhezních vlastností je nejčastěji používána *in vitro* metoda s použitím Caco-2 buněk. Dalšími metodami používanými pro stanovení adhezivních vlastností bakteriálních buněk jsou např. metoda mikrobiální adheze k uhlovodíkům (MATH), autoagregace a koagregace. Bakteriální adheze je založena na základě nespecifických fyzikálně-chemických interakcí mezi dvěma povrchy, a proto je adherence bakteriálních buněk obvykle spojena s charakteristikou buněčného povrchu. Korelace mezi adhezivní schopností a hydrofobicitou byla zkoumána v celé řadě prací s často protikladnými výsledky, protože adhezní vlastnosti buněk jsou ovlivňovány celou řadou faktorů, jako jsou složení kultivačního média, teplota, pH a jiné (García-Cayuela *et al.*, 2014; Hernandez-Hernandez *et al.*, 2012; Kos *et al.*, 2003).

Hlavním cílem předkládané práce, proto bylo otestovat adhezivní vlastnosti vybraného souboru izolátů bifidobakterií a laktobacilů získaných z různých zdrojů, protože pozitivní souhra všech vlastností důležitých pro adhezi (adheze k lidským buňkám, povrchová hydrofobicita, autoagregace a koagregace) poskytuje výhodu při kolonizaci intestinálního traktu. Dále byla také testována jejich rezistence k vybraným antibiotikům, protože v současné době, kdy jsou antibiotika používána v rozsáhlém množství, představuje nárůst rezistence vůči antibiotikům závažný problém. Z tohoto důvodu EFSA i WHO/FAO vydaly nařízení pro testování antibiotického profilu probiotických a potenciálně probiotických mikroorganismů (Morandi *et al.* 2013; EFSA, 2008; FAO/WHO, 2002). Posledním sledovaným parametrem byl růst v médiu s přísadkou prebiotika.

Metody a postupy

Vzorky

K izolaci nových animálních kmenů byly vybrány vzorky kravského kolostra, exkrementů selat a telat

krmených kolostrem a stěry tlam telat ve stáří 0-3 dny krmných kolostrem. Vzorky byly odebrány ve spolupráci ZD Kojčice. Pro izolaci humánních kmenů byly použity stolice kojenců krmných mateřským mlékem. Vzorky byly odebírány do vzorkovnice s obsahem Wilkins-Chalgren bujonu (Oxoid, UK) a přidavkem 10 % glycerolu.

Izolace

Pro izolaci kmenů z rodu *Bifidobacterium* bylo použito médium s přidavkem mupirocinu a norfloxacinu dle metodiky Vlková et al. (2015). K izolaci laktobacilů bylo použito MRS (de Man, Rogosa and Sharpe; Merck, Německo) agar o pH 6,2 s přidavkem 0,01 % L-cysteinu hydrochloridu (Sigma Aldrich) a MRS agar o pH 5,7. Kultivace probíhala v anaerobních podmínkách při teplotě 37 °C po dobu 48-72 hodin. Poté byly jednotlivé kolonie přeneseny na MRS agar o pH 6,2 s přidaným L-cysteinem (0,05 %) nebo MRS agar o pH 5,7. Po mikroskopické kontrole byly čisté kmeny ještě třikrát přeočkovány. Následně identifikace izolátů byla provedena ve spolupráci se Státním veterinárním ústavem v Jihlavě. Izolované kmeny byly přeočkovány na krevní agar s beraní krví a identifikovány pomocí metody MALDI-TOF. Tato metoda je založena na ozáření vzorku (kolonie příslušného izolátu) laserem hmotového spektrometru MALDI-TOF. Výsledkem následujících složitějších pochodů jsou hmotnostní spektra, která se srovnávají s databází (komerční či soukromě vytvořenou z naměřených dat).

Hydrofobicita a Autoagregace

Pro stanovení hydrofobicity izolovaných mikroorganismů byla použita MATH metoda popsána v práci Vinderola et al. (2004). Pro stanovení autoagregace jsme vycházeli z práce publikované Kos et al. (2003). V obou případech byla na počátku měření připravená buněčná kultura o optické denzitě 0,55 - 0,60 stanovená při vlnové délce 600 nm (A_0 , H_0), která byla připravená resuspendací odstředěných a promytých buněk po 18 hodinové kultivaci ve fosfátovém pufru (pH 7). Autoagregace se poté odečetla v intervalu 3, 6 a 24 hodin (A_t). Teplota kultivace byla 37 °C. Pro stanovení hydrofobicity buněčného povrchu byl použit hexan. Tento dvoufázový systém byl intenzivně vortexován po dobu jedné minuty. Po ustálení a oddělení fází (10 minut, laboratorní teplota) byla opět měřena absorbance vodné fáze při 600 nm (H_t). Výsledná hodnota autoagregace a hydrofobicity byla vypočtena dle následujících vzorců:

$$A = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \cdot 100\%$$

$$H = \left(\frac{H_0 - H_t}{H_0}\right) \cdot 100\%$$

Růst v přítomnosti prebiotik/sacharidů

Pro testování růstu v médiích s obsahem vybraných prebiotik (Orafiti GR a Vivinal) a sacharidů (laktózy a glukózy)

byla použita metodika uvedená v práci Lopes et al. (2015). Jako negativní kontrola bylo vybráno bazální médium (10 g tryptonu, 10 g peptonu, 5 g kvasn. extraktu, 1 ml Tween 80, 0,5 g L-cysteinu, 1 l vody). Testovaná média byla připravena z bazálního média s přidavkem 2 g/l Orafiti GR (Beneo, Německo), Vivinalu (DOMO, Nizozemsko), laktózy nebo glukózy. Jako pozitivní kontrola byl použit WCH bujon. Zaočkováná média byla kultivována při teplotě 37 °C v anaerobním prostředí. V čase 0 a 24 hodin byla stanovena hodnota optické denzity. Všechny varianty byly v triplicátech.

Rezistence vůči ATB

Citlivost kmenů vůči antibiotikům byla testována plotnovou difuzní metodou, která využívá difuzní vlastnosti antibiotik z papírových disků (Kunová et al., 2012). K testování bylo vybráno 7 antibiotik, které doporučuje k testování EFSA, konkrétně ampicilin (10 µg), vankomycin (5 µg), kanamycin (30 µg), erytromycin (15 µg), klindamycin (2 µg), tetracyklin (30 µg) a chloramfenikol (30 µg; všechna antibiotika Oxoid, UK). Na MRS agar o pH 6,2 s přidavkem 0,05 % L-cysteinu byla aplikována kultura v exponenciální fázi růstu a následně sterilně přidány disky antibiotik. Kultivace probíhala za anaerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 48 až 72 hodin. Následně byly odečteny průměry inhibičních zón v mm, na základě byly kmeny klasifikovány jako rezistentní (průměr inhibiční zóny < 12 mm), částečně citlivé (průměr zón 12 - 16 mm) a citlivé (průměr zón > 16 mm). Všechny varianty byly stanoveny v duplikátech.

Stanovení adherence izolátů tkáňové kultury

Jako model střevní sliznice byla zvolena směsná tkáňová kultura dvou adherentních linií pocházejících z Americké sbírky typových kultur (ATCC) - Caco 2 a HT-29. Buňky HT-29 byly diferencovány pomocí 10 µM methroxátu (MTX). Všechny linie se kultivují v klasických médiích při 37 °C a 5% CO₂. Linie Caco-2 se kultivuje v E-MEM médiu (Lonza, ČR) s přidavkem 20% fetálního bovinního séra (FBS), 1 % penicilinu/streptomycinu (P/S) a 1 % L-glutaminu (Lonza). Linie HT-29 i HT-29-MTX se kultivují v médiu D-MEM (Lonza) s přidavkem 15% FBS (Sigma Aldrich, UK), 1% P/S (Lonza) a 1% pyruvátu sodného (Lonza). Kultury Caco-2 a HT-29-MTX byly smíchány v poměru 9:1. Směsná kultura o koncentraci 2x10⁵ buněk na jednu jamku 96 jamkové mikrotitrační destičky (černé s transparentním dnem upraveným pro tkáňovou kulturu) a kultivuje se do 100 % konfluency (obvykle 24 hodin) v médiu pro linii Caco-2. Izolát dvakrát promytý fyziologickými roztoky a naředěný na OD₆₀₀ = 0,5 se obarví 50 µM roztokem Syta 9 (Life Technologies). Barvení probíhá po dobu 1 hodinu při 37 °C v temnu. Následně je suspenze promyta 1 ml PS. Sto µl promyté suspenze se nanese na promytou (2x200 µl PS) tkáňovou kulturu (1 vzorek celkem do 10 jamek) a přidá se 100 µl PS,

výsledná koncentrace tedy činí 2,5 %. Adherence probíhá 1 hodinu při 37 °C v temnu. Po uplynutí této doby se polovina jamek (tzn. 5) použije jako pozitivní kontrola 100 % fluorescence a druhá polovina se promyje 2x200 µl PS a zavodní 100 µl PS. Fluorescence Syta 9 je měřena při excitaci 478 nm a emisi 510 nm na fluorescenčním readeru Synergy 2 (Tecan). Všechny experimenty se provádějí ve 3 nezávislých opakováních.

Procento adherentních buněk se vypočítá jako:

$$X(\%) = \left(\frac{X_{RFU} - NK}{PK - NK} \right)$$

kde X(%) je fluorescence jamky v procentech; X_{RFU} = fluorescence jamky v relativních fluorescenčních jednotkách; NK = negativní kontrola (nespecifická fluorescence jamky); PK = pozitivní kontrola (fluorescence bakterií bez promývání).

Výsledky a diskuze

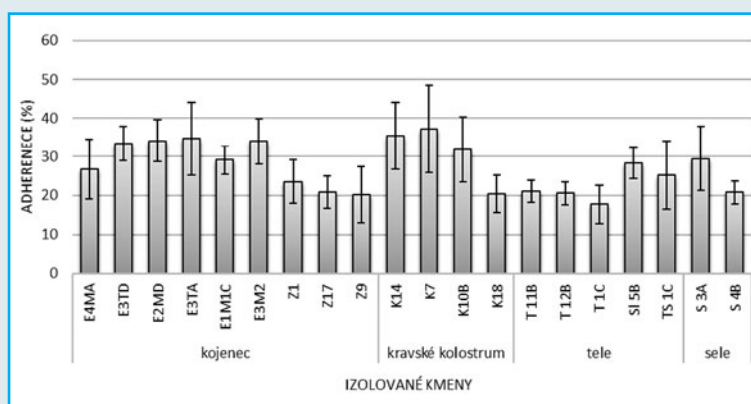
Ze vzorků kravského kolostra, exkrementů a slin bylo získáno přes 200 izolátů, které byly identifikovány pomocí MALDI-TOF. Mezi kmeny kromě laktobacilů a bifidobakterií byly stanoveny i kmeny z rodu *Pediococcus* a *Enterococcus*. Z animálních vzorků byl izolován *Pediococcus pentosaceus* pocházející nejspíše ze siláže, kde jsou kmeny z rodu *Pediococcus* často používány jako inokulanty. Dále byl identifikován *Pediococcus acidilactici*, který kolonizuje zažívací trakt zvířat i člověka. V celé řadě studií je popisován jeho probiotický efekt nebo produkce četných bakteriocinů (Brousseau *et al.*, 2015; Fernandez *et al.*, 2014). Z rodu *Enterococcus* byli stanoveni tři zástupci - *E. durans*, *E. faecalis* a *E. faecium*. U zvířat, jsou probiotické přípravky s enterokoky používány hlavně k léčení nebo prevenci průjmových onemocnění, pro imunitní stimulace nebo ke zlepšení růstu. Na druhou stranu jsou mezi enterokoky i kmeny nežádoucí např. původci nosokomiálních infekcí, bakteriemií, endokarditidy a dalších onemocnění. Vankomycin rezistentní enterokoky (VRE) jsou jedněmi z hlavních původců nosokomiálních infekcí. To, že enterokoky způsobují některé nemoci, vyvolává otázky, zda jsou bezpečné pro použití v potravinách nebo i jako probiotika. Studie o výskytu virulence mezi kmeny enterokoků izolovaných z potravin ukázaly, že kmeny *E. faecalis* jsou častěji virulentní než *E. faecium* (Morandi *et al.*, 2013). Ze získaných izolátů bifidobakterií a laktobacilů byl vybrán pro další testování soubor kmenů uvedených v tabulce I. Mezi nejčastěji izolovaný kmen patřil kmen *Lactobacillus reuteri* a *paracasei*. Z bifidobakterií byly izolovány *Bifidobacterium thermophilum*, *B. pseudolongum* a *B. longum*.

Pro porovnání adhezivních schopností *in vitro* byla jako model vybrána směs Caco-2 a HT-29-MTX. Obě kultury jsou odvozeny od lidské střevní sliznice, přesněji kolorektálního adenokar-

Tab. I Přehled izolovaných kmenů vybraných pro další testování

označení izolátu	původ	identifikovaný kmen
E4MA	stolice kojenc	<i>Lactobacillus reuteri</i>
E2MD	stolice kojenc	<i>Lactobacillus reuteri</i>
E3TA	stolice kojenc	<i>Lactobacillus paracasei</i>
E1M1C	stolice kojenc	<i>Lactobacillus reuteri</i>
E3M2	stolice kojenc	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Z1	stolice kojenc	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Z17	stolice kojenc	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Z9	stolice kojenc	<i>Lactobacillus paracasei</i>
H1	stolice kojenc	<i>Lactobacillus gasseri</i>
H5	stolice kojenc	<i>Lactobacillus gasseri</i>
H 10A	stolice kojenc	<i>Lactobacillus reuteri</i>
H 2B	stolice kojenc	<i>Lactobacillus reuteri</i>
K18	kravské kolostrum	<i>Lactobacillus reuteri</i>
K7	kravské kolostrum	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
K14	kravské kolostrum	<i>Lactobacillus reuteri</i>
K10B	kravské kolostrum	<i>Lactobacillus reuteri</i>
S 4C	exkrementy sele	<i>Lactobacillus paracasei</i>
S 3A	exkrementy sele	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
S 4B	exkrementy sele	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
T 11B	telecí exkrementy	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
T 12B	telecí exkrementy	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
T 1C	telecí exkrementy	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
TS 1B	telecí sliny	<i>Bifidobacterium</i> sp.
SI 5B	telecí sliny	<i>Bifidobacterium longum</i>
TS 1C	telecí sliny	<i>Lactobacillus reuteri</i>
T 8A	telecí exkrementy	<i>Lactobacillus reuteri</i>

cinomu. Střevní sliznice je charakteristická produkcí mucinu, slizovitého glykoproteinu, který tvoří ochrannou vrstvu střeva. Proto byly pro zpřesnění tkáňového modelu buňky HT-29 diferencovány pomocí methroxátu (MTX) tak, aby kontinuálně exprimovaly mucin (Lessufleur a kol., 1990). Schopnost vybraných kmenů adherovat na směs Caco-2 a HT-29-MTX je porovnána na obrázku I. Prezentované výsledky ukazují velkou rozdílnost adherence mezi jednotlivými izoláty. Nejvyšší schopnost adherence byla zjištěna u kmene K7 *Lactobacillus amylovorus* (37,22 %). Adherence nad 30 % byla stanovena především u kmenů izolovaných ze stolice kojenců (E3TD, E2MD, E3TA a E3M2) a kravského kolostra (K14 a K10B).



Obr. 1 Adherence vybraných izolátů na směs Caco-2 a HT-29-MTX buněk

Tab. II Schopnost autoagregace vybraného souboru izolátů

původ	označení	Autoagregace (%)			Hydrofobicitá (%)
		3 hod.	6 hod.	24 hod.	
kojenec	E4MA	12,76	19,05	56,60	56,69
	E3TD	7,85	17,26	50,61	46,09
	E2MD	9,25	15,87	50,23	62,80
	E3TA	10,29	16,99	54,08	18,18
	E1M1C	11,31	17,22	46,29	55,56
	E3M2	4,25	16,38	55,07	33,33
	Z1	6,80	16,63	59,00	56,66
	Z17	11,92	18,35	60,25	62,48
	Z9	2,14	11,55	54,37	53,85
	H1	18,00	24,50	60,12	63,52
	H5	19,79	41,89	82,35	77,63
	H 10A	9,98	19,97	56,91	90,18
H 2B	23,64	40,92	72,72	88,89	
kravské kolostrum	K18	12,27	20,79	66,61	84,73
	K7	14,67	20,86	65,39	52,66
	K14	9,23	16,29	44,42	52,34
	K10B	13,32	14,40	65,10	50,53
tele	T 11B	10,69	15,79	27,93	87,37
	T 12B	6,73	20,10	28,88	56,72
	T 1C	6,74	14,98	37,85	42,20
	TS 1B	5,69	11,69	34,62	35,86
	SI 5B	0,33	22,37	48,92	0,90
	TS 1C	11,21	18,10	31,03	22,33
	T 8A	10,34	20,82	52,33	40,77
sele	S 3A	13,89	25,44	26,60	63,42
	S 4B	4,71	35,44	37,45	78,18
	S 4C	9,94	18,97	43,59	83,22

Tab. III Rezistence testovaného souboru izolátů k vybraným antibiotikům

původ	označení	AMP (10 µg)	KAN (30 µg)	CLI (2 µg)	VAN (5 µg)	E (15 µg)	TE (30 µg)	C (30 µg)
kojenec	E4MA	R/S	R	S	R	S	R/S	S
	E3TD	S	R	S	R	S	R/S	S
	E2MD	S	R	S	R	S	S	S
	E3TA	S	R	S	R	S	R	S
	E1M1C	S	R	S	R	S	R/S	S
	E3M2	S	R	S	R	S	R	S
	Z1	R/S	R	S	R	S	S	S
	Z1R	S	R	S	R	S	S	S
	Z9	R/S	R	S	R	S	R	S
	H1	S	R	S	S	S	S	S
	H 10A	R/S	R	S	R	S	R/S	S
	H 2B	S	R	S	R	S	R	S
kravské kolostrum	K18	S	R	S	R	S	R	S
	K7	S	R	R	R	S	R	S
	K10B	S	R	S	R	S	R	S
	K14	S	R	S	R	S	R	S
sele	S 3A	S	R	S	R	S	R/S	S
	S 4B	S	R	S	R	S	R	S
	S 4C	S	R	S	R	S	R/S	S
	SI 5B	S	R	R	R	S	R	S
tele	TS 1C	R/S	R	R	R	S	R	S
	T 8A	R/S	R	S	R	S	R	S
	T 11B	S	R	S	R	S	R	S
	T 12B	S	R	R	R	S	R	S
	T 1C	S	R	S	S	S	S	S
	TS 1B	S	R	S	R	S	R	S

Nejméně adheroval kmen T1C *Bifidobacterium thermophilum*.

Bakteriální adheze k uhlovodíkům je nejvíce používaná metoda pro měření hydrofobicity buněčného povrchu bakterií mléčného kvašení (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2012). V této práci byla hydrofobicitá měřena extrakcí nepolárním rozpouštědlem hexanem na živých buňkách (Tab. II). Nejvyšší hydrofobicitá (> 90 %) byla stanovena u kmene H10A *Lactobacillus reuteri*. U kmenů H2B *Lactobacillus reuteri*, K18 *Lactobacillus reuteri*, T11B *Bifidobacterium thermophilum* a S4C *Lactobacillus paracasei* byla také zjištěna velmi vysoká hydrofobicitá > 80 %. Některé studie uvádějí, že vyšší hydrofobicitá buněčného povrchu vede k vyšší adhezenci k Caco-2 buňkám a naopak (Sidira *et al.*, 2015). Nejvyšší agregace byla změřena po 24 hodinách u kmenů H5 *Lactobacillus gasseri* (82,25 %) a H2B *Lactobacillus reuteri* (72,72 %). Tyto kmeny měly nejvyšší agregaci i po 6 hodinách.

Rezistenci k antibiotikům lze obecně rozdělit na přirozenou a získanou, která je přenášena horizontálně (transdukci, konjugaci a transformaci). V trávicím traktu dochází k nežádoucímu přenosu genů kódujících rezistenci k antibiotikům mezi mikroflórou a zdravotně nežádoucími mikroorganismy, čímž dochází k terapeutickému snížení účinnosti antibiotik (Mathur & Singh, 2005; Scott, 2002). Ke stanovení rezistence

bylo vybráno sedm antibiotik - ampicilin, kanamycin, klindamycin, vankomycin, erythromycin, tetracyklin, chloramfenikol (Tab. III). Některé studie uvádějí rezistenci některých kmenů laktobacilů ke kanamycinu a vankomycinu (Ren *et al.*, 2014; Davoodabadi *et al.*, 2015). V našem případě izolované kmeny byly k kanamycinu také rezistentní, ale u vankomycinu byla zjištěna sensitivita kmenů T1C *Bifidobacterium thermophilum* a H1 *Lactobacillus gasseri*. U všech kmenů byla také stanovena citlivost k erythromycinu a chloramfenikolu. Kmeny K7 *Lactobacillus amylovorus*, SI5B *Bifidobacterium longum*, TS1C *Lactobacillus reuteri* a T12B *Bifidobacterium thermophilum* byly rezistentní na klindamycin.

AMP - ampicilin, VAN - vankomycin, KAN - kanamycin, E - erythromycin, CLI - klindamycin, TE - tetracyklin, C - chloramfenikol; R rezistentní - < 12 mm; R/S - částečně senzitivní - 12 - 16 mm; S - senzitivní - > 16 mm

Tab. IV Růst vybraného souboru izolátů v médiích s prebiotiky a vybranými sacharidy (OD za 24 hod.)

původ	označení	Orafiti P95	Vivinal	laktóza	glukóza
kojenec	E4MA	4,25 ± 0,16	4,78 ± 0,17	5,68 ± 0,24	5,34 ± 0,23
	E3TD	7,30 ± 0,07	7,21 ± 0,14	7,31 ± 0,16	7,08 ± 0,10
	E2MD	7,51 ± 0,09	6,47 ± 0,21	6,76 ± 0,11	6,89 ± 0,24
	E3TA	5,60 ± 2,02	6,19 ± 1,78	6,37 ± 1,71	6,01 ± 1,67
	E1M1C	7,95 ± 0,10	7,01 ± 0,08	7,05 ± 0,28	7,28 ± 0,22
	E3M2	4,64 ± 0,55	5,06 ± 0,15	5,68 ± 0,16	5,81 ± 0,09
	Z1	7,27 ± 0,16	6,26 ± 0,04	6,54 ± 0,28	6,67 ± 0,28
	Z17	7,44 ± 0,06	5,92 ± 0,06	6,61 ± 0,10	6,35 ± 0,03
	Z9	7,76 ± 0,06	6,58 ± 0,19	7,21 ± 0,09	7,21 ± 0,06
	H1	8,58 ± 0,06	6,64 ± 0,15	6,76 ± 0,04	7,34 ± 0,17
	H 10A	1,93 ± 0,61	5,23 ± 0,29	3,76 ± 2,40	1,56 ± 0,23
	H 2B	5,03 ± 0,55	5,23 ± 0,04	5,78 ± 0,08	5,58 ± 0,06
kravské kolostrum	K18	8,09 ± 0,17	6,89 ± 0,17	7,45 ± 0,11	7,06 ± 0,16
	K7	7,77 ± 0,19	6,97 ± 0,04	7,68 ± 0,15	7,30 ± 0,24
	K10B	7,62 ± 0,06	6,88 ± 0,18	7,25 ± 0,08	7,01 ± 0,17
sele	S3A	5,80 ± 0,36	5,83 ± 0,48	6,87 ± 0,40	5,39 ± 0,13
	S4B	6,87 ± 0,12	6,22 ± 0,07	6,64 ± 0,06	6,65 ± 0,01
	S 4C	6,24 ± 0,15	3,75 ± 0,05	6,01 ± 0,14	5,96 ± 0,05
tele	T12B	5,79 ± 0,04	6,00 ± 0,05	6,49 ± 0,08	6,55 ± 0,17
	T1C	6,34 ± 0,30	6,29 ± 0,07	8,01 ± 0,16	7,61 ± 0,03
	TS 1B	6,42 ± 0,21	6,22 ± 0,41	6,67 ± 0,04	6,65 ± 0,05
	T 8A	7,94 ± 0,12	6,41 ± 0,21	7,68 ± 0,06	8,03 ± 0,15

Probiotika jsou často aplikována do výrobků společně s prebiotiky, jako tzv. synbiotika. Prebiotika mají pozorovatelný vliv na adhezenci probiotik (Kadlec a Jakubec, 2014). Určitá prebiotika mohou zvýšit schopnosti adhezivních vlastností bakteriálních kmenů, což je žádoucí při výběru vhodných kombinací pre- a probiotik. Mezi nejhojněji využívané prebiotické složky patří fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS). U laktobacilů a bifidobakterií bylo prokázáno, že více podporují růstové charakteristiky GOS a laktulóza než inulin (Watson *et al.*, 2013). Hernandez-Heznandez *et al.* (2012) ve své práci testovaly vliv nového galaktooligosacharidu syntetizovaného z laktulózy a komerčního galaktooligosacharidu v porovnání s laktulózou a glukózou na růst, odolnost a adhezní vlastnosti šesti kmenů z rodu *Lactobacillus*. Výsledky ukázaly vyšší nárůst kmenů v médiu s obsahem galaktooligosacharidů v porovnání s glukózou a laktulózou. Dále také byla zjištěna vyšší hydrofobicita u kmenů kultivovaných v médiu s novým galaktooligosacharidem. Využití FOS a inulinu podrobně zkoumali také Rossi *et al.* (2005) u 55 kmenů bifidobakterií. FOS byly fermentovány valnou většinou kmenů, ale jen 8 z nich rostlo v substrátu, kde byl použit jako zdroj uhlíku inulin. U 21 kmenů byla zjištěna tvorba buněčné beta-fruktofuranosidasy. A pouze dva kmeny, které fermentovaly inulin, vykazovaly extracelulární hydrolytickou aktivitu fruktanů. FOS a inulin významně podpořily produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, hlavní produktem fermentace inulinu byl butyrát, u FOS to byla většinou kyselina octová a mléčná. V předkládané práci byla testována dvě komerční prebiotika Orafiti P95, který vzniká jako produkt parciální enzymové hydrolyzy čekankového

inulinu, a galaktooligosacharid Vivinal (Tab. IV). V porovnání s růstem v bazálním médiu (BM) statisticky významně ($P < 0,05$) rostlo 68,18 % izolovaných kmenů v médiu s Orafiti P95 a 45,45 % v médiu s Vivinalem. Při porovnání jednotlivých kmenů rostly kmeny lépe v Orafiti P95.

U kmenů *Lactobacillus reuteri* izolovaných z kravského kolostra a stolice kojenců byly zjištěny pozitivní adhezní vlastnosti. Tyto kmeny také dobře rostly v médiu s obsahem komerčního prebiotika Orafiti GR. Pro aplikaci do nových výrobků je však potřeba celá řada dalších testů a uvedené testy slouží jako prvotní screening. V další fázi bychom se chtěli zaměřit na přesnější identifikaci pomocí molekulárně-genetických metod, které bychom chtěli využít i k potvrzení rezistence k antibiotikům. Samozřejmě také testovat další vlastnosti důležité pro aplikaci do výrobků.

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci institucionální podpory VÚM s.r.o. rozhodnutí č. RO 1416 a za podpory NAZV MZE ČR, projekt č. QJ1210376.

Kontaktní informace: Ing. Ivana Hyršlová

Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6,
email: hyrslova@milcom-as.cz

Literatura

- DIMITRELLOU, D., KANDYLIS, P., PETROVIĆ, T., DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S., LEVIĆ, S., NEDOVIĆ, V., AND KOURKOUTAS, Y. (2016): Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. *LWT-Food Science and Technology* 71, 169-174.
- KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J., VUKOVIĆ, S., ŠIMPRAGA, M., FRECE, J., AND MATOŠIĆ, S. (2003): Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology* 94, 981-987.
- KUNOVÁ, G., VIDAILLAC, A., ROČKOVÁ, Š., RADA, V., AND LISOVÁ, I. (2012): Testování bifidobakterií na citlivost vůči antimikrobiálním látkám. *Mlékařské listy* 135, 403-406.
- LOPES, S.M., KRAUSOVÁ, G., RADA, V., GONÇALVES, J.E., GONÇALVES, R.A., AND DE OLIVEIRA, A.J. (2015): Isolation and characterization of inulin with a high degree of polymerization from roots of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii. *Carbohydrate research* 411, 15-21.
- VINDEROLA, C., MEDICI, M., AND PERDIGON, G. (2004): Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 96, 230-243.
- LESUFFLEUR, T. B. (1990): Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon-carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.*, 50, stránky 6334-6343.
- VLKOVÁ, E., SALMONOVÁ, H., BUNEŠOVÁ, V., GEIGEROVÁ, M., RADA, V., AND MUSILOVÁ, Š. (2015): A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe*, 34, 27-33.
- REN, D., LI, C., QIN, Y., YIN, R., DU, S., YE, F., AND SUN, Y. (2014): *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30, 1-10.
- DAVÓDABADI, A., DALLAL, M. M. S., FOROUSHANI, A. R., DOURAGHI, M., & HARATI, F. A. (2015): Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe*, 34, 53-58.

- DAS, P., KHOWALA, S., & BISWAS, S. (2016): In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *LWT-Food Science and Technology*.
- ROSSI M., CORRADINI C., AMARETTI A., NICOLINI M., POMPEI A., ZANONI S., MATTEUZZI D. (2005): Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Environ Microbiol* 71(10). 6150-8.
- HERNANDEZ-HERNANDEZ, O., MUTHAIYAN, A., MORENO, F. J., MONTILLA, A., SANZ, M. L. AND RICKE, S. C. (2012): Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food microbiology*, 30(2), 355-361.
- WATSON D., O'CONNELL MOTHERWAY M., SCHOTERMAN M. H., VAN NEERVEN R. J., NAUTA A., VAN SINDEREN D. (2013): Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *J Appl Microbiol*. 114(4). 1132
- SIDIRA, M., KOURKOUTAS, Y., KANELAKI, M., & CHARALAMPOPOULOS, D. (2015): In vitro study on the cell adhesion ability of immobilized lactobacilli on natural supports. *Food Research International*, 76, 532-539.
- KADLEC, R., JAKUBEC, M. (2014). The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *J. Dairy Sci*, 97, s 1983-1990.
- GARCÍA-CAYUELA, T., KORANY, A. M., BUSTOS, I., DE CADIÑANOS, L. P. G., REQUENA, T., PELÁEZ, C., & MARTÍNEZ-CUESTA, M. C. (2014): Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57, 44-50.
- MORANDI S, SILVETTI T, BRASCA M (2013): Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 239-249.
- The EFSA Journal (2008) Technical Guidance, Update of the prl ac used in the assessment of bacterial prl ace to antibiotics of human or veterinary prl ace 732: 1-15.
- FAO/WHO (2002) prl ac FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1.

Přijato do tisku: 21. 11. 2016

Lektorováno: 13. 1. 2017

LAKTAČNÍ DYNAMIKA SLOŽEK A VLASTNOSTÍ MLÉKA A ZTRÁTY DOJIVOSTI PODLE POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK U KOZ

Jakub Laušman¹, Oto Hanuš², Pavel Kopunec³,
Jaroslav Kopecký², Radoslava Jedelská²,
Marcela Klimešová², Irena Němečková², Petr Roubal²,
Jan Zlatníček³

¹ Kozí farma Držovice, Uštěk

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

³ Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradiško

Lactation dynamics of milk composition and properties and milk yield losses along somatic cell count in goats

Abstrakt

Práce je zaměřena na objektivní zajištění odhadů ztrát u mléčné užitkovosti koz v kontrole užitkovosti podle počtu

somatických buněk (PSB) v mléce pro podporu prevence poruch sekrece mléka, dojivosti a kvality mléka. Použití je zaměřeno na původní farmu dojených koz, použití jinde je možné u farem s podobnou hladinou PSB, dojivosti koz a podobným systémem chovu. Dynamika složek a vlastností mléka naznačila spolu s poklesem dojivosti zřejmý nárůst PSB s postupující laktací. Tuk a bílkoviny jsou nejnižší ve středu laktace, zatímco laktóza a sušina tukuprostá ke konci laktace. Pro odhad ztrát dojivosti podle růstu PSB byly použity: lineární a nelineární regrese, interpolace, extrapolace, aproximace, kvalifikovaný odhad a relativizace. Relevantní hodnoty geometrického průměru PSB a aritmetického průměru dojivosti činily: 745 10³.ml⁻¹; 2,94 kg/den. Korelace mezi PSB a laktózou a dojivostí byly: -0,416, (P<0,001, n = 1 173); -0,135 (P<0,01). Vztah mezi PSB a dojivostí byl podle měsíců negativní, 6 případů ze 7, významný byl v březnu a květnu (P<0,05 a P<0,01). Např. PSB u koz 1 000 - 1 999, 2 000 - 2 999, 3 000 - 3 999, 4 000 - 4 999, 5 000 - 5 999, 6 000 - 6 999 a ≥ 7 000 10³.ml⁻¹ naznačuje ztráty dojivosti 6,5, 11,1, 15,7, 20,4, 25,0, 29,6 a 34,3 % mléka ve 2. měsíci laktace. Ztráty dojivosti u koz individuálně v kontrole užitkovosti podle PSB byly nejvýraznější v únoru (max. 43,6 % při PSB ≥ 7 tisíc 10³.ml⁻¹) a nejméně výrazné (max. 22,9 % při PSB ≥ 7 tisíc 10³.ml⁻¹) v červnu.

Klíčová slova: koza, laktace, syrové mléko, počet somatických buněk, dojivost, porucha sekrece mléka, kontrola užitkovosti

Abstract

Paper is focused on objective methodology to ensure estimates of losses on the goat yield in milk recording by the somatic cell count (SCC) to promote prevention of milk secretion disorders, milk yield and quality. The use is focused on the original dairy goat farm, use elsewhere is possible in farms with similar SCC, goat milk yield and rearing system. Dynamics of milk components and properties indicated together with the decrease in milk yield obvious increase in SCC with advancing lactation. Fat and proteins are lowest in the middle of lactation, while lactose and solids non fat in lactation end. The linear and nonlinear regression, interpolation, extrapolation, approximation, qualified guess and relativization were used for estimation of milk losses along SCC increase. The relevant values of SCC geometric mean and milk yield arithmetic mean were: 745 10³.ml⁻¹; 2.94 kg/day. Correlations between SCC and lactose and milk yield were: -0.416, (P<0.001, n = 1,173); -0.135 (P<0.01). The relationship between the PSB and milk yield was negative by months, 6 cases of 7 and was significant in March and May (P<0.05 and P<0.01). For instance goat SCCs 1,000 - 1,999, 2,000 - 2,999, 3,000 - 3,999, 4,000 - 4,999, 5,000 - 5,999, 6,000 - 6,999 and ≥ 7,000 10³.ml⁻¹ are corresponding with milk yield losses 6.5, 11.1, 15.7, 20.4, 25.0, 29.6 and 34.3% of milk in second lactation month. Individual goat milk yield losses in milk recording along SCC were most expressive in February (max. 43.6% at SCC