
EFFECT OF CONSUMPTION OF PROBIOTICS AND SYNBIOTICS ON THE COMPOSITION OF INTESTINAL MICROFLORA

Kolářová M., Sládková P., Komprda T., Rožnovská D.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkolaro1@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Effect of consumption of probiotics (bifidobacteria- and *Lactobacillus acidophilus*-containing yogurt) and synbiotics (probiotics with addition prebiotic [inulin]) was carried out using on the composition of microbiota in the human gut in vivo study. Three groups: P (Probiotic), S (Synbiotic) and K (Control, without yogurt) by 22 healthy adults was used for this experiment. P and S groups had without consumption of probiotics for 10 days (adaptation phase). Then a daily serving of yogurt for 21 days. Control group without consumed of yogurt during of experiment. Fecal samples were collected at days: 0 (the end of adaptation phase), 7, 14, 21 (yogurt consumption) and 26, 28 (wash out period). The results of the study suggest that the human fecal bacterial community could be altered by consumption yogurt. After consumption of prebiotics/synbiotics increased counts of LAB, including *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria respectively. The biggest increase of bacterial counts between zero and 14th day of an experiment was observed in the species *L. acidophilus*. The same was true regarding the genus *Bifidobacterium*, where the addition of inulin indicated growth support. The group synbiotic is inhibited growth of *E. coli* during consumption. In this regard, our experiment confirmed the previous data that bifidobacteria can act antagonistic toward some genera of pathogenic bacteria.

Key words: probiotics, prebiotics, synbiotics, microbial community, human intestinal tract

Acknowledgement: This research was supported by grant IGA MENDELU IP 19/2011.

ÚVOD

Střevní mikroflóra je nesmírně důležitá pro správnou funkci trávicího traktu. Gastrointestinální mikroflóra je velice různorodá a složitá - skládá se z více než 400 různých bakteriálních druhů. Mikrobiální osídlení je značně individuální a vyvíjí se v průběhu života a také vlivem vnějších podmínek. Bakterie přítomné v trávicím traktu hrají důležitou úlohu ve vývoji imunitního systému a ochraně lidského zdraví. Ve střevní mikroflóře se v horní části střevního traktu nacházejí převážně fakultativně anaerobní bakterie (např. rody *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* a *Bacillus*), v dolní části střevního traktu pak bakterie striktně anaerobní (např. rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* a *Clostridium*) (Holm, 2001).

Probiotické bakterie udržují střevní mikroflóru v rovnováze, čímž zmírňují potíže způsobené léčbou antibiotiky, infekcí, poruchami imunity, průjmy nebo naopak zácpou a řadu dalších (Gill, 1998). Pro dosažení nápravy těchto symptomů, tedy ke zlepšení zdraví, je podstatná pravidelná konzumace probiotik v dostatečném množství. Za terapeutické minimum se považuje denní konzumace alespoň 100 g mléčného výrobku s minimálním obsahem 10^6 probiotických bakterií v 1 g nebo v 1 ml.

V souvislosti s probiotiky je nutné zmínit prebiotika a synbiotika. Prebiotikum je nestravitelná složka potravy, která stimuluje růst jednoho nebo více druhů bakterií ve střevě. Synbiotikem se pak rozumí taková potravina, která obsahuje probiotickou kulturu, a zároveň prebiotikum, které selektivně podporuje růst konkrétního probiotika. Nejjednodušším příkladem synbiotika pro lidskou výživu je jogurt s obsahem probiotických bifidobakterií a prebiotickou oligofruktózou nebo inulinem.

MATERIÁL A METODIKA

Ke sledování vlivu konzumace probiotik, resp. synbiotik byly sestaveny 3 skupiny osob: skupina K (kontrolní) s vyloučením konzumace fermentovaných mléčných výrobků, skupina P (probiotická) s konzumací bílého selského jogurtu s probiotickou kulturou BIFI a *Lactobacillus acidophilus* o hmotnosti 200 g (Hollandia, Karlovy Vary) a skupina S (synbiotická) s konzumací bílého selského jogurtu s probiotickou kulturou BIFI a *Lactobacillus acidophilus* a přísadkou inulinu o hmotnosti 200 g (Hollandia, Karlovy Vary).

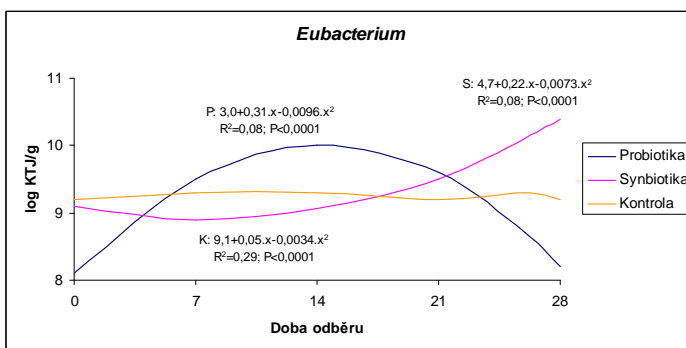
Každá skupina byla složena z 22 probandů v průměrném věku 22 ± 3 roky. Pokus byl zahájen desetidenním adaptačním obdobím následovaným třemi týdny konzumace a byl ukončen týdnem doznívání. V průběhu pokusu byl skupinám 6x odebrán vzorek stolice, a to 0. den (konec adaptační fáze), 7., 14., 21. den (konec konzumace) a ve fázi doznívání 26. a 28. den. Pro odběr stolice byly použity sterilní odběrové tampóny s aktivním uhlím (Vitrum, Česká republika).

Při rozborech byl použito pomnožování médium Nutrient Broth Peptone (Himedia, Itálie). Kultivace probíhala plotnovou metodou pomocí roztěru, při níž byly stanovovány tyto skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů (CPM) na PCA (Biokar Diagnostics, Francie) při 30 °C za 72 h aerobně. Bakterie mléčného kvašení (BMK) na MRS agaru (Biokar Diagnostics, Francie) při 37 °C za 72 h anaerobně. *E. coli* na ENDO agaru (Biokar Diagnostics, Francie) při 37 °C za 72 h aerobně. Rod *Enterococcus* na médiu Slanetz - Bartley (Biokar Diagnostics, Francie) s přidávkem suplementu TTC (Merck, Německo) při teplotě 37 °C po dobu 48 h aerobně, rod *Lactobacillus acidophilus* na MRS agaru (Biokar Diagnostics, Francie) s přidávkem suplementu Clindamycin hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C za 72 h anaerobně. Rod *Bifidobacterium* na BSM agaru (Fluka, Švýcarsko) s přidávkem BSM suplementu (Fluka, Švýcarsko) při teplotě 42°C po dobu 125 h anaerobně, rod *Eubacterium* na půdě Wilkins-Chalgren anaerobe (Oxoid, VB) při 37°C za 72 h anaerobně, rod *Clostridium* na Bouillon RCM de Hirsch (Biokar Diagnostics, Francie) s přidávkem Bacteriological agar Type E (Biokar Diagnostics, Francie). Po ukončení kultivace byly na jednotlivých Petriho miskách odečteny narostlé kolonie a výsledek vyjádřen v KTJ/g.

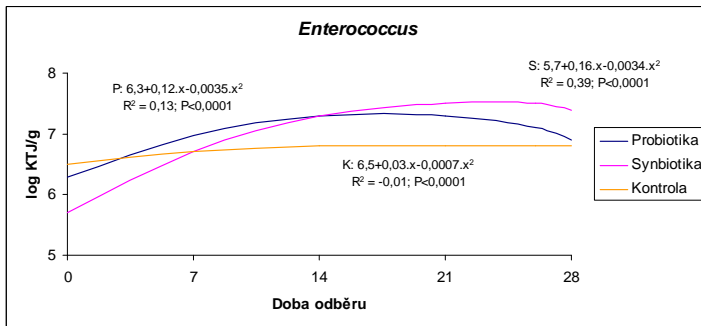
Mikrobiologické ukazatele byly měřeny ve dvou opakováních u každého odebraného vzorku. Průměry z těchto dvou měření byly použity ve statistickém vyhodnocení. Program Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) byl použit pro výpočet základních statistických charakteristik a regresi (testování kvadratické funkce), rozdílů mezi skupinami vzorků v počtu mikrobiálních kolonií (jednostupňové třídění analýzy rozptylu, včetně post hoc Duncanova testu).

VÝSLEDKY A DISKUSE

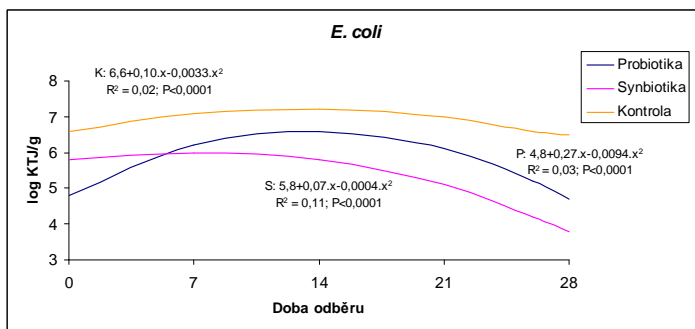
Výsledky stanovení počtů závislosti jednotlivých sledovaných mikroorganismů přítomných ve stolici probandů jednotlivých skupin (P, S, K) na době odběru je znázorněno na Obr. 1 až 6.



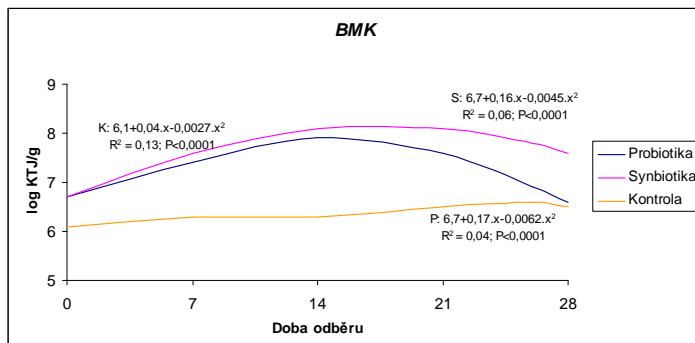
Obr. 1 Celkový počet bakterií rodu *Eubacterium* ve vzorcích stolice



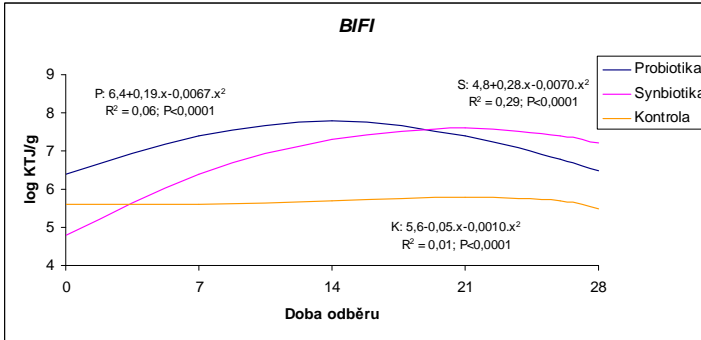
Obr. 2 Celkový počet enterokoků ve vzorcích stolice



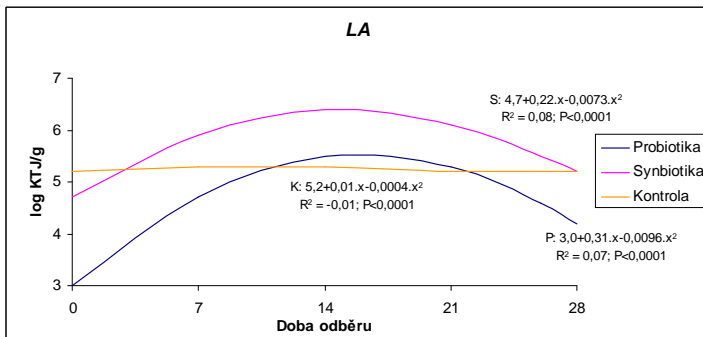
Obr. 3 Celkový počet bakterií druhu E. coli ve vzorcích stolice



Obr. 4 Celkový počet bakterií mléčného kvašení ve vzorcích stolice



Obr. 5 Celkový počet bifidobakterií ve vzorcích stolice

Obr. 6 Celkový počet bakterií druhu *Lactobacillus acidophilus* ve vzorcích stolice

Z Obr.1 vyplývá, že největší zastoupení ve vzorcích stolice probandů všech tří skupin převládá rod *Eubacterium*. Eubaktérie patří mezi hlavní osídlovatele střevní mikroflóry, avšak nejsou příliš prozkoumány. U skupiny konzumující synbiotika je patrný pokles počtu eubaktérií od 0. po 7. den. Od 14. dne docházelo k jejich postupnému vzrůstu. Oproti tomu u skupiny konzumující probiotika došlo v době mezi 0. a 14. dnem k nárůstu eubaktérií a od 14. dne k jejich snížení. Vysvětlením pro zvyšování a snižování počtu bakterií rodu *Eubacterium* mohou být rozdíly ve stravování mezi skupinami probandů. Některé vznikající metabolické produkty pak mohly ovlivnit jejich růst (Belenguer et al., 2006). U kontrolní skupiny zůstávaly počty eubaktérií po celou dobu pokusu přibližně ve stejných hodnotách.

Na Obr. 2 je patrný vliv konzumace probiotik a synbiotik na zvyšování počtů bakterií rodu *Enterococcus*. U skupiny konzumující synbiotika docházelo k nárůstu až do 26. dne, oproti tomu u skupiny konzumující probiotika, u které docházelo k vzrůstu bakterií do 21. dne, u obou skupin se následně počty enterokoků začaly snižovat. Konzumací synbiotik docházelo v porovnání s konzumací probiotik k udržení stejného počtu enterokoků i po dobu dozívání. Podle výzkumu

Belenguer et al. (2006) byl u skupiny konzumující synbiotika zaznamenán vyšší nárůst těchto bakterií než u skupiny konzumující probiotika, čímž se potvrdila i naše studie.

Bakterie druhu *E. coli* početně převládaly u kontrolní skupiny (o celý jeden logaritmický řád, tj. 1.10^8 KJT/g oproti 1.10^7 KJT/g) ve srovnání s ostatními dvěma skupinami (Obr. 3). Na základě těchto zjištění je možné usuzovat, že u skupiny konzumující probiotika docházelo ke snížení zástupců druhu *E. coli* od 14. dne. U synbiotické skupiny bylo potlačení bakterií druhu *E. coli* výraznější než u skupiny probiotické, ke snižování docházelo již od 7. dne konzumace. Tyto výsledky potvrdily hypotézu Gagnona et al. (2004), který uvádí, že bifidobakterie potlačují růst potenciálně patogenních bakterií rodu *Escherichia*.

V počtech BMK je patrný rozdíl mezi skupinami probandů konzumujících probiotika a synbiotika v porovnání se skupinou kontrolní, u níž byl počet BMK po celé časové období experimentu nižší (Obr. 4). Z hlediska orientace experimentu jsme se zaměřili na sledování rodu *Bifidobacterium* a druhu *Lactobacillus acidophilus*, které patřily mezi důležité faktory v konzumaci probiotik a synbiotik, s ohledem na jejich ovlivňování ostatních sledovaných zástupců bakterií v trávicím traktu člověka. Rovněž Collado et al. (2006) zaznamenali zvýšení počtu bifidobakterií ve stolici během konzumace kysaného mléka. Tato studie také potvrdila schopnost bifidobakterií přežívat průchod gastrointestinálním traktem s opětovnou životaschopností buněk v lidských exkrementech.

Z Obr. 5–6 byl u kontrolní skupiny počet bifidobakterií i druhu *Lactobacillus acidophilus* nižší než u skupin probandů konzumujících probiotika a synbiotika. Tyto skupiny měly u druhu *Lactobacillus acidophilus* od počáteční doby konzumace po 14. den tendenci růstu a následně docházelo ke klesání až do fáze doznívání (Obr. 6). Naproti tomu byl pokles počtu bifidobakterií u skupiny konzumující synbiotika zaznamenán až od 21. dne (ukončená konzumace jogurtu). Z porovnání křivek vo době doznívání (Obr. 5 a 6) vyplývá, že životaschopnost bifidobakterií oproti druhu *Lactobacillus acidophilus* je vyšší. Celkový počet BMK (včetně bifidobakterií a *Lactobacillus acidophilus*) převládá u skupiny konzumující synbiotikum. Autoři Klein a kol. (2008) zjistili ve stolici probandů průkazně vyšší množství druhů *Bifidobacterium lactis* a *L. acidophilus* v reakci na konzumaci 300 g jogurtu obsahující tato probiotika po dobu 5-ti týdnů. Také výsledky autorů Uyeno et al. (2008) ukázaly, že v průběhu 20denní konzumace probiotických jogurtů došlo k zvýšení počtu životaschopných laktobacilů ve střevě, po ukončení konzumace však došlo k tzv. „vymytí“ laktobacilů z tlustého střeva. Podané jogurty neobsahovaly prebiotickou složku.

ZÁVĚR

Bylo zjištěno, že u obou skupin probandů konzumujících probiotika, resp. synbiotika docházelo ke zvýšení celkového počtu BMK (vč. bifidobakterií a druhu *Lactobacillus acidophilus*), a zároveň u skupiny konzumující synbiotika došlo ke snížení potenciálních patogenů (*E. coli*) ve stolici, což zabraňuje vzniku nežádoucích infekcí zažívacího traktu člověka. U skupiny synbiotické byly pozorovány lepší výsledky než u skupiny probiotické (např. snížení počtů bakterií druhu *E. coli*, nárůst BMK).

Výsledky experimentu naznačují pozitivní vliv konzumace jak probiotického, tak synbiotického jogurtu. V případě synbiotik se navíc prokázal podpůrný vliv prebiotika na růst pozitivní střevní mikroflóry během konzumace jogurtů a udržení životaschopnosti bifidobakterií i ve fázi týdenního dozrívání, kdy byly ze stravy vyloučeny fermentované mléčné výrobky.

LITERATURA

- Belenguer A , Duncan S. H., Calder A. G., Holtrop G., Louis P., Lobley G. E. & Flint H. J., 2006. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3593 – 3599.
- Collado, M.C., Moreno, Y., Cobo, J.M., Mateos, J.A., Hernández, M., 2006. Molecular detection of *Bifidobacterium animalis* DN-173010 in human feces during fermented milk administration. *Food Research International* 39, 5, p. 530-535.
- Gagnon, M., Kheadr, E. E., Blay, G., Fliss, I., 2003: In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Mikrobiology* 92, 69 – 78.
- Gill, H. S., 1998. Stimulation of the immune system by lactic cultures. *Int. Dairy J.* 8, 535 – 544.
- Holm F., Gut Health [online]. FoodGroup Denmark: 2001 [cit. 2011-10-02]. Dostupný z WWW: <www.flair-flow.com>.
- Klein, A., Friedrich, U., Vogelsang, H., Jahreis, G., 2008: *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *European Journal of Clinical Nutrition* 62, 584-593.
- Uyeno, Y., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., 2007: Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. *International Journal of Food Mikrobiology* 122, 16 – 22.