

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Alternativní molekulárně – genetické metody využitelné při
klasifikaci čistých kultur laktobacilů či laktobacilů ze
směsných vzorků různého původu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Olga Fil

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jiří Killer, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Alternativní molekulárně genetické metody využitelné při klasifikaci čistých kultur laktobacilů či laktobacilů ze směsných vzorků různého původu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu diplomové práce panu doc. Ing. Jiřímu Killerovi, Ph.D., za jeho čas a vstřícnost při zpracovávání této diplomové práce.

Alternativní molekulárně – genetické metody využitelné při klasifikaci čistých kultur laktobacilů či laktobacilů ze směsných vzorků různého původu

Souhrn

Řád Lactobacillales zahrnuje významné rody bakterií mléčného kvašení, jejichž konkrétní druhy a kmeny jsou široce využívány v mlékařském, pečivářském, krmivářském, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Bakterie mléčného kvašení jsou tradičně používány pro fermentaci potravin a krmiv a jsou všeobecně považovány za prospěšné mikroorganismy. Řada kmenů, zvláště z rodu *Lactobacillus*, má potvrzené i probiotické vlastnosti, a vyžaduje detailní identifikaci a klasifikaci používaných kmenů. Nedostatek genu pro 16S rRNA (jako třeba přítomnost více sekvenčně odlišných kopií) nutí hledat jiné, evolučně stálé geny, které by mohly být využity pro přesnější klasifikaci.

Cílem navrhované práce bylo vytipovat vhodné, dosud nepoužívané, geny pro identifikaci a následnou klasifikaci kmenů řádu Lactobacillales. Následně navrhnout pomocí příslušného softwaru (aplikace PRIMER3) vhodné primery ohraničující žádoucí, variabilní segmenty zvolených genů a ty použít při PCR amplifikaci a sekvenaci příslušných genů u 37 typových kmenů zástupců čeledi *Lactobacillaceae* (řádu Lactobacillales). Pro splnění cílů práce byly zvoleny geny náležející do skupiny tzv. aminoacyl-tRNA syntetáz: *alaS* a *lysS*. Při otestování a zároveň navržení vhodných PCR podmínek potvrdit využití sekvenovaných fragmentů při klasifikaci a fylogenetické analýze zástupců čeledi *Lactobacillaceae* (řádu Lactobacillales).

Výsledky amplifikací, sekvenací a následně fylogenetických studií ukázaly, že pro účely klasifikace určitých zástupců řádu Lactobacillales je lepší gen *alaS* oproti genu *lysS* (který byl amplifikován jenom u 18 z 37 testovaných kmenů). Získané výsledky naznačují, že gen *alaS* může být použit jako klasifikační a fylogenetický biomarker ve specifických fylogenetických skupinách / taxonech řádu Lactobacillales ((zejména pro rody *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a skupinu homofermentativních bakterií mléčného kvašení (dříve jen *Lactobacillus*)), avšak specifičnost navrhovaného primeru by měla být ověřena pro mnohem větší počet bakteriálních kmenů patřících do různých rodů řádu Lactobacillales.

Klíčová slova: *Lactobacillus*, *Lactobacillaceae*, klasifikace, probiotika, genový klasifikační marker, fylogenetika.

ALTERNATIVE molecular – genetic techniques usable in classification of strains of lactobacilli or lactobacilli occurring in environmental samples

Summary

The order Lactobacillales includes important genera of lactic acid bacteria, whose specific species and strains are widely used in the dairy, bakery, feed, food, and pharmaceutical industries. Many strains, especially of the genus *Lactobacillus*, have confirmed and probiotic properties, and require detailed identification and classification of the strains used. The shortcomings of the conventional marker 16S rRNA gene, such as the presence of multiple sequence-differentiated copies, drive the research to look for other, evolutionarily stable genes that could be used for more accurate classification.

The aim of the proposed work was to identify new suitable, genes for the identification and subsequent classification of Lactobacillales strains., We used PRIMER3 software to design primers flanking the variable segments of selected genes, *alaS* and *lysS*, encoding aminoacyl-tRNA synthetases. Next, we used our primers in PCR amplification and sequencing of appropriate genes of 37 strains of *Lactobacillaceae*. Optimal PCR parameters were designed and tested. Then we confirmed the use of sequenced fragments in the classification and phylogenetic analysis of representatives of *Lactobacillaceae*.

The results of amplification, sequencing and subsequent phylogenetic studies showed that for to classify certain members of the order *Lactobacillales*, the *alaS* gene was better than the *lysS* gene (which was amplified in only 18 of the 37 strains tested). The obtained results suggest that the *alaS* gene can be used as a classification and phylogenetic biomarker in specific phylogenetic groups / taxa of the order Lactobacillales especially for the genera *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, and a group of homofermentative lactic acid bacteria, but should be validated for a much larger number of bacterial strains belonging to different genera of the order Lactobacillales.

Keywords: *Lactobacillus*, *Lactobacillaceae*, classification, probiotics, gene classification marker, phylogenetics.

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Charakteristika rodu <i>Lactobacillus</i>	11
3.1.1	Fenotypová charakterizace.....	11
3.1.2	Rozdělení rodu <i>Lactobacillus</i> podle metabolismu	12
3.1.3	Taxonomie rodu <i>Lactobacillus</i>	13
3.1.4	Výskyt a komerční použití <i>Lactobacillus</i>	15
3.1.5	<i>Lactobacillus</i> jako probiotika.....	16
3.1.6	Lidské infekce spojené s patogenními druhy <i>Lactobacillus</i>	17
3.2	Charakteristika vybraných druhů <i>Lactobacillus</i>, využívaných pro výrobu funkčních potravin	18
3.2.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
3.2.2	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	20
3.2.3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	21
3.2.4	<i>Lactobacillus helveticus</i>	21
3.2.5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	22
3.2.6	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	23
3.3	Metody využívané při identifikaci a klasifikaci laktobacilů	24
3.3.1	Polymerázová řetězová reakce	24
3.3.2	16S rRNA genová sekvence.....	26
3.3.2.1	Výhody a nevýhody 16S rRNA genové sekvence	27
3.3.3	Real-time PCR (qPCR)	28
3.3.3.1	Výhody a nevýhody metody	29
3.3.4	DNA-DNA hybridizace (DDH)	30
3.3.4.1	DNA-DNA hybridizace – výhody a nevýhody metody	31
3.3.5	Multilokusová sekvenční analýza (MLSA).....	32
3.3.5.1	Multilokusová sekvenční analýza – výhody a nevýhody metody	33
4	Materiál a metody	34
4.1	Sekvence vybraných genů z genomů určených pro navržení vhodných primerů	34
4.1.1	Sekvence genu <i>alaS</i> (kódující alanyl-tRNA syntázu)	34

4.1.2 Sekvence genu <i>lysS</i> (kódující lysyl-tRNA syntázu).....	35
4.2 Vytvoření souborů seřazených sekvencí příslušných genů a jejich použití pro navržení primerů	36
4.3 Testování funkčnosti a specifity navržených primerů na určitých kmenech řádu Lactobacillales	36
4.4 Amlifikace a sekvencování příslušných genů u vybraných zástupců řádu Lactobacillales: potvrzení využití při klasifikaci a fylogenetických studií	37
4.5 Kontrola amplifikace genů za daných PCR podmínek	39
4.6 Fylogenetické studie znázorňující příbuzenské vztahy na základě fylogenetických analýz (stromků)	39
5 Výsledky	40
5.1 Navržené primery pro gen <i>alaS</i> a <i>lysS</i>	40
5.2 Zkouška specifity primerů při amplifikaci obou genů	41
5.3 Testování specifity primerů pro geny <i>alaS</i> a <i>lysS</i> na 37 kmenech řádu Lactobacillales	43
5.4 Výsledky fylogenetických studií.....	44
6 Diskuze	47
7 Závěr	51
8 Seznam použité literatury	52

1 Úvod

Řád Lactobacillales je prezentován jakožto heterogenní skupina bakteriálních rodů z pohledu především morfologie buněk, ovšem mnohdy sdílející některé metabolické, fyziologické a genomové charakteristiky. Řád Lactobacillales zahrnuje významné rody bakterií mléčného kvašení (například *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Vagococcus*), jejichž konkrétní druhy a kmeny jsou široce využívány v mlékařském, pečivářském, krmivářském, potravinářském a farmaceutickém průmyslu (Killer and Mrázek, 2018).

Rody patřící do řádu Lactobacillales se hojně využívají jako startovací kultury ve výrobě fermentovaných mléčných výrobků, fermentovaných masných výrobků, sýrů, zeleniny, využívají se také pro konzervace zeleniny a krmiv, při výrobě vín. Podílí se na tvorbě charakteristické chuti, vůně a prodlužují trvanlivost fermentovaných produktů (Stefanovic et al., 2016).

Bakterie mléčného kvašení jsou tradičně používány pro fermentaci potravin a krmiv a jsou všeobecně považovány za prospěšné mikroorganismy. Řada kmenů, zvláště z rodu *Lactobacillus*, má potvrzené i probiotické vlastnosti. Jsou to *Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactocaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrückii ssp. bulgaricus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lactis* (Vodrážká, 2007; Bermudez – Brito et al., 2012). Jejich probiotické vlastnosti hlavně spočívají v potlačení růstu patogenních bakterií prostřednictvím konkurenčního vyloučení a tvorbou organických kyselin a antimikrobiálních látek (Bermudez – Brito et al., 2012). Při správném složení probiotických kmenů dochází k obnově střevní mikrobioty a zvýšení obranné reakce organismu. Bakterie rodu *Lactobacillus* se přirozeně nacházejí v lidském i zvířecím organismu, na rostlinách, v rostlinných materiálech a ve fermentovaných potravinách (sýry, jogurty, fermentované mléko, maso, zelenina). Patří k běžné mikrobiotě gastrointestinálního traktu zdravého člověka.

Základ současné klasifikace bakterií mléčného kvašení byl položen na začátku 20. století, kdy tuto skupinu bakterií poprvé popsal profesor Orla-Jensen. Ale ani v současnosti však neexistuje jednoduchá a jednoznačná definice bakterií mléčného kvašení. Za vhodné se považuje

popsat zástupce skupiny na základě výčtu jejich typických vlastností jako Gram-pozitivní, nesporulující, katalasa-negativní koky nebo tyčinky postrádající cytochromy, pocházející z neaerobního prostředí, avšak aerotolerantní, náročné na živiny, acidotolerantní, striktně fermentativní, produkující jako hlavní produkt fermentace sacharidů kyselinu mléčnou (Horáčková et al., 2018). Široké uplatnění kmenů řádu Lactobacillales v potravinářském a farmaceutickém průmyslu vyžaduje detailní identifikaci a klasifikaci používaných kmenů. Jenom rod *Lactobacillus* zahrnuje 261 druhů (k březnu 2020), které jsou extrémně rozmanité na fenotypové, ekologické a genotypové úrovni (Zheng et al., 2020). Tradiční metody charakterizace většiny druhů zahrnují fenotypovou analýzu, jako jsou profily fermentace sacharidů (Boyd et al., 2005), avšak zisk a ztráta plazmidů může tento fenotyp ovlivnit a může ztížit identifikaci kmenů (Hill et al. 2018).

V současné době je podrobná identifikace, klasifikace a fylogenetická analýza bakterií založena na molekulárně genetických technikách včetně stanovení DNA-DNA příbuznosti a 16S rRNA genové sekvence (Mokoena, 2017). Dané metody jsou časově náročné, vyžadují velkou odbornost, a navíc nejsou spolehlivé pro podrobnou klasifikaci velice příbuzných druhů skupiny bakterií mléčného kvašení. Zejména v taxonomické klasifikaci rodu *Lactobacillus*, kde různé druhy mají velmi podobné (nebo téměř identické) 16S rRNA genové sekvence. Z tohoto důvodu je podrobná klasifikace bakterií mléčného kvašení v současné době zaměřena na náročné fylogenomické analýzy využívající sekvenci celých genomů a mnohem jednodušší sekvenování genetických markerů nezbytných pro životaschopnost bakterií, tzv. „housekeeping geny“ (dále jen HKG) (Mekadim et al., 2019). HKG jsou exprimované ve všech typech tkání a buněk a jsou potřebné pro údržbu základních buněčných funkcí, mají pomalý evoluční vývoj, lepší rozlišovací schopnost, a to zejména na úrovni rodu, a dokonce i druhu (Jay a Inskeep, 2015). Dané vlastnosti HKG otevírají perspektivu jejich využití jako relativně jednoduššího a efektivnějšího nástroje pro klasifikaci a typizaci vybraných zástupců řádu Lactobacillales (Mekadim et al., 2018).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

V genomech zástupců čeledi *Lactobacillaceae* (řádu Lactobacillales) se vyskytují tzv. provozní, ortologní geny (evolučně-sekvenačně relativně stálé, nepodléhající horizontálnímu přenosu a rekombinacím) distribuované u všech zástupců vyjmenované čeledi (řádu) a zároveň sekvenčně odlišné mezi taxonomickými jednotkami. Sekvence těchto genů dostupné v kompletních genomech umožňují po seřazení nalézt pomocí vhodného softwaru variabilní úseky ohraničené tzv. „primery“ (oligonukleotidy), resp. sekvenčně konzervativní úseky. Navržené primery mohou být následně použity při PCR (Polymerázová Řetězová Reakce) metodě za použití vhodných PCR programů pro amplifikaci a následně sekvenaci variabilních fragmentů genů. Ty by mohly být využity pro přesnější klasifikaci na úroveň taxonomických jednotek (hlavně druhů, poddruhů a kmenů) příslušných bakterií oproti sekvenci genu pro 16S rRNA (ribosomální rRNA malé podjednotky ribozómů), který je sice považován za jakýsi klasifikační „standard“ prokaryot, ovšem skýtá mnoho nedostatků. Mezi ně patří přítomnost více sekvenčně odlišných kopií u některých kmenů (druhů) bakterií a vysoká sekvenční (%) similarita mezi kmeny, poddruhy a mnohdy i druhy (nabývající až ≥ 99.0 %).

Cílem této práce je vytipovat vhodné, dosud badateli nepoužívané, geny pro dané účely na základě určitých požadavků. Následně navrhnout pomocí příslušného softwaru vhodné primery ohraničující žádoucí, variabilní segmenty genů a ty použít při PCR amplifikaci a sekvenaci příslušných genů u typových kmenů zástupců č. *Lactobacillaceae* (řádu Lactobacillales). Při otestování a zároveň navržení vhodných PCR podmínek potvrdit využití sekvenovaných fragmentů při klasifikaci a taxonomii zástupců č. *Lactobacillaceae* (ř. Lactobacillales).

3 Literární rešerše

3.1 Charakteristika rodu *Lactobacillus*

3.1.1 Fenotypová charakterizace

Lactobacillus je vysoce heterogenní rod, který zahrnuje bakterie se širokou škálou biochemických a fyziologických vlastností (Felis and Dellagio, 2007). Rod *Lactobacillus* je nejpočetnější skupinou mezi zástupci bakterií mléčného kvašení.

Lactobacillus je rod grampozitivních, nesporelujících, kataláza-negativních, fakultativně anaerobních, anebo mikroaerofilních nepohyblivých tyčinkových bakterií mléčného kvašení (Goldstein et al., 2015). Optimální teplota růstu je 20 až 30 °C, většina druhů je schopna růstu při 45 °C (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* má při této teplotě optimum růstu). Laktobacily se většinou vyskytují ve formě tenkých tyčinek, mohou se však objevit i jako spirály nebo kokobacily (Singh et al., 2008). Laktobacily mají poměrně vysoké požadavky na růst, jsou acidotolerantní až acidofilní.

Morfologie bakteriálních kolonií závisí na médiu. Většinou jsou to malé až střední, šedé kolonie u některých s jasně viditelnou alfa hemolýzou na krevním agaru (Xu et al., 2019). Laktobacily rostou na řadě médií včetně MRS (Man, Rogosa a Sharpe) agaru, na kterém obvykle vypadají jako bílé mukoidní kolonie (Goldstein et al., 2015).

Základ současné klasifikace bakterií mléčného kvašení byl položen na začátku 20. stol., kdy tuto skupinu bakterií poprvé popsal profesor Orla-Jensen. V roce 1919 Orla-Jensen roztřídil laktobacily do tří skupin (termobakterie, streptobakterie, betabakterie), a to podle jejich růstové teploty a podle morfologických a fenotypových rysů. Na základě postupného rozšíření znalostí o vlastnostech BMK, včetně molekulárně biologické charakteristiky, se výrazně rozšířil počet rodů vyhovujících popisu BMK oproti čtyřem původně uváděným Orla-Jensenem, což byly rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus* (Horáčková a kol. 2018).

3.1.2 Rozdělení rodu *Lactobacillus* podle metabolismu

Jedním z identifikačních znaků bakterií řádu Lactobacillales je hlavní produkt metabolismu – kyselina mléčná vznikající z fermentovaných sacharidů. Podle Görnera a Valíka (2004) jsou laktobacily rozděleny do tří skupin podle jejich fenotypových vlastností a zkvašování cukrů (Tabulka 1)

Tabulka 1. Rozdělení laktobacilů podle Görnera a Valíka (2004)

Skupina I	Skupina II	Skupina III
<i>L. delbrüeckii ssp. delbrüeckii</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. bifermatas</i>
<i>L. delbrüeckii ssp. bulgaricus</i>	<i>L. bavaricus (L. sake)</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrüeckii ssp. lactis</i>	<i>L. casei ssp. casei</i>	<i>L. buchneš</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. casei ssp. pseudoplantarum</i>	<i>L. confusus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei ssp. rhamnosus</i>	<i>L. divergens</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>L. casei ssp. tolerans</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fructivorans</i>
<i>L. yamanashiensis</i>	<i>L. maltaromaticus</i>	<i>L. halotolerans</i>
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. kandleri</i>
		<i>L. kefir</i>
		<i>L. reuteri</i>
		<i>L. sanfrancisciscensis</i>
		<i>L. viridescens</i>

Skupina I: obligátně homofermentativní laktobacily. Fermentují hexózy výhradně na kyselinu mléčnou (>90 %), nefermentují pentózy a glukonáty. Do této skupiny lze zařadit všechny termobakterie v Orla-Jensenovém pojetí, jako i další novější popsání druhy.

Skupina II: fakultativně heterofermentativní laktobacily. Také fermentují hexózy téměř vždy na kyselinu mléčnou, ale při nedostatku glukózy se homofermentativní dráha mění na

heterofermentativní a dochází k produkci kyseliny octové, mravenčí a etanolu. Pentózy jsou fermentovány pomocí indukovatelné fosfoketolázy. Tato skupina obsahuje všechny streptobakterie a další nově popsání druhy.

Skupina III: obligátně heterofermentativní laktobacily. Při fermentaci hexóz produkují kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, ethanol a CO₂. Pentózy jsou fermentovány na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Tato skupina obsahuje v Orla-Jensenovém pojetí heterofermentativní plyn tvořící laktobacily s původním pojmenováním betabakterie a další později popsání druhy (Görner a Valík, 2004; Felis and Dellagio, 2007; Sedláček, 2007).

3.1.3 Taxonomie rodu *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je jeden s nejrozsáhlejších rodů, který obsahuje 261 popsání druhů (poslední aktualizace již 15. dubna 2020) (Zheng et al. 2020).

Fylogeneticky se *Lactobacillus* řadí do:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Lactobacillales*

Čeleď: *Lactobacillaceae*

Rod: *Lactobacillus*

Taxonomie rodu je velmi složitá z důvodu podobnosti a blízké příbuznosti některých druhů. Podrobná diference, klasifikace a fylogenetická analýza řádu *Lactobacillales* se provádí pomocí molekulárních technik, které zahrnují srovnání celých genomů – multilokusovou sekvenční analýzou, DNA-DNA hybridizací a 16S rRNA sekvenováním (Mekadim et al., 2018).

Během posledních 15 let se sekvenování celých bakteriálních genomů stalo široce dostupným a průměrná hodnota nukleotidové identity (ANI) genů sdílená mezi dvěma bakteriálními genomy byla zavedena jako ‚zlatý standard‘ pro vymezení nových bakteriálních druhů.

Na základě polyfázického přístupu byl překlasifikován rod *Lactobacillus* do 25 rodů včetně emendovaného rodu *Lactobacillus*, který zahrnuje organismy adaptované na hostitele, které byly označovány jako skupina *L. delbrueckii*; *Paralactobacillus*; jakož i 23 nových rodů: *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* a *Secundilactobacillus*.

I když se názvy rodů v některých případech změnilo, části jmen, které označují druhy, se zůstali neměnné. V tabulce níže je uvedeno, jak se změnilo názvy důležitých probiotických a potravinářských druhů *Lactobacillus* (Tab. 2) (Zheng et al. 2020).

Tabulka 2. Nové názvy některých významných probiotických a potravinářských druhů *Lactobacillus*.

Předchozí název	Nový název
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lentilactobacillus kefir</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Latilactobacillus sakei</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>

Nedošlo ke změnám v názvech třeba u *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lactobacillus bulgaricus*), *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* či *Lactobacillus helveticus* (Zheng et al. 2020).

3.1.4 Výskyt a komerční použití *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou téměř všudypřítomné, vyskytují se v prostředích, kde jsou k dispozici sacharidy. K takovým prostředím patří potraviny, dýchací cesty a pohlavní orgány lidí a zvířat, rostliny a odpadní vody (Felis and Dellagio, 2007). Například *Lactiplantibacillus plantarum* se přirozeně vyskytuje v zelenině a *Lacticaseibacillus rhamnosus* v ústní dutině. Původně byly laktobacily nalezené a izolované v půdních vzorcích.

Kmeny rodu *Lactobacillus* jsou často využívány v potravinářském průmyslu jako startovací kultury (startéry). Startéry jsou mikrobiální kultury používané k podpoře a provádění fermentace masných nebo mléčných výrobků. Jako startéry mohou být použity nejenom bakterie a i koaguláza-negativní stafylokoky, stejně jako kvasinky a plísně (Laranjo et al. 2019).

Laktobacilli se již dlouho používají k výrobě mléčných výrobků jako je sýr a jogurt. Díky své přirozeně vysoké toleranci k nízkému pH se používají k fermentaci potravin jako je hořčice, zelí a olivy, které přispívají k jejich lepšímu trávení (Goldstein et al., 2015). *Lacticaseibacillus casei*, štěpící amylázu, se podílí na výrobě a zrání sýru čedar a je dominantním druhem v přirozeném kvašení sicilských zelených oliv. *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum* a *Lentilactobacillus parabuchneri* jsou tři heterofermentativní druhy, které se využívají hlavně pro formování chuti a textury u tvrdých sýrů během jejich zrání. *L. parabuchneri* je také často využíván v pečivářském průmyslu pro fermentování těsta. Mezi bakterie kyslových kultur patří: *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. K výrobě hlavně jogurtu se využívá *Lactobacillus bulgaricus*, který byl v roce 1984 překlasifikován na *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Vyskytuje se také v jiných přirozeně fermentovaných mléčných produktech a používá se ke konzervování mléka. Produkuje bakteriociny (Sedláček, 2007; Goldstein et al., 2015). V potravinářském průmyslu se bakteriociny používají jako přírodní konzervační látky (Zacharof and Lowitt, 2012). K nejvíce používaným druhům v masném průmyslu patří *Lactiplantibacillus plantarum*, *Latilactobacillus curvatus* a *Latilactobacillus sakei*, hlavně kvůli jejich schopnosti rychlého kvašení sacharidů

přidaných do masových směsí, ve kterých je důležitý rychlý pokles pH pro zastavení nežádoucích změn. Také výše uvedené druhy vytvářejí v masných produktech potřebné podmínky pro formování konečných sensorických vlastností produktů (Essid et al., 2009).

Ve vinařství se hojně využívají kmeny *Levilactobacillus brevis* a *Lactiplantibacillus plantarum*, které ve víně způsobují zvýšenou tvorbu žádoucích těkavých kyselin a podílejí se na vylepšení sensorického profilu vín (Šilhánková 2002). Určité heterofermentativní druhy (*Limosilactobacillus fermentum*, *Lentilactobacillus buchneri*) se vyskytují jako nežádoucí kontaminace ve vinařství a pivovarnictví, kde způsobují chuťové vady výrobků.

3.1.5 *Lactobacillus* jako probiotika

Probiotika jsou definovaná světovou zdravotnickou organizací (angl. WHO - World Health Organization) jako „živé mikroorganismy, které při podání v dostatečném množství přinášejí hostiteli zdravotní výhody“ (Mahasneh et al. 2017; Bosch et al., 2011). Probiotika jsou živé bakteriální buňky, které mají významný terapeutický potenciál pro léčbu a prevenci lidských infekčních onemocnění (Mishra et al., 2020; Lise et al., 2018; Toedter Williams, 2010). Probiotické bakterie jsou bakterie přirozeně se vyskytující v lidském organismu nebo jim podobné (Bizzini et al., 2012). Mikroorganismy využívané jako probiotika musí splňovat řadu parametrů, týkající se jejich bezpečnosti a technologických vlastností. Bakterie nesmí být patogenní, karcinogenní a musí mít klinicky prokázané pozitivní zdravotní účinky. Navíc mikroorganismy využívané jako probiotika musí prokazovat maximální životaschopnost po celou dobu skladování a schopnost kolonizovat intestinální trakt (Toedter Williams, 2010).

Jako probiotikum se nejčastěji používají rody *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Mezi nejvýznamnější druhy patří: *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus* a *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Mishra et al., 2020).

Probiotická terapie se používá ke zvýšení odolnosti vůči chorobám, k prevenci onemocnění střev a urogenitálních infekcí, ke snížení intolerance laktózy, snížení sérového cholesterolu a k zvýšení tolerance při chemoterapii rakoviny (Bosch et al., 2011; Mishra et al.,

2020). V současné době jsou probiotika hojně používána při léčbě mnoha orálních / zubních poruch. Probiotické bakterie patřící do rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* se používají jako účinné při prevenci zubního kazu snížením počtu kariogenních bakterií ve slinách krátce po konzumaci probiotika (Bizzini et al., 2012). Nedávné studie přinesly pozitivní výsledky v účincích probiotik, zejména *Lacticaseibacillus rhamnosus* na podporu bariérní funkce pokožky (Jung et al., 2018). Ve studiích atopické dermatitidy bylo zjištěno, že *Lacticaseibacillus paracasei* přispívá ke zvýšení rychlosti obnovy ochranné bariéry pokožky (Lise et al., 2018). Účinek probiotik je hlavně dán jejich přirozenou schopností k produkci bakteriocinů – látek, které inhibují růst a množení ostatních mikroorganismů (Mishra et al., 2020; Lise et al., 2018).

Probiotika jsou obecně považována za bezpečná, ale u imunologicky citlivé části populace je nutná opatrnost. Systematický přehled 387 studií, provedených Agenturou pro výzkum a kvalitu zdravotní péče (Agency for Healthcare Research and Quality) s celkovým počtem účastníků 24 615, nezjistil významný nárůst počtu nežádoucích účinků u jedinců léčených probiotiky v krátkodobé periodě (méně než jeden měsíc). Dlouhodobé účinky probiotik jsou do značné míry neznámé a vyžadují další randomizované studie (Wilkins and Sequoia, 2017).

3.1.6 Lidské infekce spojené s patogenními druhy *Lactobacillus*

Lactobacily jsou součástí normální lidské mikrobioty, ale i přesto některé druhy byly izolované z různých lidských infekcí (Tab.3) (Goldstein et al., 2015).

Tabulka 3: Druhy *Lactobacillus*, podílející se na infekcích

Druh infekce	Druh <i>Lactobacillus</i>, podílející se na infekcích
Bakteriémie	<i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> <i>Lacticaseibacillus casei</i> <i>Ligilactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>

Akutní cholecystitida	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Zubní absces / kaz	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lacticaseibacillus casei/paracasei</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Empyém	<i>Lactobacillus species</i>
Endokarditida	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lacticaseibacillus casei/paracasei</i> <i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
Meningitida	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Zánět pobříšnice	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
Periprotetická infekce	<i>Lactobacillus species</i>
Akutní pyelonefritida	<i>Lactobacillus jensenii</i>

Lactobacillus acidophilus je součástí normální ústní flóry, gastrointestinálního traktu a vaginy. Za normálních okolností je tento druh nepatogenní, avšak je uváděn jako původce endokarditid, endometritid, abscesů, pleuropulmonárních infekcí a bakteriemií. S těmito infekcemi jsou spojovány i jiné druhy laktobacilů (Votava a kol., 2003).

3.2 Charakteristika vybraných druhů *Lactobacillus*, využívaných pro výrobu funkčních potravin

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) definuje, že funkční potraviny jsou takové, které mají kromě běžných výživových účinků i prokazatelně příznivý vliv na jednu nebo více tělesných funkcí, na zdravotní stav nebo snížení rizika onemocnění.

Díky použití probiotických bakterií jako „potravinářských přídatných látek“ došlo v posledních letech k obrovskému růstu odvětví funkčních potravin. Využití probiotických bakterií v potravinách představuje řadu výzev souvisejících s jejich růstem, přežitím, životaschopností,

stabilitou a funkčností při zpracování, skladování a konzumaci potravin, jakož i se změnami senzorických charakteristik probiotických potravin (Min et al., 2019).

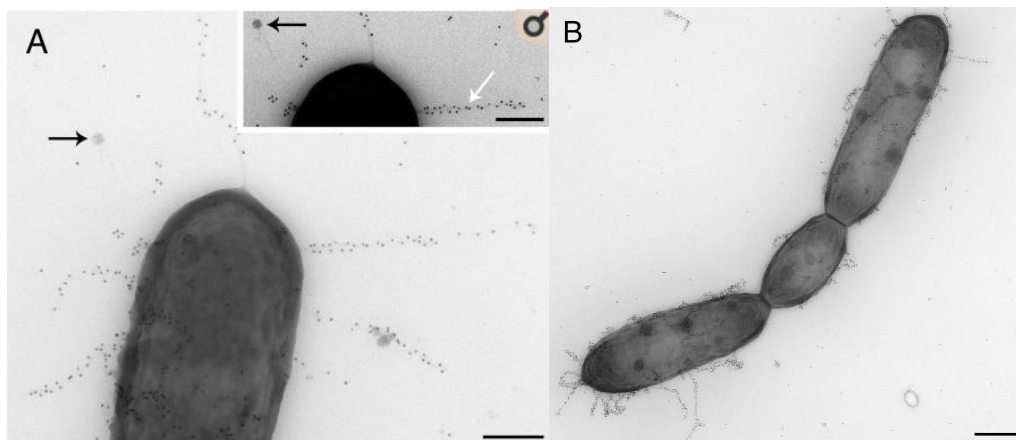
3.2.1 *Lactobacillus acidophilus*

Homofermentativní laktobacily, grampozitivní tyčinky o velikosti přibližně 2–10 μm (Anjum et al., 2014). Hlavními produkty fermentace jsou: kyselina mléčná, octová a H_2O_2 . Jsou součástí přírodní gastrointestinální a urogenitální mikrobioty savců a ptáků. Doprovázejí člověka od narození po celý život a plní celou řadu užitečných funkcí, z nichž hlavní je aktivní účast v obranném systému hostitele před škodlivým působením nežádoucích mikroorganismů (prevence růstu patogenních bakterií a udržování populací oportunistických mikrobů na bezpečné úrovni). Právě těmito vlastnostmi *L. acidophilus* se vysvětluje jejich široké praktické použití v různých probiotických produktech, přípravcích pro dietní, lékařské a zemědělské účely. Přesto, že je druh *L. acidophilus* už docela známý a účelně používaný po dlouhou dobu, stále má velký potenciál pro výzkum. Použití genově-molekulárních přístupů umožnilo objasnit systematické postavení *L. acidophilus* v rodině laktobacilů a identifikovat skupinu blízké příbuzných druhů, často nerozeznatelných tradičními fyziologickými a biochemickými identifikačními metodami. Dnes se úsilí vědců zaměřuje na objasnění molekulárních mechanismů, kterými antagonistické aktivní kmeny *L. acidophilus* provádějí baktericidní účinek na škodlivé mikroby. Zveřejnění těchto mechanismů umožní nejen účinnější výběr a použití kmenů *L. acidophilus*, ale také vytvoří novou třídu antibiotik, která jsou účinnější a mají méně vedlejších účinků než stávající (Irkítova and Matsyura, 2017).

V současné době je velký zájem o přidání různých probiotických mikroorganismů do potravin, aby se zvýšil jejich potenciál a zdravotní výhody. K tomuto účelu se hojně používají mikroorganismy patřící k druhu *L. acidophilus*, o němž se předpokládá, že má různé příznivé účinky na zdraví lidí (Saxelin et al., 2005). Některé z těchto přínosů jsou snížení hladiny cholesterolu v krvi, snížení rizika mutagenity a karcinogenity a snížení rizika zácpy, průjmu a intolerance laktózy. *L. acidophilus* se používá v řadě fermentovaných produktů. Nejběžnější jsou jogurty a sladké acidofilní mléko. Používají se v různých druzích sýrů, a to jak na experimentální, tak na průmyslové úrovni (sýr čedar, čerstvý sýr minas, bílé měkké sýry a sýr Gouda) (Anjum et al., 2014).

3.2.2 *Lacticaseibacillus rhamnosus*

Lacticaseibacillus rhamnosus jsou grampozitivní tyčinky, běžné izolované z fermentovaných potravin, gastrointestinálního a vaginálního traktu lidí a zvířat. *L. rhamnosus* má prokázané prospěšné účinky na lidský organismus jako je udržování střevního zdraví, prevence infekcí vyvolaných patogenními bakteriemi (např. *Escherichia coli* O157 nebo *Salmonella* spp.). Bylo také prokázáno, že *L. rhamnosus* je schopen ovlivňovat i imunitní systém a snižovat rozvoj alergií u dětí (Okai et al., 2019). V některých studiích se ukazuje vliv *L. rhamnosus* na vzestup specifického IgA proti rotavirům. Dvě meta-analýzy potvrdily, že jeho podávání dětem s průjmovým onemocněním vede ke snížení doby trvání průjmu (Kokešová, 2009). Některé kmeny *Lacticaseibacillus rhamnosus* prokazují preventivní nebo terapeutický účinek na onemocnění nekrotizující enterokolitidy u dětí (Dragounová a Šalaková, 2014).

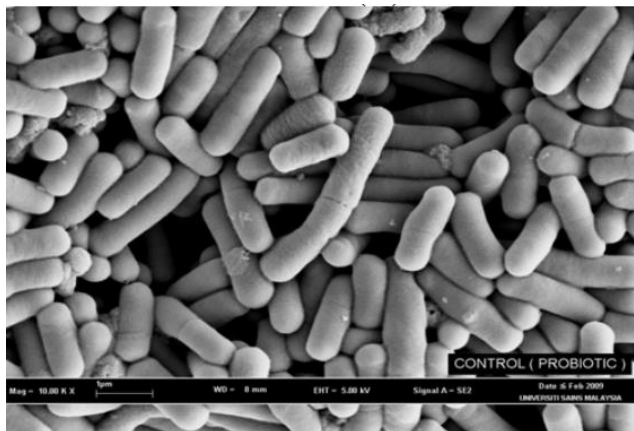


Obrázek 1. A *Lacticaseibacillus rhamnosus* se znázorněnými fimbrií (bílá šipka) 200 nm. B *Lacticaseibacillus rhamnosus* 500nm. Záznam z elektronového mikroskopu (Kankainen et al., 2009).

Lacticaseibacillus rhamnosus se široce používá při výrobě fermentovaných mléčných výrobků a jiných fermentovaných potravin. *L. rhamnosus* má výhody odolávání nízkým hodnotám pH a má vynikající skladovatelnost. Daný kmen je také schopen syntézy acetoinu a diacetylu (Sun et al., 2019), což jsou aromatické sloučeniny v másle aj. fermentovaných produktů, které se hojně používají v mlékárenském průmyslu (Liu et al., 2020).

3.2.3 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lactobacillus bulgaricus je anaerobní až aerobní homofermentativní bakterie mléčného kvašení s průmyslovým významem používaná při velkém počtu fermentací potravinářských výrobků po celém světě. Vyskytuje se ve velkých, dlouhých tyčinkovitých formách, jednotlivě nebo v krátkých řetězcích.



Obrázek 2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Zaznam z elektronového mikroskopu (100 mM) (Ooi and Liang, 2010).

Buňky jsou nepohyblivé. Rostou na půdách s obsahem mléka, syrovátky nebo sladu (Teixeira, 2014). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* spolu se *Streptococcus thermophilus* se běžně využívají ve výrobě jogurtů. Daný kmen podporuje vstřebávání potřebných živin a brání rozmnožování patogenních bakterií (Gong et al., 2020). Navíc některé studie prokázaly, že *L. bulgaricus* přispívá ke zvýšení hladiny IgA ve slinách, a že orální podávání *L. bulgaricus* může zvýšit titry protilátek proti chřipce (Yamamoto et al., 2019).

3.2.4 *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus helveticus je tvořen krátkými až dlouhými grampozitivními tyčinkami. Tvoří kyselinu mléčnou, rozkládá bílkoviny až na aminokyseliny a tím přispívá k inhibici patogenních mikroorganismů v trávicím traktu. *Lactobacillus helveticus* izolovaný z lidských střev vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči alimentárním patogenům, kdy v průběhu mléčného kvašení uvolňuje peptidy s prokázanými protizánětlivými vlastnostmi. Bylo zjištěno, že kmen BGRA43 vykazuje antimikrobiální aktivitu proti lidským patogenům *Yersinia enterocolitica*,

Shigella sonnei, *Shigella flexneri* a *Streptococcus pneumoniae*. Kmen je schopen přežít podmínky simulované žaludeční šťávy a je stabilní také v simulovaných střevních podmínkách (Dragounová a Šalaková, 2014). Důležitými jsou také výsledky klinických studií, ve kterých bylo prokázáno, že *Lactobacillus helveticus* R0052 a *Bifidobacterium longum* R0175 snižovaly gastrointestinální diskomfort vyvolaný stresem. Objevující se důkazy o roli střevní mikrobioty na funkcích centrálního nervového systému proto naznačují, že perorální příjem probiotik může mít příznivé důsledky pro náladu a psychické potíže (Messaoudi et al., 2011).

Lactobacillus helveticus je kulturou často používanou pro výrobu sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou. Původně byl tento druh izolován se sýru typu ementál. Kromě sýrů švýcarského typu jsou kmeny patřící k tomuto druhu přítomné v přírodních syrovátkových italských dlouhozrajících sýrech (např. Parmigiano Reggiano a Grana Padano) (Fontana et al., 2019).

3.2.5 *Limosilactobacillus fermentum*

Limosilactobacillus fermentum jako kmen s probiotickými vlastnostmi přispívá k zvýšení odolnosti organismu proti gastrointestinálním infekcím a infekcím horních cest dýchacích, podporuje imunitu a zvyšuje imunologickou odpověď (Naghmouchi et al., 2020). Některé druhy *L. fermentum* inhibují patogeny pomocí své schopnosti k produkci bakteriocinů a antifungálních metabolitů (Brandt et al., 2020). Danou schopnost kmenů lze využít jako konzervační faktor nebo jako alternativu k antibiotikům. Další funkce přisuzované probiotickým kmenům *L. fermentum* jsou jejich schopnosti snižovat hladinu cholesterolu v krvi a potenciálně pomáhat předcházet kolorektálnímu karcinomu u lidí (Naghmouchi et al., 2020). Navíc u některých vybraných kmenů byly prokázány i antioxidační vlastnosti a antimikrobiální schopnosti proti grampozitivním organismům, *Enterococcus* a *Staphylococcus aureus* (Brandt et al., 2020).

Limosilactobacillus fermentum je běžně zodpovědný za fermentaci a znehodnocení ovocných šťáv (Ephrem et al. 2019), podílí se na kontaminaci a kažení piva. Bakterie mléčného kvašení, zvláště rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*, jsou považovány za nejvíce škodlivé. Nicméně se využívají v pivovarském průmyslu pro okyselování rmutu a sladiny (Matoulková a Kubizniaková, 2015). Nakonec *L. fermentum* je klíčovým mikroorganismem v technologii výroby kvásku, který přispívá k chuti a struktuře těsta, a v poslední době se používá i k

obohacení a vývoji funkčních potravin s prospěšnými vlastnostmi pro lidské zdraví (Naghmouchi et al., 2020).

3.2.6 *Lacticaseibacillus casei*

Lacticaseibacillus casei je dobře známý druh grampozitivních bakterií s probiotickými vlastnostmi pro člověka a zvířata, které mohou udržovat homeostázu intestinální mikrobioty, inhibovat růst patogenů a regulovat pH v gastrointestinálním prostředí hostitele (Zhou et al. 2018).

Fylogenetická skupina *Lacticaseibacillus casei* je složená z blízce příbuzných druhů *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* a *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Tyto tři druhy byly rozsáhle studovány, klasifikovány a překlasifikovány kvůli jejich vlastnostem podporujícím zdraví. Diferenciace je často obtížná konvenčními fenotypovými a genotypovými metodami, a proto se neustále vyvíjejí nové metody pro rozlišení tří blízce příbuzných druhů. Tato skupina zůstává předmětem zájmu jako probiotika a jejich použití je v průmyslu velmi rozšířené (Hill et al. 2018).

Problémy s intolerancí laktózy a zvýšený zájem o vegetariánství podpořily uvedení nemléčných fermentovaných potravin na trh. Jednou z výhod *L. casei* je její schopnost k vysoké životaschopnosti v džusech. Podle řady studií džusy fermentované *L. casei* jsou potenciálně funkční nápoje (Marhaida Mustafa et al. 2019; Liu et al. 2018).

Jako součást startovacích kultur při výrobě fermentovaných masných výrobků se *L. casei* přidává pro snížení koncentrací biogenních aminů (*L. casei* netvoří biogenní aminy a zároveň jsou schopny potlačovat růst přirozené mikroflóry s dekarboxylázovou aktivitou). (Burdychová 2009).

Jak je již známo, kmeny druhu *Lacticaseibacillus casei* jsou tradičně a nejvíce využívány pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků. Studie provedená Kato-Kataoka (2016) za účelem zkoumání účinků probiotického kmene *Lacticaseibacillus casei* Shirota na břišní dysfunkci prokázala, že denní konzumace probiotik na bázi kmene *Lacticaseibacillus casei* Shirota, zachovává rozmanitost střevní mikrobioty a může zmírnit stresové reakce břišní dysfunkce u zdravých subjektů vystavených stresovým situacím (Kato-Kataoka et al., 2016).

3.3 Metody využívané při identifikaci a klasifikaci laktobacilů

3.3.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) je metoda molekulární biologie, která je založena na *in vitro* selektivním namnožení (amplifikaci) specifických úseků nukleové kyseliny (DNA). Základní jednotkou polymerázové řetězové reakce je jeden cyklus, sestávající ze tří kroků: denaturační fáze; ‚annealingová‘ (tzv. specifické nasednutí primerů) fáze a elongační fáze. Během PCR se tento základní cyklus mnohokrát opakuje (nejčastěji se počet opakování pohybuje v rozmezí 25–45 cyklů) (Vlková a Rada, 2013). Pomocí PCR amplifikace je možné produkovat přibližně 100 miliard kopií jedné molekuly DNA během několika hodin (Šmarda, 2005). PCR se v mikrobiologii používá hlavně k prokázání mikrobiální DNA ve vyšetřovaném vzorku. Její největší výhodou je rychlost a schopnost prokazovat i nekultivovatelné mikroby (Votava et al., 2000). Kromě identifikace a detekce bakterií umožňuje syntézu fragmentů DNA do vektoru, prenatalní diagnostiku dědičných chorob, sekvencování DNA atd. (Vlková a Rada, 2013).

Směs pro PCR obsahuje následující složky: templátová DNA (vzorek): obsahuje cílovou sekvenci, dvojici primerů (oligonukleotidy o délce 18–28 nukleotidů), DNA polymerázu (enzym zajišťující syntézu komplementárního vlákna DNA přidáváním nukleotidů na 3' konec nově vznikajícího řetězce), jednotlivé nukleotidy, pufr (vytváří stálé a optimální prostředí) (Šmarda, 2005; Vlková a Rada, 2013).

Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy přidávanými do směsi. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky:

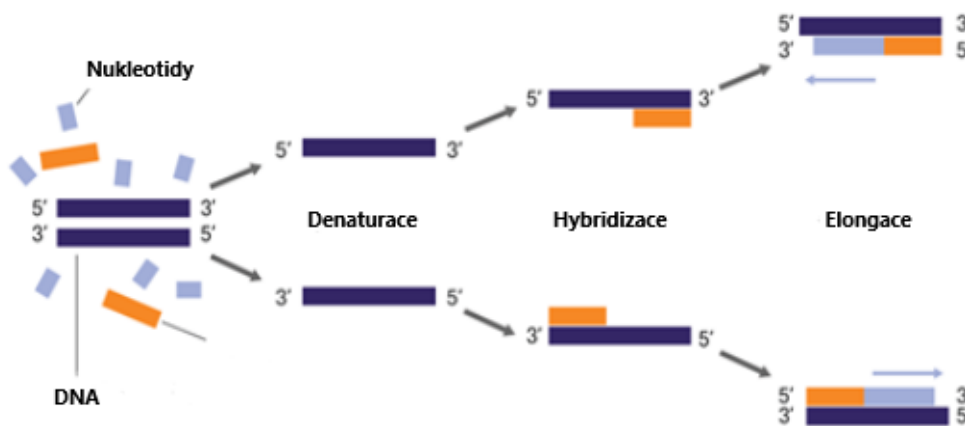
Denaturace začíná tepelnou denaturací vzorku DNA. V tomto kroku se vzorek zahřívá na teplotu 95 °C, čímž se dsDNA rozdělí na ssDNA (jednovláknovou DNA).

Hybridizace (‘annealing’) probíhá při teplotách 40–72 °C (v závislosti na délce a sekvenci primerů). V daném kroku molekuly jednořetězcové DNA po ochlazení opět renaturují. Nasedání primerů na vlákno DNA je založeno na principu komplementarity dusíkatých bází, a přidané

specifické oligonukleotidy ve vyšších koncentracích budou hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji, než dlouhé jednořetězcové molekuly.

Elongace (extenze). Používá se teplota kolem 72 °C, což je optimum pro působení *Taq* DNA polymerázy, která zajišťuje syntézu nového komplementárního vlákna DNA. Dochází k elongaci DNA vlákna, během které DNA polymeráza přisyntetizovává k 3'OH konci primeru nukleotidy, které se vážou na nový řetězec podle komplementární sekvence templátu (Jurečková, 2008; Králová et al. 2001).

Opakováním uvedených tří kroků vznikají nová vlákna, která následně rovněž slouží jako templát pro další syntézu. Tímto procesem lze exponenciálně (2^n , n – počet cyklů) syntetizovat až 10^9 kopií vybraného úseku DNA (Šmarda, 2005; Králová et al. 2001). Průběh reakce PCR je uveden na obrázku 3 (Goldberg, 2019).



Obrázek 3. Průběh reakce PCR (upraveno podle Goldberg, 2019)

Produktem PCR jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle stovek až tisíců párů bází. Vzniklé amplikony se separují elektroforeticky (většinou na agarózovém gelu) podle jejich velikosti, resp. molekulové hmotnosti. Současně s PCR produktem se ponechá migrovat DNA standard (tzv. DNA marker), který obsahuje fragmenty o známé velikosti, a na základě jejich porovnání je možné určit velikost amplikonu. Pro vizualizaci jsou vzniklé fragmenty obarveny barvivou (nejčastěji ethidium bromidem), které při začlenění ve dvouvláknových strukturách a ozáření UV paprsky intenzivně fluoreskují (Šmarda, 2005; Ruml

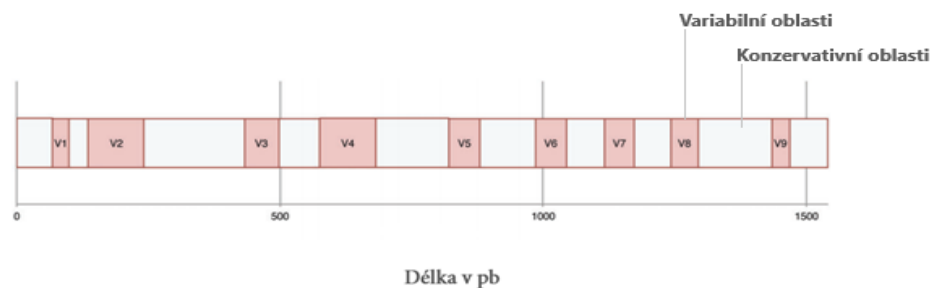
et al., 2002). Podle intenzity fluorescence jednotlivých, amplifikovaných fragmentů DNA na gelu je odhadována koncentrace produktů PCR (Šmarda, 2005).

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektrické pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Velké biomolekuly (např. DNA) mohou mít podobnou elektroforetickou pohyblivost, protože mají velmi blízký poměr náboje k hmotnosti. V tomto případě se separace provádí v gelu. Gelová elektroforéza využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu (Klouda, 2016).

3.3.2 16S rRNA genová sekvence

Sekvenování genu 16S ribozomální RNA (rRNA) už desítky let slouží jako metoda pro stanovení fylogenetických vztahů mezi prokaryotickými mikroorganismy (Janda and Abbott, 2007). Celá fylogenetika je založena na nepřímých důkazech zprostředkovaných analýzou sekvencí genů, které vyjadřují rychlost genetické změny v závislosti na čase (Pace, 1997). Gen kódující 16S rRNA se používá jako standard pro klasifikaci a identifikaci bakterií, protože je přítomný ve všech prokaryotních mikroorganismech a dobře zobrazuje případné rozdíly v nukleotidové sekvenci tohoto genu.

16S rRNA je součástí 30S malé podjednotky ribozomů prokaryot (Janda and Abbott, 2007). Obsahuje jednak konzervativní oblasti, na které lze navrhnout primery, jednak variabilní oblasti (obr.4) umožňující rozlišení bakterií a určení jejich diverzity ve vzorku. (Klingworth et al., 2013; Vos et al., 2012). Celkově obsahuje devět variabilních oblastí (označují se V₁-V₉), které tvoří 4 domény (Noller and Woese, 1981; Brosius et al., 1978).



Obrázek 4: Schéma znázorňující variabilní oblasti genu pro 16S rRNA (upraveno podle Cox et al., 2013)

Sekvence variabilních fragmentů v 16S rRNA lze použít pro odlišení příbuzných druhů (Janda and Abbott, 2007).

Díky pokroku v oblasti sekvenačních metod a polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožnila jednoduše amplifikovat geny 16S rRNA a 23S rRNA, došlo k rozvoji fylogenetických studií. Dřívější metody byly obvykle založené na kompletním sekvenování genu pro 16S rRNA, ale jejich schopnost byla omezena rozlišovací schopností dostupných sekvenačních metod. S rozvojem masivně paralelních sekvenačních technologií bylo možné získat sekvence genu pro 16S rRNA ve velkém rozlišení.

Obecně přijatá hraniční hodnota pro vymezení druhů byla dlouhou dobu hranice 97 % (Rossello-Mora, 2012). V současné době se předpokládá, že dva kmeny jsou členy stejného druhu, pokud je jejich sekvenční podobnost genu pro 16S rRNA je větší než 98,7 % (Stackebrandt and Ebers, 2006).

3.3.2.1 Výhody a nevýhody 16S rRNA genové sekvence

Gen pro 16S rRNA je už dávno zlatým standardem v průzkumech bakteriální a archeální rozmanitosti. Tento marker je všeobecně přítomen a má tu výhodu, že obsahuje jak stálé, konzervativní oblasti, což usnadňuje návrh primerů, tak i variabilní oblasti, které umožňují rozlišení různých mikrobiálních taxonů (Janda and Abbott, 2007; Vos et al., 2012). K výhodám však patří i to, že pro tento marker byly sestaveny vyčerpávající referenční databáze: databáze Greengenes, Ribosomal Database Project (RDP) a SILVA (Ogier et al., 2019).

Gen 16S rRNA však není bez potenciálních nevýhod. Několik nedávných studií ukazuje, že délka čtení sekvence spolu se specifickou kombinací párů primerů použitých pro sekvenování ampliconů s krátkým čtením může podstatně ovlivnit přesnost a citlivost taxonomické rozlišnosti i odhadů četnosti taxonů. Proto je pro další generaci vysoce výkonných sekvenčních technologií vyžadována vysoká přesnost a adekvátní délka čtení pokrývající celou 16S rRNA oblast (Woong Whon et al., 2019). Zde také stojí za zmínku, že taxonomické rozlišení v sekvenování ampliconů může být ovlivněno několika dalšími faktory, včetně specifity primerů, volby hypervariabilní oblasti, referenční databáze a zdroje prostředí (Stackebrandt and Ebers, 2006; Ogier et al., 2019; Woong Whon et al., 2019). Odhady mikrobiální diverzity jsou obecně ovlivněny proměnlivým počtem a sekvenční heterogenitou 16S rRNA operonů u bakteriálních druhů, což obecně vede k nadhodnocení druhové rozmanitosti (Ogier et al., 2019). Další nevýhodou použití 16S rRNA je také možnost a vliv horizontálního přenosu genů, který může narušit vztahy mezi taxony fylogenetických stromů (Mekadim et al., 2018).

Závažnou nevýhodou, která omezuje použití genu 16S rRNA, je jeho slabá rozlišovací schopnost u určitých taxonomických jednotek (Vos et al., 2012). V takových případech je zapotřebí k sekvenci získat další údaje pro spolehlivý taxonomický popis, protože i kompletní sekvence 16S rRNA může být nedostačující pro korektní výsledky. S ohledem na tyto hlavní nevýhody je třeba hledat alternativní nebo alespoň doplňkové taxonomické markery (Stackebrandt and Ebers, 2006; Ogier et al., 2019; Mekadim et al., 2018).

3.3.3 Real-time PCR (qPCR)

Na rozdíl od klasické PCR reakce, při provedení real-time PCR, neboli qPCR, detekce vznikajících produktů probíhá v reálném čase, v průběhu všech cyklů, nikoliv na konci reakce (Matsuda, 2017). Při stanovení PCR produktů se využívá sledování fluorescenčního signálu. Jeho intenzita je permanentně snímána a analyzována speciálním přístrojem, ve kterém zároveň probíhá PCR, tudíž se amplicony nemusí detekovat elektroforeticky (Bursova et al., 2014). Princip detekce je tedy založen na záznamu síly fluorescenčního signálu. Jako fluorescenční marker se používají specifické (fluorescenčně značené sekvence nukleotidů komplementární k hledanému úseku) nebo nespecifické sondy (váže se nespecificky do dvouřetězcové DNA) (Green and Sambrook, 2018). Hybridizací mezi hledaným úsekem nukleové kyseliny stanovované bakterie a sondou, která je následně štěpena polymerázou během elongace řetězce, dochází k nárůstu fluorescence. Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci produktu

přítomného v reakční směsi (Gadkar and Filion, 2014; Green and Sambrook, 2018). Cyklus, ve kterém je již měřitelný nárůst fluorescence ve vzorku, se označuje jako prahový cyklus (Ct – threshold cycle). Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek, vzniklých vnesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu (Rebrikov et al., 2015).

Typickou amplifikační křivku lze rozdělit na 3 části: (Van Guilder et al., 2008)

- 1) „background“ fázi kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot;
- 2) exponenciální fázi, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4-8 cyklů)
- 3) fázi plató, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní (Valihrač and Demnerova, 2012).

Fluorescenční látky lze rozdělit do tři skupin: (Van Guilder et al., 2008; Šmarda 2005).

1. Fluorescenčně značené sondy – jsou to oligonukleotidové sondy komplementární k jednomu z řetězců templátové DNA v místě mezi oběma primery, které mají vyšší hodnotou teploty tání (T_m) asi o 10 °C než je teplota tání primerů.
2. Fluorescenčně značené primery – jsou to primery s vlásenkovou strukturou. Fungují na podobném principu jako sondy. K výrazné emisi dochází až při narušení struktury primeru během syntézy DNA u specifických produktů.
3. Interkalační barviva – fluorescenční barviva, samostatně v PCR směsi emitují záření zanedbatelně, po začlenění do nově vzniklé dvoušroubovice DNA dochází k výraznému nárůstu fluorescence, která je přímo úměrná koncentraci produktu PCR. Měření intenzity signálu probíhá na konci fáze elongace nebo průběžně (Rebrikov et al., 2015).

3.3.3.1 *Výhody a nevýhody metody*

PCR v reálném čase získala široké přijetí oproti klasické PCR hlavně díky své rychlosti, vyšší citlivosti, reprodukovatelnosti a sníženým rizikem kontaminace přenosem (Mackay et al., 2002; Mackay, 2004). Metoda je využitelná pro široké spektrum mikroorganismů a je možné analyzovat velký počet vzorků v jednom kroku (Van Guilder et al., 2008). Dnes se PCR v reálném čase používá k detekci nukleových kyselin z potravin, vektorů používaných v protokolech genové terapie, u geneticky modifikovaných organismů a v oblasti lidské a veterinární mikrobiologie a onkologie (Mackay, 2004). Metoda je výhodná i tím, že celý proces

je automatizovaný v jediné uzavřené zkumavce, což minimalizuje rizika kontaminace (Turaki et al., 2017).

Přesto má PCR některá významná omezení. Schopnost navrhovat oligonukleotidové primery se rozšiřuje pouze na základě znalosti genomu mikroorganismu, stejně jako na možnosti veřejně dostupných sekvenčních databází korektně reprezentovat všechny varianty konkrétního mikroorganismu. Běžné také je, že mikrobiální genomy obsahují neočekávané mutace, které snižují nebo narušují funkci PCR. Falešně pozitivní výsledky v důsledku kontaminace přenosem tradičně způsobovaly značné problémy při rutinní implementaci PCR v diagnostické laboratoři. Navíc může být PCR pro některé aplikace příliš citlivá, protože detekuje mikroorganismus, který je přítomen na nepatogenních úrovních (Mackay, 2004). Vysoké pořizovací náklady, důraz na čistotu vzorků a opakovatelnost procesu také patří spíše k nedostatkům metody (Van Guilder et al., 2008).

3.3.4 DNA-DNA hybridizace (DDH)

Techniky DNA-DNA hybridizace jsou hojně využívány pro určení příbuznosti mezi kmeny, proto patří k základním technikám taxonomických výzkumů (Goris et al., 2007). DNA-DNA hybridizace (DDH) je stále považována za nejdůležitější metodu pro vymezení druhů (Mehlen et al., 2004). DDH se začala využívat již v 60 letech 20. století pro stanovení příbuznosti mezi bakteriemi, avšak pro účely klasifikace byla přijata až o více než 20 let později (Goris et al., 2007; Sentausa and Fournier, 2013).

Princip DDH spočívá v komplementaritě jednořetězcových molekul DNA: zkoumané DNA mikroorganismu a DNA sondy. Metoda vyžaduje nejdříve denaturaci dvoušroubovicové DNA (double-stranded, dsDNA) s následným vznikem jednořetězcové DNA (single-stranded, ssDNA). Značená DNA sonda je hybridizovaná s neznačenou DNA téhož druhu i s DNA srovnávaného druhu.

Následná reasociace, za určitých podmínek, přivádí ke vzniku hybridní DNA komplementární k templátovému vláknu DNA (Brenner et al., 1967). Tyto hybridní DNA vznikají tím hůře, čím větší jsou rozdíly mezi jejich DNA. Obecně přijatá hodnota pro vymezení druhu je hodnota DDH ≥ 70 %. (Goris et al., 2007; Mehlen et al., 2004; Gevers et al., 2005; Konstantinidis and Tiedje, 2007).

DNA sonda je značený fragment DNA, používaný k hybridizaci se specifickou oblastí molekuly DNA. Umožňuje identifikaci komplementární nukleotidové sekvence. Pro značení sondy se většinou používaly radioaktivní izotopy nebo látky, projevující se během následné enzymatické reakce (např. značení biotinem) (Muller, 2008). Při neradioaktivním značení jsou sondy detekovány pomocí protilátky s navázanou, např. alkalickou, fosfatázou. Alkalická fosfatáza reaguje s přidaným substrátem s výslednou kolorimetrickou či chemiluminiscenční reakcí. V porovnání s radioaktivním značením je neradioaktivní značení nepopíratelně výhodnější co do bezpečnosti a stability, ale na druhou stranu je mnohem méně citlivé. V současné době jsou většinou využívány sondy určené pro optickou detekci (chromofory) (Glick et al., 2010).

3.3.4.1 DNA-DNA hybridizace – výhody a nevýhody metody

Hlavní výhodou DNA-DNA hybridizace je především její univerzalita a relativně nízké náklady při porovnání celého genomu (Tindall et al., 2010). DDH je i dodnes považována za ‚zlatý standard‘ pro vymezení druhu, i přesto, že její prahovou hodnotu podobnosti $\geq 70\%$ nelze použít pro všechny prokaryotické rody. Výhodou ale je, že hodnoty DDH korelují s hodnotami podobnosti genu pro 16S rRNA (kmeny nepatří do stejného druhu, pokud je jejich DDH podobnost nižší než 70 % což je shodné s hodnotou 98,7 % podobnosti genu pro 16S rRNA) (Goris et al., 2007).

Jak již bylo naznačeno, jednou z nevýhod metody je, že prahovou hranici 70 % podobnosti nelze použít pro všechny prokaryotické rody. Například není použitelná pro další druhy rodu *Rickettsia*: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia sibirica* a *Rickettsia montanensis*. Příčinou je nedostačující rozlišení mezi blízkce příbuznými druhy (Maiden et al., 1998).

Nicméně DDH je časově náročná metoda a není vhodná ani pro rychlou identifikaci prokaryot. Rovněž není vhodná pro klasifikaci prokaryot, které jsou v současné době nekultivovatelné, a to je většina prokaryot vyskytujících se v biosféře. Ještě důležitější je, že klasifikace pomocí DDH vyžaduje párové srovnání dvou prokaryotických genomů, že nelze analyzovat jednotlivé kmeny a porovnávat je s databází (Mackay, 2004). Limitujícím faktorem je také to, že DDH se provádí v případě, kdy taxon obsahuje více kmenů, aby byla možnost prokázat vysoký stupeň hybridizace taxonů mezi sebou navzájem (Maiden et al., 1998).

3.3.5 Multilokusová sekvenční analýza (MLSA)

MLSA (Multilocus sequence analysis) je metoda založená na sekvenování nukleotidových fragmentů protein kódujících genů. (Ruiz-Padilla et al., 2020; Feijao et al., 2018). Byla poprvé představena v roce 1998 jako metoda mikrobiální typizace (MLST) pro epidemiologické a populační genetické studie patogenních bakterií (Glaeser and Kampfer, 2015). Metoda multilokusové sekvenční analýzy (Multilocus sequence analysis, MLSA) je rozšířenou metodou MLST. Zaměřuje se na stanovení fylogenetických příbuzností mezi kmeny. Při MLSA se hlavně používají „housekeeping“ geny, které kódují proteiny a považují se za velice konzervativní geny s pomalým evolučním vývojem. Jsou to například geny: *proA* (gen kódující alfa-podjednotku RNA polymerázy, závislou na DNA), *pheS* (gen kódující alfa-podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázu), apod. (Vuyst and Vancanneyt, 2007). Běžně se provádí sekvenování sedmi intragenových fragmentů o velikosti 400–500 bp (Xu et al., 2019). Většinou se MLSA používá po sekvenci genu pro 16S RNA, pokud je potřeba vyšší rozlišovací schopnosti metodiky na úrovni druhu (Glaeser and Kampfer, 2015; Vuyst and Vancanneyt, 2007). V Každé genetické variantě v rámci sekvenovaného fragmentu jsou přiřazeny odlišné alely. Kombinace alel z každého lokusu reprezentuje sekvenční typ. Výsledné sekvence, díky kterým je každý ze studovaných izolátů schopen vytvořit unikátní alelický profil, jsou vzájemně porovnány, a jednotlivé izoláty jsou zařazeny do určitého taxonu (Brehony et al., 2007). Počet analyzovaných lokusů v každé konkrétní studii se může lišit, ale nejčastěji je to 7-8. Toto množství poskytuje dostatečné rozlišení a zároveň nevyžaduje příliš mnoho práce, času a financí na analýzu (Gevers et al., 2005; Maiden et al., 1998). Sekvenované fragmenty „housekeeping“ genů jsou často používané pro sestavení fylogenetických stromů.

Metoda však má i své nevýhody, zejména minimálně by mělo být vybráno a analyzováno pět všudypřítomných genů (stabilizační výběr), protože menší počet neodráží spolehlivě fylogenetické vztahy (Glaeser and Kampfer, 2015). Při klasifikaci pomocí MLSA použití univerzální sady genů je nepraktické, protože geny, které jsou informativní v rámci rodu nebo rodiny, nemusí být užitečné nebo dokonce přítomné ve vzdálenějších taxonech (Gevers et al., 2005).

Výhody MLSA spočívají v tom, že přístup, založený na analýze více než jednoho genu, poskytuje objektivní metodu pro rozlišení různých kmenů v rámci rodu. MLSA nebo MLST

mohou poskytnout vyšší rozlišení než u genu pro 16S rRNA. Proto se využívají jako doplňující analýzy při srovnání sekvence genu pro 16S rRNA nebo DDH (Glaeser and Kampf, 2015).

3.3.5.1 *Multilokusová sekvenční analýza – výhody a nevýhody metody*

Multilokusová sekvenční analýza je vysoce reprodukovatelná metoda a má velkou rozlišovací schopnost. Sekvence alel a profily sekvenčních typů jsou dostupné v mezinárodních databázích, které též obsahují software pro určení genetické příbuznosti mezi bakteriálními liniemi v rámci druhu (Aguilera et al., 2015; Kimura, 2017). Velká výhoda MLST spočívá v možnosti dobrého sdílení výsledků mezi laboratořemi a možnost využít a revidovat data kdykoliv v budoucnu (Čmoková et al., 2014; Feijao et al., 2018).

Mezi nevýhody metody patří vysoká cena, časová náročnost a pro některé patogeny nedostatečná diskriminační schopnost pro rutinní použití při vypuknutí epidemie a jejím sledování (Kimura, 2017). Problémem je také nutnost velmi kvalitních sekvencí (sekvenační chyby vytváří falešnou variabilitu) (Čmoková et al., 2014).

4 Materiál a metody

4.1 Sekvence vybraných genů z genomů určených pro návržení vhodných primerů

Pro splnění cílů práce jsme zvolili geny náležející do významné a nezastupitelné skupiny tzv. aminoacyl-tRNA syntetáz hrající zásadní roli při proteosyntéze (translaci), resp. gen *alaS* (kódující alanyl-tRNA syntetázu / alanin-tRNA ligázu) a *lysS* (kódující lysyl-tRNA syntetázu / lysin-tRNA ligázu).

4.1.1 Sekvence genu *alaS* (kódující alanyl-tRNA syntázu)

Níže jsou v Tabulce 4. vyplněny názvy a označení použitých bakteriálních kmenů, kódy genomů v NCBI databázi (National Centre for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=>), v nichž se nachází příslušný gen (*alaS*) a přesné umístění genu v genomu či jeho části (tzv. contigu). Ve mnoha případech musel být upraven rodový název (dřívější klasifikace uváděla „pouze“ rodové označení *Lactobacillus*) po reklasifikaci čeledi *Lactobacillaceae*, resp. řádu *Lactobacillales* podle fylogenomové studie Zheng et al. (2020).

Tabulka 4. Gen *alaS* umístěn v genomech určitých kmenů ř. *Lactobacillales*. ATCC – American Type Culture Collection (americká sbírka typových kultur).

Kmen	Identifikační kód genomu v NCBI	Pozice v genomu
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	NC006814.3	393331-395986
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	NC005362	519500-522148
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG	NC013198	779073-781718
<i>Lacticaseibacillus casei</i> BL23	NC010999	842586-845231
<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.1304	NC015978	c874530-871882
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPC 4571	NC010080	423205-425844
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 T-typový kmen	NC008054	c1380090-1377490
<i>Lactobacillus amylovorus</i> GRL 1112	NC014724	417141-419780
<i>Lactobacillus crispatus</i> ST1	NC014106	405216-407855
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> UCC118	NC007929	c1139615-1136973
<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	NC007576	394834-397521

<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ST-III	NC014554	c2026835-2024193
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323 T	NC008530	448954-451602
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 367	NC008497	c1194376-1191737
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	NC004668	1355993-1358635
<i>Enterococcus faecium</i> DO	NC017960	1324150-1326792
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 9790 T	NC018081	c2374080-2371438

4.1.2 Sekvence genu *lysS* (kódující lysyl-tRNA syntázu)

Stejně jako v předchozí kapitole, Tabulka 5. obsahuje názvy a označení použitých bakteriálních kmenů, kódy genomů v NCBI databázi (National Centre for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=>), v nichž se nachází příslušný gen (*lysS*) a přesné umístění genu v genomu či jeho části (tzv. contigu).

Tabulka 5. Gen *lysS* umístěn v genomech určitých kmenů ř. Lactobacillales. ATCC – American Type Culture Collection (americká sbírka typových kultur).

Kmen	Identifikační kód genomu v NCBI	Pozice v genomu
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> JCM 1112 T - typový	NC010609	c1383103-1380683
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	NC006814	c1621014-1618587
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	NC005362	567734-570148
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG	NC013198	856708-859119
<i>Lacticaseibacillus casei</i> ATCC 334	NC008526	859077-861488
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPC 4571	NC010080	c1687694-1685280
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 T- typový kmen	NC008054	c1350722-1348308
<i>Ligilactobacillus ruminis</i> ATCC 27782 T	NC015975	c1497846-1495432
<i>Lactobacillus amylovorus</i> GRL 1112	NC014724	c1735392-1732978
<i>Lactobacillus crispatus</i> ST1	NC014106	c1644428-1642014
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> UCC118	NC007929	488667-491084
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ST-III	NC014554	1170673-1173099
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323 T	NC008530	486733-489147
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 367	NC008497	c1080213-1077784
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	NC004668	761593-764007
<i>Enterococcus faecium</i> DO	NC017960	c2496091-2493677
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 9790 T	NC018081	1151984-1154398

4.2 Vytvoření souborů seřazených sekvencí příslušných genů a jejich použití pro návrh primerů

Získané sekvence ve formě souboru textového editoru byly otevřeny v programu BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor) var. 7.2 volně dostupný na webové adrese <https://bioedit.software.informer.com/7.2/>), poté seřazeny pomocí algoritmu ClustalW a uloženy ve formě souboru fasta (.fas). Ten byl následně vložen do programu Genenious var. 7.1.7 (BioLatters Ltd., Nový Zéland) pro účely návrh vhodných primerů na základě funkčních pravidel nastavení vhodných parametrů primerů (souvisejících například s vhodným zastoupením % cytosinu a guaninu, pravděpodobností tvorby nežádoucích dimerů mezi oběma primery a mezi jednotlivými primery, rozmezí žádoucí délky ohraničeného fragmentu genu apod.) pomocí inkorporované aplikace PRIMER3. Jako nejvhodnější primery byly vygenerovány ty ohraničující fragment o délce 1000 pb (párů bazí) a 600 pb v případě genu *alaS*, resp. *lysS*.

4.3 Testování funkčnosti a specifity navržených primerů na určitých kmenech řádu Lactobacillales

Pro dané účely byly vyselektovány 4 zástupci daného řádu: *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 T – typový kmen daného druhu, *Vagococcus elongatus* PC9 T, *Enterococcus caccae* 2215-02 T a *Lapidilactobacillus* (dříve *Pediococcus*) *dextrinicus* ATCC 33087 T. Tyto kultury a jiné použité v této práci jsou součástí sbírky mikroorganismů Laboratoře anaerobní mikrobiologie ÚŽFG (Ústavu živočišné fyziologie a genetiky) AV ČR, v.v.i. v Praze a deponované ve zmrazené formě (-80 °C, 20 % glycerolu).

Kultury byly nejprve namnoženy (při 37 °C, 24 hodin) v anaerobním (atmosféra zajištěna vytěsněním atmosférického kyslíku pomocí CO₂), sterilním (při 107 °C po dobu 50 minut) M.R.S. médiu (g/L: 20 glukóza, 9 peptonu, 6 NaCl, 5 acetátu sodného, 5 sójového peptonu, 5 kvasničného autolyzátu, 2 K₂HPO₄, 1 MgCl₂ x 6 H₂O; 0,5 cystein-HCl a 1 mL Tweenu 80) a po odstředění (8000 ot./ 5 minut) 1 mL byl bakteriální pelet použit k extrakci DNA prostřednictvím roztoku PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (ThermoFisher Scientific, VB) podle návodu výrobce.

Navržené primery byly poté použity v PCR reakci a navrženém programu pro kontrolu jejich specifity, resp. zda skutečně ohraničují segment genu o dané délce bez amplifikace jiných, nežádoucích fragmentů DNA. Pro tyto účely byl použit gradientový termocyklér Biometra Tadvanced (Německo). PCR reakce (30 μ L) se skládala z PPP Master Mixu od firmy Top-Bio, ČR (poloviční koncentrace z: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo), PCR vody od stejné firmy, navržených primerů o koncentraci 1.5 μ M a zdrojové (templátové) DNA od 4 výše uvedených kmenů o koncentraci 20–80 ng.

PCR program pro ověření specifity pro gen *alaS* byl navržen následovně: 95 °C po dobu 5 minut, 32 cyklů (95 °C po dobu 50 vteřin; teplota ‚annealingu‘ v rozmezí 52–62 °C a elongace při 72 °C po 70 vteřin), a finální krok pro dosyntetizování neúplných fragmentů při 72 °C po dobu 8 minut. Pro gen *lysS* byl zvolen následující program: 95 °C po dobu 5 minut, 30 cyklů (95 °C po dobu 45 vteřin; teplota ‚annealingu‘ v rozmezí 50–58 °C a elongace při 72 °C po 60 vteřin) a finální krok pro dosyntetizování neúplných fragmentů při 72 °C po dobu 8 minut.

Přítomnost amplikonů příslušných genů byly zkontrolovány pomocí 1,5 % agarózového (Agarose for electrophoresis, Serva, Německo) gelu (elektroforéza probíhala po dobu 35 minut při 110 V) s přidavkem 5 μ L (100 ml gelu) ethidium bromidu (koncentrace 10 mg / mL). Vizualizace amplikonů byla provedena pod UV lampou s možností vytvoření fotografií (Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software od firmy Bio-Rad, USA).

4.4 Amplifikace a sekvencování příslušných genů u vybraných zástupců řádu Lactobacillales: potvrzení využití při klasifikaci a fylogenetických studiích

V rámci této práce pro potvrzení hypotézy a splnění cílů bylo využito 37 vesměs typových kmenů řádu Lactobacillales, jak uvádí Tabulka 6 níže. Ty byly deponovány, kultivovány a využity pro extrakci DNA, jak je uvedeno výše.

Tabulka 6. Seznam kmenů, u kterých byla testována specifita navržených primerů pro 2 zvolené geny. ATCC – Americká sbírka typových kultur, DSM – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur, CCM – Česká sbírka mikroorganismů, CDCM – Česká sbírka mlékárenských kultur.

Kmen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 T
<i>Lactobacillus apis</i> R4B T – typový kmen
<i>Bombilactobacillus bombi</i> BTLCH M1/2 T
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869 T
<i>Lactobacillus crispatus</i> ATCC 33820 T
<i>Lactobacillus delbruecki</i> subsp. <i>delbruecki</i> DSM 20074 T
<i>Lactobacillus delbruecki</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20072 T
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> ATCC 14931 T
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243 T
<i>Lactobacillus helveticus</i> CCM 4280
<i>Lactobacillus johnsonii</i> DSM 10533 T
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CDCM 194/91
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 20016 T
<i>Lactobacillus rodentium</i> DSM 24859 T
<i>Ligilactobacillus ruminis</i> ATCC 27780 T
<i>Limosilactobacillus vaginalis</i> DSM 5837 T
<i>Lacticaseibacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> DSM 20011 T
<i>Amylolactobacillus amylohilus</i> CCM 7001 T
<i>Lactobacillus amylovorus</i> CCM 4380 T
<i>Lactobacillus gallinarum</i> CCM 4383 T
<i>Lactobacillus helveticus</i> CCM 7193 T
<i>Lactobacillus iners</i> CCM 4943 T
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 7000 T
<i>Enterococcus cecorum</i> CCM 3659 T
<i>Enterococcus caccae</i> CCM 7399 T
<i>Enterococcus faecium</i> CCM 7167 T
<i>Pediococcus parvulus</i> CCM 3450 T
<i>Pediococcus dextrinicus</i> CCM 3457 T
<i>Streptococcus macacae</i> CCM 7515 T
<i>Streptococcus criceti</i> CCM 7442 T
<i>Tetragenococcus halophilus</i> CCM 3458 T
<i>Vagococcus acidifermentans</i> CCM 8417 T
<i>Vagococcus carniphilus</i> CCM 8414 T
<i>Vagococcus entomophilus</i> CCM 7946 T
<i>Vagococcus fluvialis</i> CCM 4304 T
<i>Vagococcus penaei</i> CCM 8416 T
<i>Vagococcus salmoninarum</i> CCM 4305 T

4.5 Kontrola amplifikace genů za daných PCR podmínek

Přítomnost ampliconů příslušných genů byla potvrzena nejprve 1.5 % agarózobých gelem prostřednictvím elektroforézy (viz. výše) a následně vložím sekvencí fragmentů genů do webové databáze NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

Amplicony žádoucí délky (potvrzené v gelu pomocí tzv. DNA markeru; Top-Bio, ČR) byly ovšem ještě předtím purifikovány kitem Monarch PCR DNA Cleanup Kit (BioLabs Inc., VB) a osekvenovány v komerční společnosti Seqme (ČR) Sangerovou metodou. Po kontrole kvality a délky obdržených sekvencí v programu Chromas Lite var. 2.1 (<https://chromas-lite.software.informer.com/2.1/>) a vložení sekvencí, poskládaných ze 2 sekvencí (od vedoucího a od reverzního primerů) v programu BioEdit, do příslušné databáze byl získán výsledek % shody sekvence fragmentu genu s nejbližším(i) příbuznými.

4.6 Fylogenetické studie znázorňující příbuzenské vztahy na základě fylogenetických analýz (stromků)

Získané sekvence od příslušných kmenů byl pro dané účely nejprve seřazeny (vytvoření tzv. „alignmentu“) v programu BioEdit algoritmem CLUSTALW, upraveny do shodné délky a uloženy ve formátu fasta (.fas). Tyto soubory byly vloženy do programu MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) var. 5.2.2., přičemž pro zohlednění fylogenetických, evolučních vztahů mezi sledovanými taxonomickými jednotkami, byla použita konstrukce fylogenetických stromků metodou ML (maximum –likelihood, maximálně pravděpodobnostní) při 1000 počtu opakování, resp. variant stromků (tzv. „bootstrapping“) pro zvýšení pravděpodobnosti získání správné topologie stromků.

Procenta pravděpodobnosti vytvořených větví (z 1000 opakování, resp. variant), shluky taxonů (tzv. „clustery“) a délka větví vypovídá o příbuzenských vztazích mezi taxony, třebaže pouze na bázi fragmentů funkčních genů.

K vizualizaci vytvořených stromků byl použit volně přístupný program FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) var. 1.4.3.

5 Výsledky

5.1 Navržené primery pro gen *alaS* a *lysS*

Níže jsou zaznamenány zvolené primery ohraničující variabilní fragmenty genů *alaS* (délka kolem 1000 pb) a *lysS* (délka přibližně 600 pb) určené pro klasifikaci a fylogenetické studie zástupců řádu Lactobacillales.

Pro gen *alaS*:

LbcCalaSF

491 F (511)

CTGGGATATYGGTGMAGGHCC

Length: 21

Hairpin Tm: None

Tm: 58.4

Self Dimer Tm:
None

%GC: 47.6

Pair Dimer Tm:
5.4

Product Size:
1052

LbcCalaSR

1,558 R (1539)

ACTTGDCACCCMMKTTCWGC

Length: 20

Hairpin Tm: None

Tm: 58.4

Self Dimer Tm:
None

%GC: 50.0

Pair Dimer Tm:
5.4

Product Size:
1052

Pro gen *lysS*:

LblysSF

CTGAAGCGTYTRATYGTGGYG

753 F (774)

Length: 22

Hairpin Tm: None

Tm: 59.0

Self Dimer Tm:
None

%GC: 45.5

Pair Dimer Tm:
4.6

Product Size:
632

LblysSR

CAGCTTCDCRRTTACCDGC

1,387 R (1369)

Length: 19

Hairpin Tm: None

Tm: 56.4

Self Dimer Tm:
None

%GC: 52.6

Pair Dimer Tm:
4.6

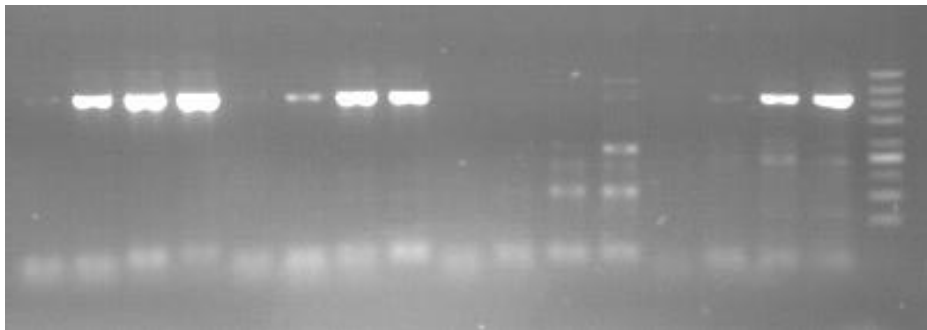
Product Size:
632

Na určitých pozicích byly upraveny nukleotidy (s více variantami různých nukleotidů na jediné pozici) podle IUPAC kódu: R nahrazuje A i G; D nahrazuje A, G i T; a Y nahrazuje v dané pozici C i T.

5.2 Zkouška specifity primerů při amplifikaci obou genů

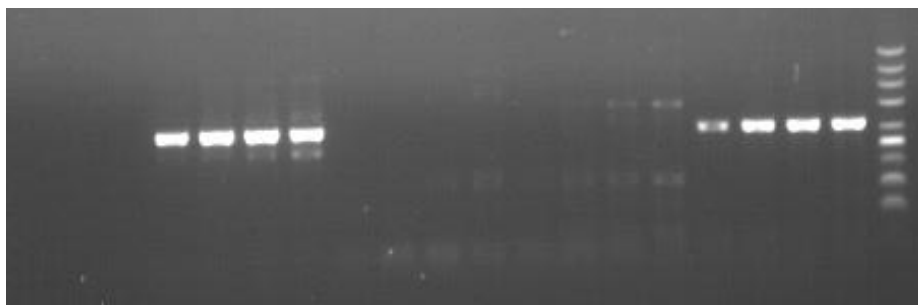
Na Obrázku 5. níže je podle Kapitoly 4.3 přesně v daném pořadí (*Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 T – typový kmen daného druhu, *Vagococcus elongatus* PC9 T, *Enterococcus caccae* 2215-02 T a *Lapidilactobacillus* (dříve *Pediococcus*) *dextrinicus* ATCC 33087 T)

prokázána amplifikace genu *alaS* (kromě *V. elongatus*) o délce přibližně 1000 pb u tří ze 4 testovaných kmenů. Třetí „band“ zcela shora odkazuje v DNA markeru právě délku 1000 pb. Byly testovány za daných podmínek u každého kmene 4 varianty T_a (teploty „annealingu“): 52 °C; 55,2 °C; 58,8 °C a 62 °C. Z obrázku je zřejmé, že silné, kvalitní amplikony vznikaly hlavně při prvních dvou teplotách, resp. 52 a dále 55,2 °C. Proto pro následné ověření na 37 kmenech řádu Lactobacillales byla použita $T_a = 52$ °C za stejných podmínek uvedených výše.



Obrázek 5. Testování amplifikovatelnosti a specifity primerů u genu *alaS* na čtyř vybraných kmenech uvedených výše. Agaróзовý gel při aplikaci 4 uL vzorků po proběhnutí zvoleného PCR programu.

Níže znázorněný Obrázek 6. zahrnuje obdobní zkoušku jako v předešlém případě, jen s použitím primerů pro amplifikaci fragmentu *lysS*. V tomto případě byly zvoleny tyto 4 T_a (teploty „annealingu“, resp. „nasednutí“ primerů na komplementární úsek templátové DNA: 50; 52,5; 55,5 a 58 °C. Je viditelné, že amplifikace fragmentu tohoto genu se podařila pouze u 2 ze 4 testovaných kmenů (*Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 T a *Lapidilactobacillus* (dříve *Pediococcus) dextrinicus* ATCC 33087 T), a to za všech zvolených T_a . Ovšem nejvíce viditelné, silné a tudíž aplikovatelné „bandy“ byly získány při $T_a = 50$ a 52 (třebaže u posledního kmene se amplikony vytvořily za použití všech 4 T_a).



Obrázek 6. Testování amplifikovatelnosti a specifity primerů u genu *lysS* na čtyř vybraných kmenech uvedených výše. Agarózový gel při aplikaci 4 uL vzorků po proběhnutí zvoleného PCR programu.

5.3 Testování specifity primerů pro geny *alaS* a *lysS* na 37 kmenech řádu Lactobacillales

V Tabulce 7. níže je uveden výsledek PCR specifity a amplifikovatelnosti fragmentů genů *alaS* a *lysS* u vybraných 37 kmenů řádu Lactobacillales.

Tabulka 7. Získání ampliconů pomocí námi navržených primerů pro 2 geny určené pro klasifikaci, příp. fylogenetické studie zástupců řádu Lactobacillales. Y – vytvořený amplicon o očekávané délce, NA – nevytvořený amplicon.

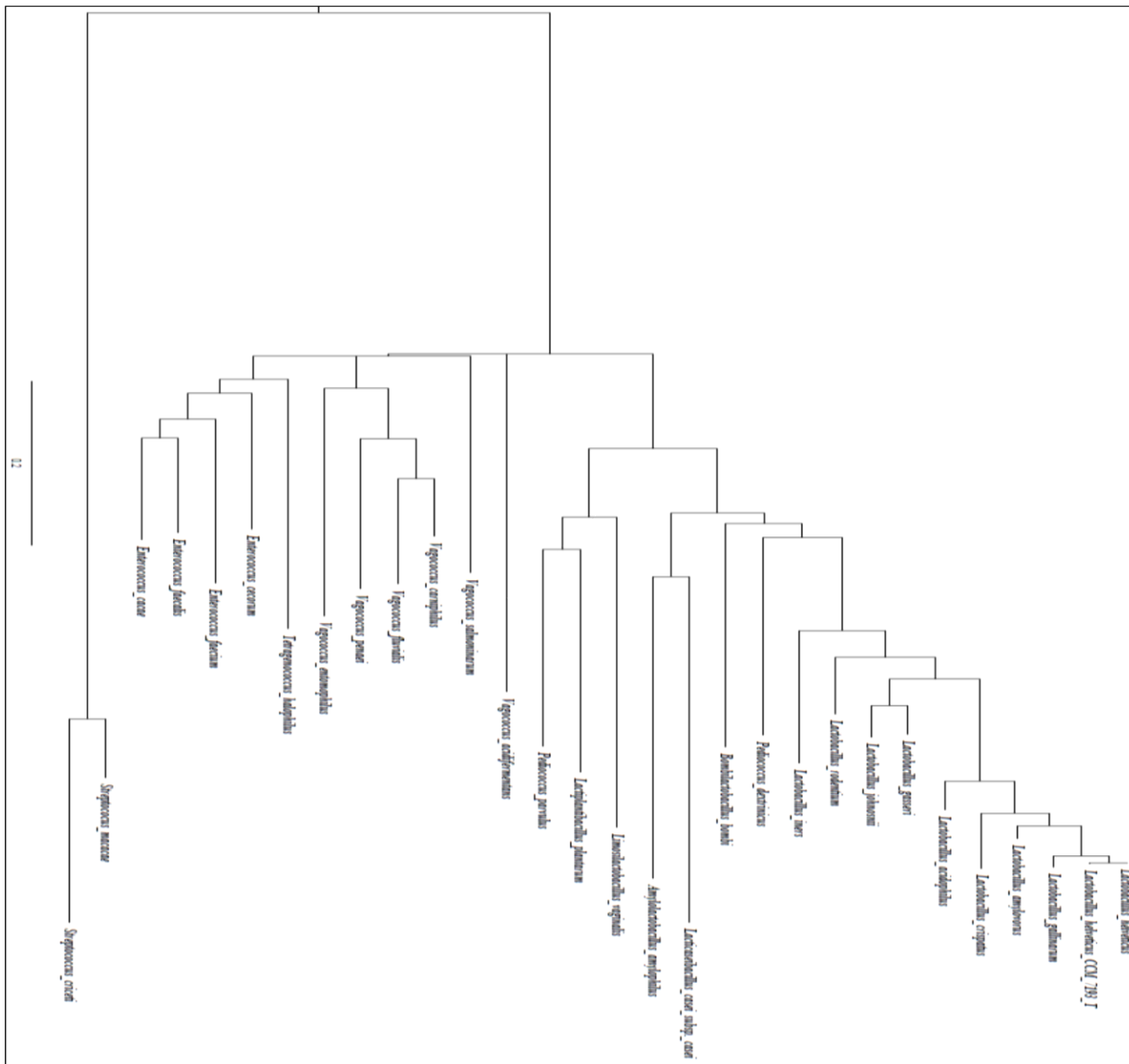
Kmen	Genes	
	<i>alaS</i>	<i>lysS</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 T	Y	Y
<i>Lactobacillus apis</i> R4B T – typový kmen	NA	Y
<i>Bombilactobacillus bombi</i> BTLCH M1/2 T	Y	Y
<i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869 T	NA	Y
<i>Lactobacillus crispatus</i> ATCC 33820 T	Y	NA
<i>Lactobacillus delbruecki</i> subsp. <i>delbruecki</i> DSM 20074 T	NA	Y
<i>Lactobacillus delbruecki</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20072 T	NA	Y
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> ATCC 14931 T	NA	NA
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243 T	Y	Y
<i>Lactobacillus helveticus</i> CCM 4280	Y	Y
<i>Lactobacillus johnsonii</i> DSM 10533 T	Y	Y
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CDCM 194/91	Y	NA
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 20016 T	NA	NA
<i>Lactobacillus rodentium</i> DSM 24859 T	Y	Y
<i>Ligilactobacillus ruminis</i> ATCC 27780 T	NA	Y
<i>Limosilactobacillus vaginalis</i> DSM 5837 T	Y	NA

<i>Lacticaseibacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> DSM 20011 T	Y	NA
<i>Amylolactobacillus amylophilus</i> CCM 7001 T	Y	Y
<i>Lactobacillus amylovorus</i> CCM 4380 T	Y	Y
<i>Lactobacillus gallinarum</i> CCM 4383 T	Y	Y
<i>Lactobacillus helveticus</i> CCM 7193 T	Y	Y
<i>Lactobacillus iners</i> CCM 4943 T	Y	Y
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 7000 T	Y	NA
<i>Enterococcus cecorum</i> CCM 3659 T	Y	Y
<i>Enterococcus caccae</i> CCM 7399 T	Y	NA
<i>Enterococcus faecium</i> CCM 7167 T	Y	NA
<i>Pediococcus parvulus</i> CCM 3450 T	Y	NA
<i>Pediococcus dextrinicus</i> CCM 3457 T	Y	Y
<i>Streptococcus macacae</i> CCM 7515 T	Y	NA
<i>Streptococcus criceti</i> CCM 7442 T	Y	NA
<i>Tetragenococcus halophilus</i> CCM 3458 T	Y	NA
<i>Vagococcus acidifermentans</i> CCM 8417 T	Y	NA
<i>Vagococcus carniphilus</i> CCM 8414 T	Y	NA
<i>Vagococcus entomophilus</i> CCM 7946 T	Y	NA
<i>Vagococcus fluvialis</i> CCM 4304 T	Y	NA
<i>Vagococcus penaei</i> CCM 8416 T	Y	NA
<i>Vagococcus salmoninarum</i> CCM 4305 T	Y	NA

Z Tabulky 7. vyplývá, že pro účely klasifikace určitých zástupců řádu Lactobacillales je lepší gen *alaS* oproti genu *lysS*, který byl amplifikován ani ne u poloviny z testovaných kmenů. Ovšem ani v případě fragmentu genu *alaS* se nepodařilo u všech testovaných kmenů získat amplikony. To ovšem neznamená, že by v budoucnu nemohl být využit pro účely klasifikace určitých zástupců řádu Lactobacillales, totéž (s nižší pravděpodobností) lze tvrdit o genu *lysS*. To, že skutečně byly amplifikovány fragmenty studovaných genů bylo potvrzeno vložением sekvencí do NCBI (BLAST) databáze s výsledky od 99.24 do 100% shody s totožnými geny stejných taxonů.

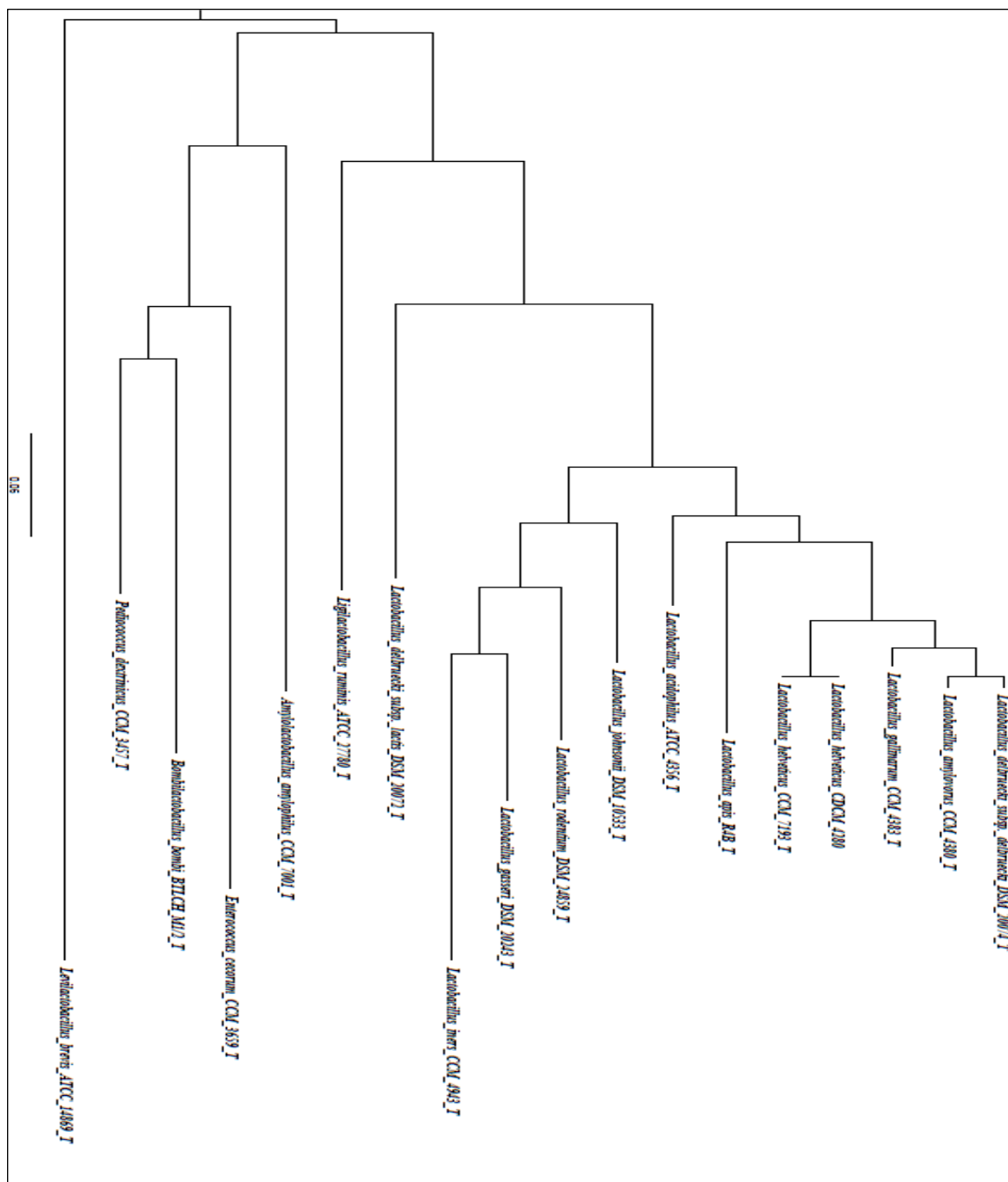
5.4 Výsledky fylogenetických studií

Obrázek 7. znázorňuje fylogenetický strom zrekonstruovaných na základě seřazených sekvencí genu *alaS* o délce 866 nukleotidů. Pro rekonstrukční účely (stejně jako pro gen *lysS*) byla použita metoda ML (Maximum Likelihood) a algoritmus Jukes-Cantor v programu MEGA (viz. výše).



Obrázek 7. Fylogenetický strom na základě segmentu genu *alaS* (délka 866 nukleotidů).

Níže je znázorněn fylogenetický strom na základě fragmentu genu *lysS* (délka 594 nts), který byl amplifikován u menšiny z testovaných kmenů za stejných podmínek (Maximum-Likelihood algoritmus, metoda Jikes-Cantor).



Obrázek 8. Fylogenetický strom na základě segmentu genu *lysS* (délka 594 nukleotidů)

6 Diskuze

Řád Lactobacillales je velice heterogenní skupina bakterií. Tato fylogenetická skupina zahrnuje obvykle grampozitivní, mikroaerofilní, fakultativně anaerobní, katalázově negativní, buď tyčinkovité nebo sférické bakterie. *Lactobacillus* je typ rodu řádu Lactobacillales. Rod *Lactobacillus* ((po reklasifikaci čeledi *Lactobacillaceae* podle Zheng et al. (2020)) byl rozdělen na dílčí rody *Lacticaseibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Lentilactobacillus*). Mezi dílčí rody patří i *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* a *Streptococcus*, a právě ty jsou považovány za nejvýznamnější z této rozsáhlé taxonomické skupiny, protože jsou dobře známé jako bakterie mléčného kvašení (Mekadim et al., 2019). Vzhledem k významnému a širokému uplatnění zástupců čeledi *Lactobacillaceae* nejenom v potravinářském a krmivářském průmyslu, ale i ve farmaceutickém, je kladen důraz na detailní klasifikaci a určení identity používaných kmenů těchto bakterií (Killer and Mrázek, 2018).

V současné době je detailní identifikace, klasifikace a fylogenetická analýza založena na molekulárně genetických metodách, včetně stanovení průměrné nukleotidové identity (ANI) pro celé (nebo fragmentované) genomy (Mekadim et al., 2018), DNA-DNA hybridizaci, sekvenování genu pro 16S rRNA (ribozomální rRNA malé podjednotky ribozomů) (Shevtsov et al., 2011; Blaiotta et al., 2008), detekce molekulárních markerů (také známých jako fylogenetické / identifikační markery) představovaných hlavně provozními tzv. „housekeeping“ geny (Naser et al., 2007; Mekadim et al., 2018). Techniky založené na sekvenci celého genomu jsou v současnosti považovány za nejefektivnější pro identifikační a fylogenetické účely (Diop et al., 2020). Tyto techniky jsou však časově náročné a vyžadují vysokou úroveň odbornosti. Ačkoli hybridizace DNA – DNA a sekvenování genů 16S rRNA jsou stále považovány za „zlatý standard“ pro klasifikaci a fylogenetické studie prokaryot, jejich nedostatky jsou široce diskutovány (Mekadim et al., 2018; Shevtsov et al., 2011; Fischer et al., 2016). Metoda DNA-DNA hybridizace vyžaduje alespoň 80 % komplementaritu mezi řetězci. Navíc je časově náročná a ovlivnitelná použitou konkrétní technikou (Shevtsov et al., 2011; Naser et al., 2005).

Přestože je gen pro 16S rRNA i v současnosti hojně používán jako fylogenetický marker, skrývá v sobě řadu nevýhod, jako je třeba možná přítomnost více částečně sekvenčně odlišných kopií v genomech bakteriálních kmenů, vysoká sekvenční similarita mezi kmeny (≥ 99.0 %),

možnost horizontálního přenosu genových fragmentů (Killer and Mrázek, 2018; Stackebrandt, 2003). Volba kombinací párů primerů použitých pro sekvenování může podstatně ovlivnit přesnost a citlivost rozlišení (Fischer et al., 2016). Obzvláště nejsou spolehlivé pro podrobnou klasifikaci velice příbuzných druhů (Zhi et al., 2011) skupiny bakterií mléčného kvašení. Zejména v taxonomické klasifikaci *Lactobacillus*, kde různé druhy mají velmi podobné (nebo skoro identické) 16S rRNA genové sekvence (Mekadim et al., 2019). Tyto nedostatky vedou k nalezení alternativ pro genomické a fylogenetické analýzy (Stackebrandt, 2003).

Potřeba alternativních genomových markerů, které poskytují vyšší úroveň diskriminace než gen 16S rRNA, vedla k systematičtějšímu sekvenování HKG (Naser et al., 2007). Jejich snadná amplifikace prostřednictvím specifických primerů a následné sekvenování také umožňuje klasifikaci bakteriálních kmenů za kratší dobu. (Mekadim et al., 2019). HKG oproti „zlatému standardu“ (genu pro 16S rRNA) mají určité výhody - nepodléhají horizontálnímu přenosu a rekombinaci (Stackebrandt, 2003). Multigenový přístup zahrnující variabilní oblasti HKG nabízí vysokou úroveň diskriminačního rozlišení mezi úzce souvisejícími taxonomickými jednotkami a poskytuje robustní podmínky k odvození fylogenetických vztahů mezi konkrétními taxonomickými skupinami (Glaeser a Kämpfer 2015; Mekadim et al., 2018). Dané vlastnosti HKG otevírají perspektivu jejich využití jako relativně jednoduššího a časově nenáročného nástroje pro klasifikaci a typizaci vybraných zástupců řádu *Lactobacillales* (Mekadim et al., 2018). Zvolení vhodného fragmentu genu přítomného v genomech různých zástupců čeledi *Lactobacillaceae* by mohlo nabídnout dostupnou rutinní klasifikační metodu využitelnou v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Právě proto je stále aktuální nalezení dosud nepoužívaných genů, vhodných pro dané účely.

V dané práci byly zvolené geny *alaS* (kódující alanyl-tRNA syntetázu\alanin-tRNA ligázu) a *lysS* (kódující lysyl-tRNA syntetázu\lysin-tRNA ligázu) použity jako potenciální klasifikační markery kvůli jejich příslušnosti ke skupině aminoacyl-tRNA syntetáz podílejících se na proteosyntéze (jakožto nezbytnému procesu pro životaschopnost organismů). Dané geny nebyly dosud použity jako klasifikační markery pro zástupci čeledi *Lactobacillaceae* i přesto, že splňují požadavky biomarkerů (funkční stálost a genetická stabilita, distribuce u všech zástupců vyjmenované čeledi, variabilita sekvencí mezi taxonomickými jednotkami (Verma et al, 2018), nezastupitelná role v proteosyntéze). Jako nejvhodnější primery byly vybrány ty, které ohraničují

fragment genu o délce 1000 pb pro *alaS* a 600 pb pro *lysS* a následně aplikované na všechny 37 testovaných kmenů. V rámci této práce bylo pro potvrzení hypotézy a splnění cílů práce bylo využito 37 typových kmenů řádu *Lactobacillales*. Všechny kultury použité v dané práci pocházejí se sbírky mikroorganismů laboratoře anaerobní mikrobiologie ÚŽFG (Ústavu živočišné fyziologie a genetiky) AV ČR, v.v.i. v Praze.

Rozhodně gen *alaS* vykázal větší amplifikovatelnost, a i když amplifikace genových segmentů pomocí navrhovaných primerů nebyla úspěšná u všech kmenů (u 30 z 37 testovaných kmenů), přesto získané výsledky naznačují, že gen *alaS* může být použit jako klasifikační biomarker ve specifických fylogenetických skupinách / taxonech řádu *Lactobacillales*, avšak specifičnost navrhovaného primeru by měla být ověřena pro mnohem větší počet bakteriálních kmenů patřících do různých rodů řádu *Lactobacillales*.

Pro rekonstrukční účely fylogenetických stromů na základě seřazených sekvencí obou genů byla použita statistická metoda maximální věrohodnosti. Tato metoda hledá nejpravděpodobnější topologii pro data (sekvence) (Mossel, et al., 2009).

Fylogenetický strom vytvořený na základě seřazených sekvencí *alaS* reprezentuje čtyři fylogeneticky ohraničené „clustery“:

- skupinu homofermentativních bakterií mléčného kvašení (dříve jen *Lactobacillus*);
- skupinu zformovanou kmeny rodu *Vagococcus*;
- skupinu zformovanou kmeny rodu *Enterococcus*;
- skupinu zformovanou kmeny rodu *Streptococcus*.

Fylogenetický strom na základě seřazených sekvencí genu *lysS* (fragment daného genu je hůře amplifikovatelný) zřejmě znázornil jenom definovanou skupinu *Lactobacillus delbrueckii* homofermentativních BMK, což však neznámá, že nemůže být využitelný pro klasifikační a fylogenetické účely v rámci dané fylogenetické skupiny (ovšem pro dané tvrzení by fragment *lysS* by měl být ověřen na větším počtu kmenů BMK). Fakta, že v rámci druhových skupin mohou různé geny poskytovat různé topologie stromů, nebrání jejich použití k jednoznačnému přiřazení izolátů k určitému druhu. Různé topologie stanovené pro různé HKG geny jsou způsobeny několika faktory: úrovní informačního obsahu, různou evoluční rychlostí a délkou dílčích sekvencí (Naser et al., 2007).

Jak již bylo naznačeno, geny *alaS* a *lysS* (s nižší pravděpodobností) nejsou bez perspektiv k uplatnění pro identifikační, klasifikační a fylogenetické účely jako levnější a rychlejší metoda určení identity bakteriálních izolátů, která by mohla najít své uplatnění v potravinářském, krmivářském a farmaceutickém průmyslu. Ovšem specifitu a aplikovatelnost primerů je potřeba otestovat na mnohem větším počtu zástupců čeledi *Lactobacillaceae*.

7 Závěr

Cílem této práce bylo vytipovat vhodné, dosud nepoužívané, geny pro dané účely na základě určitých požadavků. Následně navrhnout pomocí příslušného softwaru vhodné primery ohraničující žádoucí, variabilní segmenty genů a ty použít při PCR amplifikaci a sekvenaci příslušných genů u typových kmenů zástupců č. *Lactobacillaceae* (řádu Lactobacillales). Při otestování a zároveň navržení vhodných PCR podmínek potvrdit využití sekvenovaných fragmentů při klasifikaci a taxonomii zástupců č. *Lactobacillaceae* (ř. Lactobacillales).

Hypotézou této práce bylo, že sekvence vytipovaných ortologních genů, dostupných v kompletních genomech, umožňují po seřazení nalézt pomocí vhodného softwaru variabilní úseky ohraničené tzv. „primery“ (oligonukleotidy), resp. sekvenčně konzervativními úseky. Navržené primery mohou být následně použity při PCR metodě za použití vhodných PCR programů pro amplifikaci a následně sekvenaci variabilních fragmentů genů. Ty by mohly být využity pro přesnější klasifikaci na úroveň taxonomických jednotek (hlavně druhů, poddruhů a kmenů) příslušných bakterií řádu Lactobacillales.

Výsledky amplifikace genů (*alaS* a *lysS*) a následné využití jejich seřazených sekvencí pro sledování evolučních vztahů pomocí zkonstruovaných v příslušném programu fylogenetických stromů ukázaly na to, že gen *alaS* může být použit jako klasifikační marker ve specifických fylogenetických skupinách / taxonech řádu Lactobacillales stejně jako *lysS* (s menší pravděpodobností). Jednoznačně se dá konstatovat, že pro jejich praktické využití pro klasifikační účely v budoucnu musí být oba geny otestovány na větším počtu kmenů.

8 Seznam použité literatury

- Aguilera, G., Castro-Escarpulli, G., Alonso-Aguilar, N.M., Rivera, G., Bocanegra-Garcia, V., Guo, X., Juárez-Enríquez, S.R., Luna-Herrera, J., Majalca Martínez, C.** 2015. Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections: a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study. *Archives of Clinical Microbiology*, 7(1), 3.
- Anjum, N., Maqsood, Sh., Masud, T., Ahmad, A., Sohail, A., Momin, A.** 2014. *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54(9):1241-51. DOI: 10.1080/10408398.2011.621169.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A.** 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab*, 61(2), 160-74. DOI: 10.1159/000342079.
- Bizzini, B., Pizzo, G., Scapagnini, G., Nuzzo, D., Vasto, S.** 2012. Probiotics and oral health. *Curr Pharm Des*, 18(34), 5522-31. DOI: 10.2174/138161212803307473.
- Blaiotta, G., Fusco, F., Ercolini, D., Aponte, M., Pepe, O., Villani, F.** 2008. *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Appl Environ Microbiology*, 74(1), 208-15. DOI: 10.1128/AEM.01711-07.
- Bosch, M., Nart, J., Audivert, S., Bonachera, M. A., Alemany, A. S., Fuentes, M. C., Cuñé, J.** 2011. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Arch Oral Biology*, 57(5), 539-49. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.006.
- Boyd, M. A., Antonio, M., A., Hillier S. L.** 2005. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 43 5309–5311. 10.1128. DOI: 10.1128/JCM.43.10.5309-5311.2005.
- Brandt, K., Nethery, M. A., O'Flaherty, S., Barrangou, R.** 2020. Genomic characterization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20052. *BMC Genomics*, 21(1), 328. DOI: 10.1186/s12864-020-6740-8.
- Brehony, C., Jolley, K.A., Maiden, M.C.** 2006. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev.*, 31(1), 15-26.
- Brenner, D.J., Martin, M.A., Hoyer, B.H.** 1967. Deoxyribonucleic acid homologies among some bacteria. *J Bacteriology*, 94(2), 486-7. DOI: 10.1128/JB.94.2.486-487.1967.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. G., Noller, H.F.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, 75(10), 4801-5.
- Burdychová, R.** 2009. Vliv přídatku probiotického kmene *L. casei* na koncentraci biogenních aminů ve fermentovaných salámech Herkules. *Sborník Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*, č.5, 41-47.

- Bursová, Š., Dušková, M., Necidová, L., Karpíšková, R., Myšková, P.** 2014. Mikrobiologické laboratorní metody. Ústav hygieny a technologie mléka. Brno. 2014. s.77.
- Cox, M. J., Cookson, W. O C M, Moffatt F, M.** 2013. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet*, 22(R1), R88-94. DOI: 10.1093/hmg/ddt398.
- Čmoková, A., Hamal, P., Svobodová, L., Hubka, V.** 2014. Detekce, identifikace a typizace dermatofytů molekulárně genetickými metodami. *Česko-slovenská dermatologie*, 89,4, 175-186.
- Diop, A., El Karkouri, K., Raoult, D., Fournier, P. E.** 2020. Genome sequence-based criteria for demarcation and definition of species in the genus *Rickettsia*. *Int J Syst Evol Microbiology*, 70(3), 1738-1750. DOI: 10.1099/ijsem.0.003963.
- Dragounová, H., Šalaková, A.** 2014. Možnosti využití vybraných kmenů laktobacilů v technologickém zpracování ovčího a koziho mléka. *Mlékařské listy č. 144*, 4-8.
- Ephrem, E., Najjar, A., Charcosset, C., Greige-Gerges, H.** 2019. Use of free and encapsulated nerolidol to inhibit the survival of *Lactobacillus fermentum* in fresh orange juice. *Food Chem Toxicology*, 133:110795. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110795.
- Essid, I., Medini, M., Hassouna, M.** 2008. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*, 81 (1), 203-208.
- Feijao, P., Yao, H.T., Fornika, D., Gardy, G., Hsiao, W., Chauve, C., Chindelevitch, L.** 2018. MentaLiST – A fast MLST caller for large MLST schemes. *Microb Genom*, 4(2), e000146. DOI: 10.1099/mgen.0.000146.
- Felis, G., Dellagio, F.** 2007. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44-61.
- Fischer, M. A., Güllert, S., Neulinger, S. C., Streit, W. R., Schmitz, R. A.** 2016. Evaluation of 16S rRNA Gene Primer Pairs for Monitoring Microbial Community Structures Showed High Reproducibility within and Low Comparability between Datasets Generated with Multiple Archaeal and Bacterial Primer Pairs. *Front Microbiology*, 7, 1297. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01297. eCollection 2016.
- Fontana, A., Falasconi, I., Molinari, P., Treu, L., Basile, A., Vezzi, A., Campanaro, S., Morelli, L.** 2019. Genomic Comparison of *Lactobacillus helveticus* Strains Highlights Probiotic Potential. *Front Microbiol*, 10:1380. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01380.
- Gadkar, V., Filion, M.** 2014. New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr Issues Mol Biology*, 16, 1-6.
- Glaeser, S. P., Kämpfer, P.** 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiology*, 38(4), 237-45. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.03.007.

Glaeser, S.P., Kämpfer, P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiology*, 38(4):237-45. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.03.007.

Glick, B. R., Pasternak, J., Patten, C. L. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. 4th ed. United States 2010, 850 p. ISBN:9781555814984.

Goldberg, A. 2019. A Brief History of PCR and Its Derivatives. Labtag blog. Dostupná z <https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives/>.

Goldstein, E.G.C., Tyrrell, K.L., Citron, D.M. 2015. Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 60, Issue suppl 2, 98–107.

Gong, P., Lin, K., Zhang, J., Han, X., Lyu, L., Yi, H., Sun, H., Zhang, L. 2020. Enhancing spray drying tolerance of *Lactobacillus bulgaricus* by intracellular trehalose delivery via electroporation. *Food Res Int*, 127, 108725. DOI: 10.1016/j.foodres.

Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiology* 2007, 57(Pt 1), 81-91.

Görner, F., Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívateľin: princípy mikrobiológie požívateľin: potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny: mikrobiológia potravinárskych výrob: ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívateľinami. Malé centrum, Bratislava 2004. 528 s. ISBN 8096706497, 9788096706495.

Green, M. R., Sambrook, J. 2018. Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. *Cold Spring Harb Protoc*, 10. DOI: 10.1101/pdb.top095000.

Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., Ross, P. 2018. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol*, 10 (9). DOI: 10.3389/fmicb.2018.02107.

Horáčková, Š., Bialasová, K., Plocková, M. 2018. Metabolismus a význam bakterií mléčného kvašení ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Mlékařské listy* 170, Vol. 29, No. 5, 22-24.

Irkitova, A.N., Matsyura, A.V. 2017. Ecological and biological characteristics of *Lactobacillus acidophilus*. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(4), 214–230, DOI: 10.15421/2017_109.

Janda, J.M., Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007, 45(9), 2761-4. DOI: 10.1128/JCM.01228-07.

Jay, Z.J., Inskeep, W. 2015. The distribution, diversity, and importance of 16S rRNA gene introns in the order Thermoproteales. *Biol Direct*, 9, 10:35. DOI: 10.1186/s13062-015-0065-6.

Jung, Y.O., Jeong, H., Cho, Y., Lee, E.O., Jang, H.W., Kim, J., Nam, K., Lim, K.M. 2019. Lysates of a Probiotic, *Lactobacillus rhamnosus*, Can Improve Skin Barrier Function in a Reconstructed Human Epidermis Model. *Int J Mol Sci*, 20(17), 4289. DOI: 10.3390/ijms20174289.

Jurečková, N. 2008. Identifikace bakterií mléčného kvašení v kysaných mléčných výrobcích s využitím amplifikačních metod. Brno, 1-39. Bakalářská práce. doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., Ossowski, I.V., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A. P. A., Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C J., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K. T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., De Vos, W. M. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human – mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(40), 17193-8. DOI: 10.1073/pnas.0908876106.

Kato-Kataoka, A., Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-Hayakawa, H., Suda, K., Ishikawa, H., Gondo, Y., Shimizu, K., Matsuki, T., Kushiro, A., Hoshi, R., Watanabe, O., Igarashi, T., Miyazaki, K., Kuwano, Y., Rokutan, K. 2016. Fermented Milk Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota Preserves the Diversity of the Gut Microbiota and Relieves Abdominal Dysfunction in Healthy Medical Students Exposed to Academic Stress. *Appl Environ Microbiology*, 82(12), 3649-58. DOI: 10.1128/AEM.04134-15.

Killer, J., Mrázek, J. 2018. Sekvence variabilního úseku genu kódujícího aspartyl-tRNA syntázu vhodná pro klasifikaci a fylogenetické analýzy zástupců určitých rodů náležejících do řádu *Lactobacillales*: certifikovaná metodika QJ1510338-02. Praha: ÚŽFG AV ČR. ISBN 978-80-270-4240-1.

Kimura, B. 2017. Will the emergence of core genome MLST end the role of in silico MLST? *Food Microbiology*, 75, 28-36. DOI: 10.1016/j.fm.2017.09.003.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, Ch., Horn, M., Glöckner, F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*, 41(1), e1.

Klouda, P. Moderní analytické metody. Třetí, upravené vydání. Nakladatelství Pavko. Ostrava. 2016. s.175 ISBN 978-80-86369-22-8.

Kokešová, A. 2009. Imunomodulační účinky probiotik v klinické praxi. *Pediatr. pro Praxi* 2009, 10(3): 169–174.

Konstantinidis, K. T., Tiedje, J. M. 2007. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Curr Opin Microbiology*, 10(5), 504-9. DOI: 10.1016/j.mib.2007.08.006

- Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T.** Bioanalytické metody.3. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- Laranjo, M., Potes, M. E., Elias, M.** 2019. Role of Starter Cultures on the Safety of Fermented Meat Products. *Front Microbiology*, 10, 853. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00853. eCollection 2019.
- Lise, M., Mayer, I., Silveira, M.** 2018. Use of probiotics in atopic dermatitis. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 64(11), 997-1001. DOI: 10.1590/1806-9282.64.11.997.
- Liu, J. M., Chen, L., Dorau, R., Lillevang, S. K., Jensen, R., Solem, C.** 2020. From Waste to Taste-Efficient Production of the Butter Aroma Compound Acetoin from Low-Value Dairy Side Streams Using a Natural (Nonengineered) *Lactococcus lactis* Dairy Isolate. *J Agric Food Chem*, 27, 68(21), 5891-5899. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c00882.
- Liu, Y., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., Zhang, G., Chen, W.** 2018. Beneficial Effects of Tomato Juice Fermented by *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Casei*: Antioxidation, Antimicrobial Effect, and Volatile Profiles. *Molecules*, 23(9), 2366. DOI: 10.3390/molecules23092366.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., Nitsche, A.** 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 30(6), 1292-305. DOI: 10.1093/nar/30.6.1292.
- Mackay, I.M.** 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, 10(3), 190-212. DOI: 10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x.
- Mahasneh, S. A., Mahasneh, A. M.** 2017. Probiotics: A Promising Role in Dental Health. *Dent J (Basel)*, 5(4), 26. DOI: 10.3390/dj5040026.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3140-5.
- Marhaida Mustafa, S., Suan Chua, L., El-Enshasy, H. A.** 2019. Effects of Agitation Speed and Kinetic Studies on Probiotication of Pomegranate Juice with *Lactobacillus casei*. *Molecules*, 24(13), 2357. DOI: 10.3390/molecules24132357.
- Matoulková, D., Kubizniaková, P.** 2015. Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody pro jejich detekci – I. část. *Kvasný průmysl*, 61(3), 76-87.
- Matsuda, K.** 2017. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Adv Clin Chem*, 80, 45-72.
- Mehlen, A., Goeldner, M., Ried, S., Stindl, S., Ludwig, W., Schleifer, K.H.** 2004. Development of a fast DNA-DNA hybridization method based on melting profiles in microplates. *Syst Appl Microbiology*, 27(6), 689-95. DOI: 10.1078/0723202042369875.

Mekadim, C., Killer, J., Pechar, R., Mrázek, J. 2019. Fragment of the aspartyl-tRNA synthetase applicable as a shared classification and phylogenetic marker in particular representatives of the order *Lactobacillales*. *Folia Microbiol (Praha)*, 64(1), 113-120. DOI: 10.1007/s12223-018-0638-8

Mekadim, C., Killer, J., Mrázek, J., Bunešová, V., Pechar, R., Hroncová, Z., Vlková, E. 2018. Evaluation of the *infB* and *rpsB* gene fragments as genetic markers intended for identification and phylogenetic analysis of particular representatives of the order *Lactobacillales*. *Arch Microbiol*, 200 (10):1427-1437. DOI: 10.1007/s00203-018-1554-7.

Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., Bisson, J. F., Rougeot, C., Pichelin, M., Cazaubiel, M., Cazaubiel, J. M. 2011. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr*, 105(5), 755-64. DOI: 10.1017/S0007114510004319.

Min, M., Bunt, C.R., Mason, S.L., Hussain, M.A. 2019. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 59(16):2626-2641. DOI: 10.1080/10408398.2018.1462760.

Mishra, S., Rath, S., Mohanty, N. 2020. Probiotics-A complete oral healthcare package. *Integr Med*, 18(6), 462-469. DOI: 10.1016/j.joim.2020.08.005.

Mokoena, M., P. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8): 1255. DOI: 10.3390/molecules22081255.

Mossel, E., Roch, S., Steel, M. 2009. Shrinkage Effect in Ancestral Maximum Likelihood. *iee transactions on computational biology and bioinformatics*, vol. 6, no. 1, 126-133.

Müller, S. *Nucleic Acids from A to Z: A Concise Encyclopedia*. Published Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. 336 p. ISBN3527312110.

Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Bendali, F., Spano, G., Seal, B. S., Drider, D. 2020. *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60(20), 3387-3399. DOI: 10.1080/10408398.2019.

Naser, S. M., Dawyndt, P., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J. 2007. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiology*, 57(Pt 12), 2777-2789. DOI: 10.1099/ijs.0.64711-0.

Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology (Reading)*, 151(Pt 7), 2141-2150. DOI: 10.1099/mic.0.27840-0.

Noller, H. F., Woese, C.R. 1981. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science*, 212(4493), 403-11.

Ogier, J. C., Pagès, S., Galan, M., Barret, M., Gaudriault, S. 2019. rpoB, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiol*, 19(1), 171. DOI: 10.1186/s12866-019-1546-z.

Okai, Ch., Itani, Y., Furuta, A., Mizunoe, Y., Iwase, T. 2019. Rapid Identification and Quantification of *Lactobacillus rhamnosus* by Real-Time PCR Using a TaqMan Probe. *Jpn J Infect Dis*, 72(5):323-325. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2019.102.

Ooi, L. G., Liong, M. T. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int J Mol Sci*, 11(6), 2499-522. DOI: 10.3390/ijms11062499.

Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), 734-40.

Rebrikov, D.V., Samatova, G.A., Trofimov, D.J. 2015. ПЦР в реальном времени (PCR v reálnem čase). Nakladatelství Бином. Лаборатория знаний, 2015. 226 s. ISBN 9785996329540.

Rosselló-Móra, R. 2012. Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. *Environ Microbiology*, 14(2), 318-34. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02599.x.

Ruiz-Padilla, A., Redondo, C., Asensio, A., Garita-Cambronero, J., Martínez, C., Pérez-Padilla, V., Marquínez, R., Collar, J., García-Méndez, E., Alfaro-Fernández, A., Asensio-S-Manzanera, C., Palomo, J.L., Siverio, F., De León, L., Cubero, J. 2020. Assessment of Multilocus Sequence Analysis (MLSA) for Identification of *Candidatus Liberibacter Solanacearum* from Different Host Plants in Spain. *Microorganisms*, 8(9), 1446. DOI: 10.3390/microorganisms8091446.

Ruml, T., Rumlová, M., Pačes, V. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.

Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W. M. 2005. Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Current opinion in Biotechnology*, 16: 204–211. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.02.003.

Sedláček, I. 2007. *Taxonomie prokaryot*. Muni Press, Brno, s.270. ISBN ISBN 80-210-4207-9.

Sentausa, E., Fournier, P.E. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. *Clin Microbiol Infect.*, 19(9), 790-5. DOI: 10.1111/1469-0691.12181.

Shevtsov, A.B., Kushugulova, A.R., Kojakhmetov, S.S., Oralbaeva, S.S., Stoyanova, L.G., Seidalina, A.B., Mominaliev, K.T. 2011. The identification of *Lactobacillus* spp. on the base of

analysis of gene fragment beta- subunit rna -polymerase (rpoB). Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya, (1), 26-31. (In Russ.) ISSN 0137-0952.

Stackebrandt, E. 2003. The Richness of Prokaryotic Diversity: There Must Be a Species Somewhere. Food Technology and Biotechnology, 41(1), 17-22. ISSN 1330-9862.

Stackebrandt, E., Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiology today, 152-155. ISSN: 1464-0570.

Stefanovic, E., Fitzgerald, G., McAuliffe, O. 2016. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. Food Microbiology, Vol. 61, 33-49. DOI: 10.1016/j.fm.2016.08.009

Sun, J., Chen, H., Qiao, Y., Liu, G., Leng, C., Zhang, Y., Lv, X., Feng, Z. 2019. The nutrient requirements of *Lactobacillus rhamnosus* GG and their application to fermented milk. J Dairy Sci. 102(7), 5971-5978. DOI: 10.3168/jds.2018-15834.

Šilhánková, L. 2002. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vyd. Praha: Academia, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

Šmarda, J. 2005. Metody molekulární biologie. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.

Teixeira, P. 2014. LACTOBACILLUS | *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), 425-431.

Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., Kämpfer, P. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int J Syst Evol Microbiology, 60(Pt 1), 249-266. DOI: 10.1099/ijms.0.016949-0

Toedter Williams, N. 2010. Probiotics. Am J Health Syst Pharm, 67(6), 449-58. DOI: 10.2146/ajhp090168.

Turaki, A. A., Bömer, M., Silva, G., Kumar, L., Seal, S.E. 2017. PCR-DGGE Analysis: Unravelling Complex Mixtures of Badnavirus Sequences Present in Yam Germplasm. Viruses, 9(7), 181. DOI: 10.3390/v9070181.

Valihrač, L., Demnerova, K. 2012. Impact of normalization method on experimental outcome using RT-qPCR in *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Methods, 90(3), 214-6. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.05.008.

Van Guilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques, 44(5), 619-26. DOI: 10.2144/000112776.

Verma, D., Garg, P. K., Dubey, A. K. 2018. Insights into the human oral microbiome. Arch Microbiology, 200(4), 525-540. DOI: 10.1007/s00203-018-1505-3.

- Vlková, E., Rada, V.** 2013. Cvičení z potravinářské mikrobiologie. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha 2012. s. 47 (1). ISBN 978-80-213-2402-2.
- Vodrážka, Z.** 2007. Biochemie. Praha: Academia, 2., opr. vyd. ISBN 978-80-200-0600-4.
- Vos, M., Quince, C., S Pijl, A., M. de Hollander, Kowalchuk, G.A.** 2012. A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. PLoS One, 7(2), e30600. DOI: 10.1371/journal.pone.0030600.
- Votava, M., Horváth, R., Dendis, M.** 2000. Polymerázová řetězová reakce v mikrobiologické diagnostice. Praktický lékař, Praha: ČLS JEP, 80(11), s.634. ISSN 0032-6739.
- Vuyt, De L., Vancanneyt, M.** 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiology, 24(2), 120-7. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.005.
- Wilkins, T., Sequoia, J.** 2017. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. Am Fam Physician, 96(3), 170-178.
- Woong Whon, T., Chung, W.H., Young Lim, M., Song, E. J., Soo Kim, P., Hyun, D. W., Shin, N.R., Jin-Woo, B., Nam, W.D.** 2018. The effects of sequencing platforms on phylogenetic resolution in 16 S rRNA gene profiling of human feces. Sci Data, 24, 5:180068. DOI: 10.1038/sdata.2018.68.
- Xu, Y., Tian, Y., Cao, Y., Li, J., Guo, H., Su, Y., Tian, Y., Wang, C., Wang, T., Zhang, L.** 2019. Probiotic Properties of Lactobacillus paracasei subsp. paracasei L1 and Its Growth Performance-Promotion in Chicken by Improving the Intestinal Microflora. Front Physiology, 10, 937. DOI: 10.3389/fphys.2019.00937. eCollection 2019.
- Yamamoto, Y., Saruta, J., Takahashi, T., To, M., Shimizu, T., Hayashi, T., Morozumi, T., Kubota, N., Kamata, Y., Makino, S., Kano, H., Hemmi, J., Asami, Y., Nagai, T., Misawa, K., Kato, S., Tsukinoki, K.** 2019. Effect of ingesting yogurt fermented with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1 on influenza virus-bound salivary IgA in elderly residents of nursing homes: a randomized controlled trial. Acta Odontol Scand, 77(7), 517-524. DOI: 10.1080/00016357.2019.1609697.
- Zacharof, M. P., Lowitt, R. W.** 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. APCBEE Procedia Volume 2, 2012, 50-56.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, Ch., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S.** 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. Int J Syst Evol Microbiol, 70(4), 2782-2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107.

Zhi, X. Y., Zhao, W., Li, W. J., Zhao, G. P. 2011. Prokaryotic systematics in the genomics era. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(1), 21-34. DOI: 10.1007/s10482-011-9667-x.

Zhou, H., Li, X., Wang, Z., Yin, J., Tan, H., Wang, L., Qiao, X., Jiang, Y., Cui, W., Liu, M., Li, Y., Xu, Y., Tang, L. 2018. Construction and characterization of thymidine auxotrophic (Δ thyA) recombinant *Lactobacillus casei* expressing bovine lactoferricin. *BMC Vet Res*, 14(1), 206. DOI: 10.1186/s12917-018-1516-y.