

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Bifidobakterie a jejich role ve střevní mikrobiotě

Bakalářská práce

Autor práce: Daniela Resová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Nikol Modráčková

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Bifidobakterie a jejich role ve střevní mikrobiotě" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 1. 5. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Nikol Modráčkové za odborné vedení mé bakalářské práce, její rady, vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí pracovního prostoru, vytvoření vhodných pracovních podmínek a pomoc při práci v laboratoři. Nesmím zapomenout také poděkovat Ing. Ondřeji Mokrému za bezmeznou psychickou podporu, nekonečnou motivaci a věcné připomínky při korekci této bakalářské práce.

Bifidobakterie a jejich role ve střevní mikrobiotě

Souhrn

Lidský gastrointestinální trakt obývá mnoho mikroorganismů. Složení střevní mikrobioty může výrazně ovlivnit zdraví jedince. Mezi běžné komenzální bakterie ve střevě řadíme rod *Bifidobacterium*. Přínos bifidobakterií je především v jejich schopnosti štěpit jinak nestravitelné složité sacharidy, vzniklými metabolity okyselovat prostředí a tím nejen chránit hostitele, ale i zlepšovat vstřebatelnost některých minerálních látek. Vzniklou energií mohou také vyživovat střevní či jaterní epitel. Bifidobakterie zaujímají velký podíl střevní mikrobioty především u kojenců. Jsou nejen součástí mateřského mléka, ale především tráví oligosacharidy v něm hojně obsažené. Se změnou stravy a přibývajícím věkem zastoupení bifidobakterií klesá. Druhy bifidobakterií běžné u kojenců bývají postupně nahrazeny druhy jinými, typickými pro mikrobiotu dospělého člověka. Hostitelem pro bifidobakterie není pouze člověk, ale často jím bývají i primáti a další zvířata. Některé druhy byly dokonce izolovány z trávicího traktu hmyzu nebo odpadních vod.

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo kvantifikovat kultivovatelné bifidobakterie z lidských fekálních vzorků od dárců bez gastrointestinálních obtíží (n = 15) a určit jejich druhové zastoupení. Dalším cílem bylo rozšíření sbírky bifidobakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze o tyto divoké kmeny.

Bifidobakterie byly detekovány ve vysokých kultivačních počtech u všech testovaných fekálních vzorků lidských dárců bez gastrointestinálních obtíží. Na selektivním médiu s mupirocinem a kyselinou octovou dosahovaly množství v průměru $8,95 \pm 0,35$ log KTJ/g fekálního vzorku. Podobného množství bifidobakterie dosahovaly také na médiu s norfloxacinem, mupirocinem a kyselinou octovou v průměru $8,76 \pm 0,35$ log KTJ/g. Selektivita médií a identita izolátů byla ověřena a určena pomocí mikroskopické kontroly, detekce enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Z celkových 77 izolovaných kmenů bifidobakterií bylo pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie 73 identifikováno na druhovou úroveň s vysokou mírou jistoty. Nejčastěji detekovanými druhy byly *Bifidobacterium adolescentis* a *B. longum*, po nichž následovaly *B. animalis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum*. Všech těchto 73 zidentifikovaných divokých kmenů bifidobakterií patřících do 7 různých druhů bylo přidáno do sbírky bifidobakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze určených jako kontrolní skupina bifidobakterií od lidských dárců bez gastrointestinálních obtíží pro budoucí testování v rámci střevní dysbiotické mikrobioty, antibiotické rezistence bifidobakterií a dalších studií.

Klíčová slova: Mikrobiom, kultivace, *Bifidobacterium*, MALDI-TOF MS, druhová identifikace

Bifidobacteria and their role in the gut microbiota

Summary

The human gastrointestinal tract is inhabited by many microorganisms. The composition of the gut microbiota can affect an individual's health. *Bifidobacterium* is one of the common commensal bacterial genera in the intestine. The benefit of bifidobacteria is mainly in their ability to digest otherwise indigestible complex carbohydrates. The resulting metabolites help to acidify the gut environment and thus not only protect the host but also improve the absorption of some minerals. The resulting energy can also nourish the intestinal or hepatic epithelium. Bifidobacteria occupy a large proportion of gut microbiota, especially in infants. They are contained in breast milk and digest the oligosaccharides abundant in it. The proportion of bifidobacteria decreases with diet changes and host aging. The species of bifidobacteria common in infants are continuously being replaced by other species, typical in the adult gut microbiota. The hosts for bifidobacteria are not only humans but primates and other animals, too. Some species have been isolated even from the digestive tract of insects or sewage.

The aim of the practical part of the bachelor thesis was to quantify cultivated bifidobacteria from human faecal samples from donors without gastrointestinal problems (n = 15) and to determine other species representation. Another goal was to expand the collection of bifidobacteria of the Department of Microbiology, Nutrition, and Dietetics of the Czech University of Life Sciences Prague by these wild strains.

Bifidobacteria were highly abundant in all tested faecal samples from human donors without gastrointestinal problems. The cultivation numbers of bifidobacteria reached 8.95 ± 0.35 log CFU per gram of faecal sample when cultivated on a selective medium with mupirocin and acetic acid. A similar amount of bifidobacteria was determined on medium with norfloxacin, mupirocin, and acetic acid in counts of 8.76 ± 0.35 log CFU/g. The selectivity of the media and the identity of the isolates were verified by microscopic check, detection of the enzyme fructose-6-phosphate phosphoketolase, and by the MALDI-TOF mass spectrometry.

Of a total of 77 isolated bifidobacterial strains, 73 were identified by MALDI-TOF mass spectrometry to the species level with a high degree of certainty. The most frequently detected species were *Bifidobacterium adolescentis* and *B. longum*, followed by *B. animalis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, and *B. pseudocatenulatum*. All these 73 identified wild strains of bifidobacteria belonging to 7 different species were added to the bifidobacterial collection of the Department of Microbiology, Nutrition, and Dietetics of the Czech University of Life Sciences Prague as a control group of bifidobacteria from human donors without gastrointestinal problems. These wild strains will be used for future testing of intestinal dysbiotic microbiota, antibiotic resistance of bifidobacteria, and other studies.

Keywords: Microbiome, cultivation, *Bifidobacterium*, MALDI-TOF MS, species identification

Obsah

1	Úvod	7
2	Hypotéza a cíl práce	8
2.1	Hypotéza	8
2.2	Cíl práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Lidská střevní mikrobiota	9
3.2	Bifidobakterie	9
3.2.1	Taxonomie bifidobakterií	10
3.2.1.1	Seznam druhů	11
3.2.2	Fenotypové a morfologické vlastnosti bifidobakterií	15
3.2.3	Metabolismus sacharidů	16
3.2.4	Bifidobakterie a onemocnění GIT	17
3.3	Faktory ovlivňující výskyt bifidobakterií	19
3.3.1	Porod a kojení	19
3.3.2	Strava a suplementace probiotik	21
3.3.3	Prebiotika	22
3.3.4	Synbiotika	22
3.3.5	Antibiotika	23
4	Metodika	24
4.1	Příprava médií	24
4.2	Mikrobiologický rozbor fekálních vzorků	26
4.3	Kvantifikace a izolace narostlých kolonií	26
4.4	Identifikace izolátů	26
4.4.1	Detekce enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy	27
4.4.2	MALDI-TOF MS	28
4.5	Uchování sbírkových izolátů bifidobakterií	29
5	Výsledky	30
5.1	Kultivační stanovení počtů bifidobakterií ve fekálních vzorcích lidí bez gastrointestinálních obtíží	30
5.2	Identifikace vybraných izolátů	31
5.2.1	F6PPK test	31
5.2.2	MALDI-TOF MS	31
5.3	Rozšíření sbírky bifidobakterií	32
6	Diskuze	37
7	Závěr	41
8	Literatura	42
9	Samostatné přílohy	I
	Příloha 1: fotografie bifidobakterií pod mikroskopem s fázovým kontrastem	I

1 Úvod

Lidský gastrointestinální trakt (GIT) a jeho osídlení je v poslední době velmi diskutovaným tématem. Způsob mikrobiálního osídlení nejen u člověka, ale i u ostatních živočichů má přímý vliv na zdraví. Osídlení každého jedince je individuální a poměrně nestálé. Mezi faktory ovlivňující mikrobiom v různých částech trávicího traktu řadíme věk, výživu, užívání léčiv aj.

Mezi dominantní rody bakterií převážně v kojeneckém věku při mléčné výživě řadíme rod *Bifidobacterium*. Bifidobakterie kromě trávicího traktu osidlují i dutinu ústní. Dále je můžeme nalézt v mateřském mléce, mléčných výrobcích nebo odpadních vodách. Jedná se o komezální sacharolytické mikroorganismy, které jsou schopny rozkládat některé složité sacharidy, které hostitel trávit nedokáže, tvořit organické kyseliny a tím přispívat k jeho zdraví. Kvůli zmíněným příznivým účinkům jsou bifidobakterie často komerčně využívány jako probiotika. Užívání bifidobakterií může zmírnit a zlepšit průběh nemocí gastrointestinálního traktu a napomáhat udržování homeostázy v organismu.

V této práci byly kultivačně stanoveny počty bifidobakterií ze stolice dárců bez gastrointestinálních potíží. Jednotlivé izoláty bifidobakterií byly dále identifikovány pomocí biochemického testu a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, která se osvědčila jako rychlý a spolehlivý způsob pro identifikaci bifidobakterií lidského původu. Zidentifikované divoké kmeny bifidobakterií byly poté uloženy a použity k rozšíření sbírky bifidobakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze.

2 Hypotéza a cíl práce

2.1 Hypotéza

Bifidobakterie jsou považovány za prospěšné mikroorganismy běžně se vyskytující ve střevní mikrobiotě člověka. Předpokládáme, že bifidobakterie budou hojně detekovány u testovaného vzorku lidí bez gastrointestinálních obtíží s vyšším zastoupením u mladších jedinců.

2.2 Cíl práce

Cílem práce bylo vytvoření přehledné literární rešerše na základě vědeckých poznatků o dynamicky se rozvíjejícím rodu *Bifidobacterium*. Dalším cílem bylo provést kultivační stanovení počtů bifidobakterií ze vzorků stolice lidí bez gastrointestinálních obtíží a izolovat a identifikovat bifidobakteriální kmeny pro rozšíření kontrolní skupiny bifidobakterií ve sbírce Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze pro další testování.

3 Literární rešerše

3.1 Lidská střevní mikrobiota

GIT člověka obsahuje více než 100 trilionů (10^{14}) bakterií, virů, archea, kvasinek a mikroskopických plísní, které dohromady tvoří střevní mikrobiotu (Mondot et al. 2013). Tento mikrobiální ekosystém je velmi dynamický a můžeme jej rozdělit na dvě části: autochtonní populace mikroorganismů, kdy se jedná o stálé obyvatele střev; a alochtonní mikroorganismy, které jsou získány z prostředí (Ventura et al. 2009). Jeho složení může být ovlivněno velkým množstvím parametrů, jako je pH, teplota, aktivita vody, množství kyslíku nebo redoxní stav (Milani et al. 2017). Mikrobiota se vyvíjela spolu s člověkem, aby dosáhla symbiotického vztahu vedoucího k fyziologické homeostáze (Mondot et al. 2013). Většinu známého gastrointestinálního osídlení lze zařadit ke čtyřem základním kmenům: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria a Actinobacteria. Třídy Firmicutes a Bacteroidetes tvoří více než 90 % relativního množství střevní mikrobioty a jsou důležité pro udržení vnitřní rovnováhy. Actinobacteria a Proteobacteria tvoří zbylých 10 % (Segata et al. 2012). Složení střevní bakteriální mikrobioty může být rozděleno na tři enterotypy. Patří mezi ně Prevotella, která je silně spojována se stravou dlouhodobě bohatou na sacharidy. Dalším enterotypem je Bacteroidetes, pro kterého je typické západní stravování – velké množství bílkovin a živočišných tuků. Posledním enterotypem je Ruminococcus (Moraes et al. 2019).

Bakterie v lidských střevech jsou považovány za klíčovou obranu vrstvu proti kolonizaci potenciálně patogenními organismy (Servin 2004). Důležitost střevní mikrobioty spočívá také ve získávání živin, produkci vitamínů a dalších bioaktivních molekul (Sekirov et al. 2010).

3.2 Bifidobakterie

Bifidobakterie jsou známy již od roku 1900, kdy je Tissier našel a popsal v kojeneckých výkalech. Později, roku 1924 Orla-Jensen pojmenoval tyto bakterie jako *Lactobacillus bifidus* (Reuter 2001). V průběhu dvacátého století se název vyvíjel. Vždy se ale jednalo o obměnu názvu jako např. bifidus, bifidum, bifida, parabifidus. Bifidus v překladu z latiny znamená rozštěp nebo rozdělený. Toto označení vychází z rozdvojených konců buněk, které jsou charakteristickým morfologickým znakem rodu *Bifidobacterium* (Hoover 2014).

Bifidobakterie jsou nepohyblivé, nesporetné, neprodukující plyn, anaerobní nebo fakultativně anaerobní, sacharolytické, mezofilní bakterie. Doposud byly izolovány z GIT savců, dutiny ústní, potravin, hmyzích střev a odpadních vod (Ventura et al. 2007). Přítomnost různých druhů bifidobakterií se s věkem jedince vyvíjí. Zatímco v dětství převládají druhy *Bifidobacterium* (*B.*) *breve*, *B. bifidum* a *B. longum* v pozdějším věku se jedná především o *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, ale také *B. longum* (Arboleya et al. 2016). Zástupci čeledi *Bifidobacteriaceae* převládající v dutině ústní jsou *B. dentium*, *Scardovia inopinata* a *Parascardovia denticolens*. Výskyt *B. dentium* bývá často negativně spojován s výskytem zubního kazu. V zubním kazu se ale ve vyšší míře nachází *Scardovia inopinata*, *B. dentium* nalezneme ve vyšší míře jako součást zubního plaku (Modesto et al. 2006).

Mezi multihostitelské druhy můžeme zařadit *B. adolescentis*, izolováno kromě lidských výkalů i z bachoru skotu či výkalů hominidů, například orangutana bornejského (*Pongo pygmaeus*) (D'Aimmo et al. 2014; Mattarelli & Biavati 2018). Dále k multihostitelským druhům patří *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum*, které se nacházejí v lidských výkalech a dále pak i v odpadních vodách. *B. catenulatum* se také nachází i ve vaginálním mikrobiomu, *B. pseudocatenulatum* zase ve výkalech telat. *B. pseudolongum* může být izolováno z trávicího traktu nejen člověka, ale i velkého množství zvířat – telat, kuřat, prasat, králíků a krys. *B. longum* můžeme nalézt ve výkalech telat, ovcí, myši a potkanů (Mattarelli & Biavati 2018).

Některé druhy bifidobakterií byly však doposud izolovány pouze z určité ekologické niky. Například *B. erythrocebi*, *B. moraviense*, *B. oedipodis*, *B. olomucense* a *B. panos* byly v současnosti izolovány pouze z výkalů primátů (Neuzil-Bunesova et al. 2021). Další specifickou ekologickou nikou je trávicí trakt hmyzu, kde můžeme najít například *B. xylocopae*, *B. aemilianum* a *B. actinocoloniiforme* (Killer et al. 2011; Alberoni et al. 2019).

3.2.1 Taxonomie bifidobakterií

Tabulka 1: Taxonomické zařazení (Ventura et al. 2007)

Taxonomické zařazení	
Doména	Bacteria
Kmen	Actinobacteria
Třída	Actinobacteria
Řád	Bifidobacteriales
Čeleď	<i>Bifidobacteriaceae</i>
Rod	<i>Bifidobacterium</i>

Tradičně byly druhy bifidobakterií identifikovány na základě místa nebo hostitele, ze kterého byly izolovány (*B. animalis*, *B. dentium*, *B. adolescentis*). Při taxonomickém zařazení bifidobakterií je využíváno popisu fenotypových znaků: morfologie buněk, analýza produktů fermentace a související enzymové aktivity nebo schopnost využívat cukerné substráty (Ventura et al. 2004). Současné taxonomické zařazení obsahuje **Tabulka 1**.

V dnešní době je nicméně nejpoužívanější metodou v případě popisování nových druhů celogenomové sekvenování, které poskytuje nejkomplexnější soubor genetické variace jedince (Ng & Kirkness 2010). Standardní metodou při zjišťování fylogeneze prokaryot je již po dlouhou dobu analýza sekvenace genu 16S rRNA. Jedná se totiž o evolučně konzervativní úsek, který ale obsahuje i variabilní části, díky kterým od sebe lze odlišit bakterie až na druhovou úroveň. Další metodou při identifikaci bifidobakterií je sekvenace jiných fylogenetických markerů, jako je například gen kódující threonin-tRNA ligázu, který je distribuován v bifidobakteriálních genomech (Killer et al. 2018b). Dalším identifikačním a fylogenetickým markerem čeledi *Bifidobacteriaceae* je gen *pyrG*, jenž má vyšší rozlišovací schopnost mezi kmeny a druhy než gen 16S rRNA (Killer et al. 2018a). Jako další markery čeledi *Bifidobacteriaceae* byly například testovány genové segmenty *glyS*, *pheS*, *rpsA* a *rpsB*. V porovnání s markerem 16s rRNA, ale byly průměrné hodnoty nukleotidové identity nižší (Mekadim et al. 2019). Další rozpoznávací metodou je genetická daktyloskopie (genomic fingerprints) umožňující rozpoznání bifidobakterií na úrovni druhu, nebo dokonce i kmene.

Mezi fingerprintové metody patří například RAPD (random amplified polymorphic DNA), neboli testy s náhodnou zesílenou polymorfní DNA. Tato technika je založena na použití primerů o délce sekvence 9–10 bází, které hybridizují na komplementární nebo částečně komplementární sekvence v cílových sekvencích chromozomální DNA při nízkých teplotách, které mohou být použity k zahájení amplifikace bakteriálního genomu. RAPD umožňuje diferenciaci mezi kmeny v rámci stejného druhu (Fanedl et al. 1998; Ventura et al. 2004). Další metodou je také gelová elektroforéza s pulzním polem, PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), pomocí které je možné identifikovat bifidobakteriální kmen i druh. Tato metoda je ale složitá a časově náročná (Roy 1996). Další metodou je amplifikovaná restriční analýza ribozomální DNA, ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis). Tuto techniku lze charakterizovat jako analýzu polymorfismu délky restričních fragmentů amplifikovaných rRNA genů. Buď je použita konzervativní i variabilní část genu 16S rRNA, nebo jen jeho části jsou amplifikovány pomocí PCR (Polymerase Chain Reaction) a štěpeny jedním restričním enzymem (Ventura et al. 2004). V případě celého společenstva mikroorganismů, například z celkové fekální DNA, lze použít Illumina sekvenování. Jedná se o široce používanou metodu, která paralelně odečítá několik stovek milionů imobilizovaných sekvencí (Kircher et al. 2011).

3.2.1.1 Seznam druhů

Vzhledem k neustále probíhajícím výzkumům seznam stále není finální. Sepsaný seznam platně zveřejněných druhů bifidobakterií spolu s informacemi o objeviteli a zdroji, ze kterého byl kmen poprvé izolován obsahuje **Tabulka 2**. Tento seznam je aktuální ke dni 1. 2. 2021 z databáze bacterio.net.

Trendem poslední doby je objevování neustále nových druhů bifidobakterií, velmi často z novosvětských opic. V roce 2019 byl seznam bifidobakterií rozšířen o *B. castoris* izolovaného z výkalů bobra evropského (*Castor fiber*), *B. callimiconis* a *B. goeldii* z výkalů tamarína skákavého (*Callimico goeldii*), *B. samirii* z kotula amazonského (*Saimiri boliviensis peruviansis*) a *B. dolichotidis* z maryl stepní (*Dolichotis patagonum*) (Duranti et al. 2019). V roce 2020 byly objeveny *B. cebidarum* ve výkalech tamarína skákavého (*Callimico goeldii*) a *B. leontopithecii* ve výkalech lvíčka zlatohlavého (*Leontopithecus chrysomelas*) (Duranti et al. 2020). Dále bylo izolováno 5 nových bifidobakteriálních druhů z výkalů primátů v českých zoologických zahradách: *B. moraviense*, *B. oedipodis*, *B. erythrocebi*, *B. olomucense* a *B. panos* (Neuzil-Bunesova et al. 2021). Dříve neznámý druh byl v témže roce izolován i z výkalů psa domácího (*Canis lupus f. familiaris*), jednalo se o *B. canis* (Neuzil-Bunesova et al. 2020).

Tabulka 2: Seznam platně zveřejněných druhů bifidobakterií

Kmen	Objevitel a rok	Zdroj izolátu	ID sbírky
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	Killer et al. 2011	trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	DSMZ 22766
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Reuter 1963	trávicí trakt člověka	DSMZ 20083
<i>Bifidobacterium aemilianum</i>	Alberoni et al. 2019	trávicí trakt drvodělky fialové (<i>Xylocopa violacea</i>)	DSMZ 104956
<i>Bifidobacterium aerophilum</i>	Michelini et al. 2017	výkaly tamarína pinčeho (<i>Saguinus oedipus</i>)	DSMZ 100689

<i>Bifidobacterium aesculapii</i>	Modesto et al. 2014	výkaly mláďete kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	DSMZ 26737
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Scardovi a Crociani 1974	lidská stolice	DSMZ 20098
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Masco et al. 2004	kryší výkaly	DSMZ 20104
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Meile et al. 1997	jogurt	DSMZ 10140
<i>Bifidobacterium anseris</i>	Marco et al. 2017	výkaly husy domácí (<i>Anser domesticus</i>)	LMG 30189
<i>Bifidobacterium apri</i>	Pechar et al. 2017	tlusté střevo prasete divokého (<i>Sus scrofa scrofa</i>)	DSMZ 100238
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>	Laureys et al. 2016	vodní kefir	LMG 28769
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Scardovi and Crociani 1969	trávicí trakt včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)	DSMZ 20089
<i>Bifidobacterium avesanii</i>	Michelini et al. 2019	výkaly tamarína pinčého (<i>Saguinus oedipus</i>)	DSMZ 100685
<i>Bifidobacterium biavatii</i>	Endo et al. 2012	výkaly tamarína žlutorukého (<i>Sanguinus midas</i>)	DSMZ 23969
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Orla-Jensen 1924	stolice kojence	DSMZ 20456
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	Killer et al. 2011	trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	DSMZ 22767
<i>Bifidobacterium bombi</i>	Killer et al. 2009	trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	DSMZ 19703
<i>Bifidobacterium boum</i>	Scardovi et al. 1979	bachor skotu	DSMZ 20432
<i>Bifidobacterium breve</i>	Reuter 1963	trávicí trakt kojence	DSMZ 20213
<i>Bifidobacterium callimiconis</i>	Duranti et al. 2019	tamarín skákavý (<i>Callimico goeldii</i>)	LMG 30938
<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	Modesto et al. 2018	výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	DSMZ 103152
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	Endo et al. 2012	výkaly kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	DSMZ 23973
<i>Bifidobacterium canis</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2020	psí výkaly (<i>Canis</i>)	DSMZ 105923
<i>Bifidobacterium castoris</i>	Duranti et al. 2019	bobr evropský (<i>Castor fiber</i>)	LMG 30937
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> subsp. <i>catenulatum</i>	Scardovi a Crociani 1974	lidská stolice	DSMZ 16992
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> subsp. <i>kashiwanohense</i>	Morita et al. 2011	stolice zdravých kojenců	DSMZ 21854
<i>Bifidobacterium catulorum</i>	Modesto et al. 2018	výkaly kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	DSMZ 103154
<i>Bifidobacterium cebidarum</i>	Duranti et al. 2020	výkaly tamarína skákavého (<i>Callimico goeldii</i>)	LMG 31469
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Scardovi et al. 1979	výkaly selat (<i>Sus</i>)	DSMZ 20434
<i>Bifidobacterium choloepi</i>	Modesto et al. 2020	výkaly lenochoda dvouprstého (<i>Choloepus didactylus</i>)	BCRC 81222
<i>Bifidobacterium commune</i>	Praet et al. 2015	trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	DSMZ 28792
<i>Bifidobacterium criceti</i>	Lugli et al. 2018	křeček polní (<i>Cricetus cricetus</i>)	LMG 30188
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	Delcenserie et al. 2013	syrové kravské mléko	LMG 23609

<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	Scardovi et al. 1979	výkaly králíka	DSMZ 20435
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Scardovi a Crociani 1974	zubní kaz	DSMZ 20436
<i>Bifidobacterium dolichotidis</i>	Dudanti et al. 2019	mara stepní (<i>Dolichotis patagonum</i>)	LMG 30941
<i>Bifidobacterium erythrocebi</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2020	výkaly kočkodana husarského (<i>Erythrocebus patas</i>)	DSMZ 109960
<i>Bifidobacterium eulemuris</i>	Michelini et al. 2016	výkaly lemura tmavého (<i>Eulemur macaco</i>)	DSMZ 100216
<i>Bifidobacterium faecale</i>	Choi et al. 2014	stolice kojence	JCM 19861
<i>Bifidobacterium felsineum</i>	Modesto et al. 2020	výkaly tamarína pinčoho (<i>Saguinus oedipus</i>)	DSMZ 103139
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Lauer 1990	trávicí trakt člověka	DSMZ 20093
<i>Bifidobacterium globosum</i>	Biavati et al. 1982	bachor	DSMZ 20092
<i>Bifidobacterium goeldii</i>	Duranti et al. 2019	tamarín skákavý (<i>Callimico goeldii</i>)	LMG 30939
<i>Bifidobacterium hapali</i>	Michelini et al. 2016	výkaly mláděte kosmana bělovouseho (<i>Callithrix jacchus</i>)	DSMZ 100202
<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	Lugli et al. 2018	tamarín vousatý (<i>Emperor tamarin</i>)	LMG 30297
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Scardovi a Trovatelli 1969	trávicí trakt včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)	DSMZ 20214
<i>Bifidobacterium italicum</i>	Lugli et al. 2018	výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	LMG 30187
<i>Bifidobacterium jacchi</i>	Modesto et al. 2019	výkaly tamarína pinčoho (<i>Saguinus oedipus</i>)	DSMZ 103362
<i>Bifidobacterium lemurum</i>	Modesto et al. 2015	výkaly lemura (<i>Lemur catta</i>)	DSMZ 28807
<i>Bifidobacterium leontopithecii</i>	Duranti et al. 2020	výkaly lvíčka zlatohlavého (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)	LMG 31471
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Mattarelli et al. 2008	trávicí trakt kojence	DSMZ 20088
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	Reuter 1963	trávicí trakt člověka	DSMZ 20219
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i>	Yanokura et al. 2015	výkaly selat (<i>Sus</i>)	DSMZ 28597
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	Mattarelli et al. 2008	výkaly prasat (<i>Sus</i>)	DSMZ 20211
<i>Bifidobacterium magnum</i>	Scardovi a Zani 1974	výkaly králíka	DSMZ 20222
<i>Bifidobacterium margollesii</i>	Lugli et al. 2018	kosman zakrslý (<i>Callithrix pygmaea</i>)	LMG 30296
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	Biavati a Mattarelli 1991	bachor skotu	DSMZ 6492
<i>Bifidobacterium minimum</i>	Biavati et al. 1982	kanalizace	DSMZ 20102
<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	Watabe et al. 2009	kumys	DSMZ 21395
<i>Bifidobacterium moraviense</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2020	výkaly primátů	DSMZ 109958
<i>Bifidobacterium moukalabense</i>	Tsuchida et al. 2014	výkaly gorily nížinné (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	DSMZ 27321
<i>Bifidobacterium myosotis</i>	Michelini et al. 2016	výkaly kosmana bělovouseho (<i>Callithrix jacchus</i>)	DSMZ 100196
<i>Bifidobacterium oedipodis</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2020	výkaly tamarína pinčoho (<i>Saguinus oedipus</i>)	DSMZ 109957

<i>Bifidobacterium olomucense</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2020	výkaly tamarína bělovousého (<i>Saguinus mystax</i>)	DSMZ 109959
<i>Bifidobacterium panos</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2020	výkaly šimpanze učenlivého (<i>Pan troglodytes</i>)	DSMZ 109963
<i>Bifidobacterium parmae</i>	Lugli et al. 2018	kosman zakrslý (<i>Callithrix pygmaea</i>)	LMG 30295
<i>Bifidobacterium porcinum</i>	Zhu et al. 2003	výkaly selat (<i>Sus</i>)	DSMZ 17755
<i>Bifidobacterium primatium</i>	Modesto et al. 2020	výkaly tamarína pinčoho (<i>Saguinus oedipus</i>)	DSMZ 100687
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Scardovi et al. 1979	stolice kojenců	DSMZ 20438
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Mitsuoka 1969	výkaly prasat (<i>Sus</i>)	DSMZ 20099
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	Simpson et al. 2004	trávicí trakt prasat (<i>Sus</i>)	DSMZ 22366
<i>Bifidobacterium pullorum</i> subsp. <i>gallinarum</i>	Watabe et al. 1983	slepé střevo kuřete	DSMZ 20670
<i>Bifidobacterium pullorum</i> subsp. <i>pullorum</i>	Trovatelli et al. 1974	výkaly slepice	DSMZ 20433
<i>Bifidobacterium pullorum</i> subsp. <i>saeculare</i>	Nouioui et al. 2018	výkaly králíka	DSMZ 6531
<i>Bifidobacterium ramosum</i>	Michelini et al. 2017	výkaly tamarína pinčoho (<i>Saguinus oedipus</i>)	DSMZ 100688
<i>Bifidobacterium reuteri</i>	Endo et al. 2012	výkaly kosmana zakrslého (<i>Callithrix jacchus</i>)	DSMZ 23975
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	Biavati a Mattarelli 1991	bachor skotu	DSMZ 6489
<i>Bifidobacterium saguini</i>	Endo et al. 2012	výkaly tamarína žltorukého (<i>Saguinus midas</i>)	DSMZ 23967
<i>Bifidobacterium samirii</i>	Duranti et al. 2019	kotul amazonský (<i>Saimiri boliviensis peruviansis</i>)	LMG 30940
<i>Bifidobacterium scaligerum</i>	Modesto et al. 2020	výkaly tamarína pinčoho (<i>Saguinus oedipus</i>)	DSMZ 103140
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Hoyles et al. 2002	lidská krev	DSMZ 13734
<i>Bifidobacterium simiarum</i>	Modesto et al. 2020	výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	DSMZ 103153
<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	Endo et al. 2012	výkaly tamarína žltorukého (<i>Saguinus midas</i>)	DSMZ 23968
<i>Bifidobacterium stercoris</i>	Reuter 1963	stolice člověka	DSMZ 24849
<i>Bifidobacterium subtile</i>	Biavati 1982	kanalizace	DSMZ 20096
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	Dong et al. 2000	odpadní voda	DSMZ 15837
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	Mitsuoka 1969	výkaly prasat (<i>Sus</i>)	DSMZ 20210
<i>Bifidobacterium tibiigranuli</i>	Eckel et al. 2020	vodní kefir	DSMZ 108414
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	Michelini et al. 2016	výkaly kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	DSMZ 100201
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>	Okamoto et al. 2008	zubní plak křečka	DSMZ 17777
<i>Bifidobacterium vansinderenii</i>	Duranti et al. 2017	výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	LMG 30126
<i>Bifidobacterium xylocopae</i>	Alberoni et al. 2019	trávicí trakt drvodělky fialové (<i>Xylocopa violacea</i>)	DSMZ 104955

Vysvětlivky:

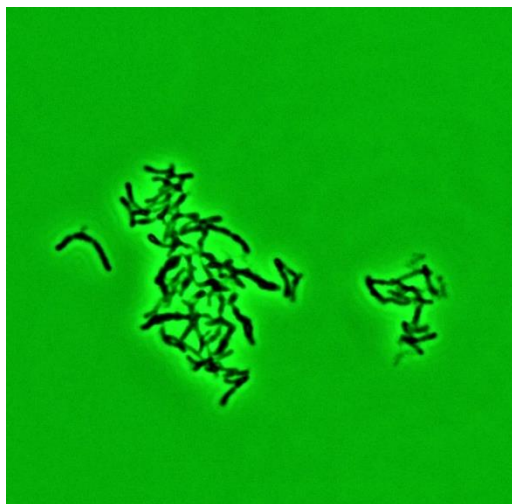
- BCRC – Bioresource collection and research center (China) – Centrum pro sběr a výzkum biologických zdrojů (Čína)
- DSMZ – Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen / Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur
- JCM – Riken bioresource research center (Japan) – Centrum výzkumu biodrojí Riken (Japonsko)
- LMG – Bacteria Collection Laboratorium voor Microbiologie University Gent / Sbírnka bakterií mikrobiologické laboratoře na univerzitě v Gentu

3.2.2 Fenotypové a morfologické vlastnosti bifidobakterií

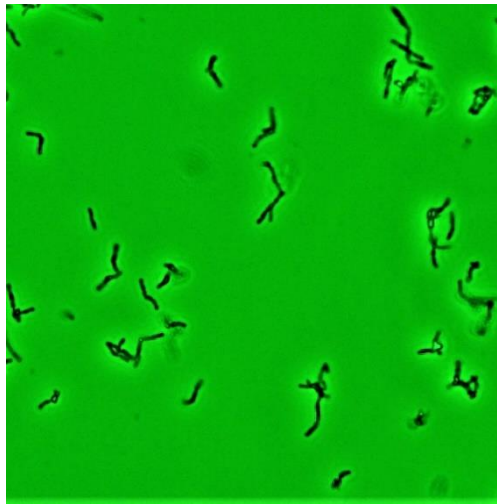
Bifidobakterie jsou tyčinky různých tvarů uspořádané ve hvězdicovitých agregátech, jak ukazuje **Obrázek 1**, nebo jednotlivé tyčinky s rozvětvenými konci do tvaru písmen X či Y, což ilustruje **Obrázek 2** (Scardovi 1986). Při Gramově barvení reagují pozitivně. Mají typickou grampozitivní strukturu, tvořenou silnou vrstvou peptidoglykanu s polysacharidy, proteiny a kyselinou teichoovou (Gomes & Malcata 1999). Kyselina lipoteichoová určuje hydrofobní charakter povrchu bifidobakterií a je stěžejní pro schopnost adheze k vnitřní stěně střeva (Iwasaki et al. 1990). Katalázový test vychází zpravidla negativní. Výjimkou jsou *B. indicum* a *B. asteroides*, které jsou kataláza pozitivní a rostou za přístupu vzduchu (Felis & Dellaglio 2007). Bifidobakterie jsou nemotilní a nesporotvorné (Scardovi 1986).

Ač se jedná zpravidla o obligátní anaeroby, některé druhy mohou být při specifických podmínkách aerotolerantní. Optimální růstová teplota je 37–41 °C. Hranice teplot růstu jsou druhově specifické. U některých druhů se dolní hranice růstu pohybuje až okolo 20 °C a horním limitem vybraných druhů může být až 46 °C. Výjimkou je *B. thermacidophilum*, které je schopno růstu i při teplotě 49,5 °C. Tento kmen je výjimečně odolný i vůči kyselosti okolního prostředí, a to až na hodnotu pH 4. Optimální pH pro počáteční růst bifidobakterií se nachází mezi 6,5 a 7,0.

Bifidobakteriální genom obsahuje mnoho genů, jejichž funkce se podílí na trávení nejen glukózy, ale i zpracování nestravitelných sacharidů a polyolů ve střevě hostitele. To je zřejmě důsledkem adaptace bifidobakterií na lidské tlusté střevo, protože ostatní mikroorganismy využívají častěji pouze jednodušší cukry např. zmiňovanou glukózu. Dalším předpokladem pro přežití a konkurenční výhody ve střevě je kromě utilizace komplexních sacharidů i schopnost ochrany bifidobakterií před makrofágy a jinými bakteriemi (Lee & O'Sullivan 2010). Bifidobakterie svojí schopností fermentovat tvoří kyselinu octovou a kyselinu mléčnou nejčastěji v molárním poměru 3 : 2. Dále také fermentací tvoří kyselinu mravenčí, etanol a sukcinát. Charakteristickou pro tento rod je přítomnost enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy štěpící fruktózo-6-fosfát (Scardovi 1986; Biavati et al. 2000; Broekaert et al. 2011; Hoover 2014).



Obrázek 1: Agregáty – *B. catenulatum*
(D. Resová)



Obrázek 2: rozvětvené tyčinky –
B. angulatum (D. Resová)

3.2.3 Metabolismus sacharidů

Bifidobakterie, jakožto střevní komenzálové pozitivně ovlivňují svého hostitele a degradují sacharidy přijaté v jeho stravě, které nedokáže sám hostitel trávit svými enzymy. Jedná se o rostlinné sacharidy (škrob, celulóza, pektiny, glukany, fruktany aj.) nebo sacharidy hostitele jako oligosacharidy mateřského mléka a muciny (Bottacini et al. 2014). Schopnost metabolizovat sacharidy je rozdílná u jednotlivých druhů bifidobakterií (Pokusaeva et al. 2011). Například *B. bifidum* a *B. longum* subsp. *infantis* využívají jako zdroj energie oligosacharidy mateřského mléka, zatímco bifidobakterie spojené s mikrobiotou dospělého, jako *B. longum* subsp. *longum* toho nejsou schopny, ale zachovaly si schopnost fermentace rostlinných oligosacharidů a základních pentózových cukrů (Sela & Mills 2010; Marcobal & Sonnenburg 2012). Mezi jednotlivými druhy bifidobakterií, nebo bifidobakteriemi a jinými střevními mikroorganismy existuje komenzální stav – cross-feeding, kdy si mikroorganismy navzájem vypomáhají v získání živné látky. Jednou možností je degradace sacharidů z mucinové slizniční vrstvy druhem *B. bifidum*, a následné využití degradovaných sacharidů druhem *B. breve*, jako zdroj energie. Tento vztah byl popsán *in vitro* (Egan et al. 2014). Druhým typem cross-feedingu je například vztah mezi *B. adolescentis* a bakteriemi tvořící butyrát fermentací laktátu a acetátu (Belenguer et al. 2006).

Bifidobakterie rozkládají polysacharidy na nízkomolekulární oligosacharidy, které následně mohou být enzymaticky rozloženy na monosacharidy. Mezi bifidobakteriální glykosidové hydrolázy řadíme například α -galaktosidázy a β -galaktosidázy (Pokusaeva et al. 2011). β -galaktosidázy jsou nezbytné pro růst bakterií na substrátech, jako je lidské mléko nebo mucin (Bottacini et al. 2014). Dalším enzymem, který vykazuje aktivitu u některých druhů bifidobakterií je β -glukosidáza, která může vytvořit výhodu pro hostitele, jelikož umožňuje využití rostlinných glukosidů jako zdroj energie. Jako pozitivní na β -glukosidázu se při enzymatických testech na substrátu s 4-nitrofenyl β -D-glukopyranosidem (PNP-G) ukázaly *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. catenulatum/pseudocatenulatum* a *B. dentium*. Naopak

negativní na β -glukosidázu se ukázala většina kmenů *B. bifidum* a *B. longum*. (Modrackova et al. 2020). Monosacharidy jsou poté dále přeměňovány na meziprodukty hexóзовé fermentační dráhy bifidobakterií, „*bifid shunt pathway*“. Na této metabolické dráze je nejdůležitější enzym fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza štěpící fruktózu-6-fosfát na erytrózu-4-fosfát a acetyl-1-fosfát. Reakce poskytuje 2,5 molekuly adenosintrifosfátu (ATP) na 1 mol glukózy, 1,5 molu acetátu a 1 mol laktátu (De Vries & Stouthamer 1967). Mohou vznikat i další organické sloučeniny. Tyto metabolity mohou vstřebat jaterní nebo střevní buňky hostitele a využít je jako zdroj energie (D'Argenio & Mazzacca 1999). Organické kyseliny navíc ve střevě způsobují nižší pH a lepší dostupnost některých minerálních látek jako je vápník a hořčík. Také stimulují absorpci vody z tlustého střeva. Dalším příznivým vlivem přítomnosti těchto kyselin je inhibice potenciálně patogenních bakterií (Wong et al. 2006; O'Callaghan & van Sinderen 2016).

3.2.4 Bifidobakterie a onemocněním GIT

V současné době je již známo, že střevní mikrobiota je nezbytná pro optimální vývoj hostitele a účastní se zajištění trvalé funkční homeostázy organismu (Konieczna et al. 2012). Různé kmeny rodu *Bifidobacterium* mohou pozitivně ovlivňovat řadu poruch GIT. Proto je vždy důležité analyzovat biologická data týkající se specifické probiotické povahy daného bifidobakteriálního kmene (Leahy et al. 2005).

Jedním z přínosů bifidobakterií je potenciál podpořit léčbu, případně zmírnit projevy mnoha nemocí, jako je například gastroenteritida, průjem, syndrom dráždivého tračníku, nedostatečné trávení laktózy, infekce *Helicobacter pylori* či zánětlivá onemocnění střev (Lata 2021). Bifidobakterie totiž v GIT fermentují velké množství oligosacharidů (Ventura et al. 2007). Mezi metabolity kromě organických kyselin, především octové a mléčné, v některých případech může patřit i peroxid vodíku (Maldonado et al. 2018). Dalším z důvodů obranyschopnosti organismu je produkce bakteriocinů, které pomáhají předcházet růstu patogenních mikrobů a zvýšit přirozenou obranyschopnost těla (Maldonado et al. 2018; Tijjani et al. 2020).

V poslední době jsou onemocněními GIT čím dál běžnější, a to především vlivem tzv. westernizace, což je životní styl charakterizován především vysokou spotřebou živočišných bílkovin a tuků a nízkým obsahem ovoce, zeleniny a vlákniny ve stravě (Cucinotta et al. 2021). Bylo prokázáno, že *B. longum* subsp. *infantis* snižuje závažnost příznaků u pacientů se syndromem dráždivého tračníku. Ochranné účinky by mohly souviset s imunoregulační aktivitou (Konieczna et al. 2012). Jedním z nejhojněji se vyskytujících zánětlivých onemocnění střev je ulcerativní kolitida. Je způsobena změnou střevní mikrobioty, imunitou, genetickou predispozicí a v neposlední řadě faktory prostředí. Jako úspěšná metoda při podpoře hojení sliznice a řešení symptomů tlustého střeva se ukázalo intrakolonické podání *B. animalis* subsp. *lactis* (2×10^{14} KTJ/g) v kombinaci s oligosacharidem xyloglukanem (4 g). Zřetelné výsledky byly pozorovány již po 6 týdnech (Bozkurt 2021). Dalším častým zánětlivým onemocněním střev je Crohnova choroba. Bylo zjištěno, že při tomto onemocnění jsou počty bifidobakterií v mikrobiotě pacientů nestandardně nízké. Přestože má enterální výživa, která je těmto pacientům podávána, dle současných studií pozitivní vliv na projevy Crohnovy choroby, vliv na počet kultivovatelných komenzálních bakterií ve střevě nebyl významný (Modrackova et al. 2019a).

Mezi onemocnění trávicího traktu také patří rekurentní infekce způsobené *Clostridium difficile*. K přemnožení *C. difficile* nejčastěji vede narušení střevní mikrobioty antibiotickou léčbou. Projevy této infekce mají široké rozpětí, od mírného průjmu až po život ohrožující stavy (Valdés-Varela et al. 2016). Rod *Bifidobacterium* a *Bacteroides* vykazují negativní korelaci s výskytem toxigenní *C. difficile* (Kim et al. 2020). Vliv bifidobakterií na *C. difficile*, konkrétně *B. longum* a *B. breve*, byl testován *in vitro* v přítomnosti fruktooligosacharidů, nikoli však inulinu. Výsledkem bylo významné snížení růstu *C. difficile* a toxicity jejích supernatantů. K vyvození pevných závěrů by ale bylo nutné provést další studie *in vivo* (Valdés-Varela et al. 2016).

Snížené množství bifidobakterií v trávicím traktu pozorujeme i u celiaků (Martinello et al. 2017). Celiakie je chronická porucha tenkého střeva vyvolávající zánět po konzumaci lepku. Jedná se o autoimunitní onemocnění vyskytující se u jedinců s genetickou predispozicí (De Palma et al. 2010). Střevní dysbióza při celiakii je charakteristická nárůstem Gram-negativních druhů bakterií a snížením počtu bifidobakterií a laktobacilů (Losurdo et al. 2016). Počet bifidobakterií izolovaných ze stolice můžeme zvýšit pravidelným užíváním probiotik, nelze tím však dosáhnout hodnot zdravého jedince (Martinello et al. 2017).

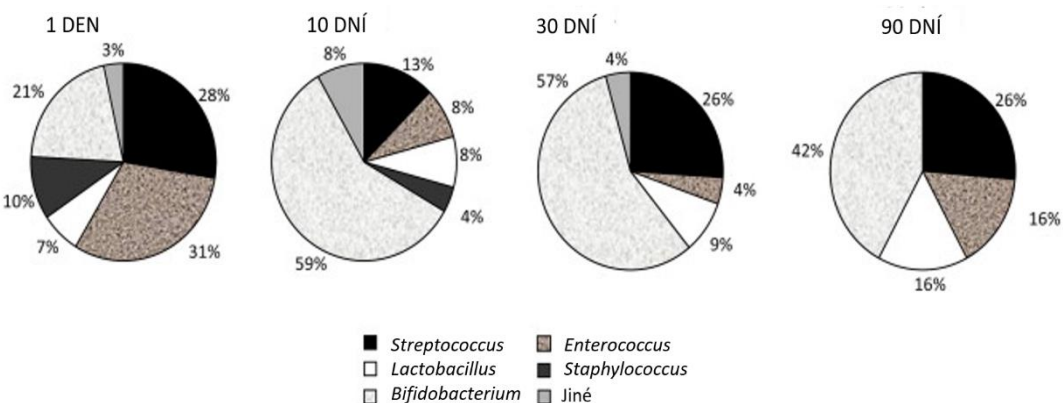
Intolerance laktózy se také řadí mezi poruchy GIT. Příčinou je snížení produkce enzymu β -galaktosidázy (laktázy), jehož hladina se po odstavu či v dětství velmi snižuje. Hlavními projevy je plynatost, bolesti břicha a průjem po požití laktózy (Roškar et al. 2017). Studie, která hodnotila vliv příjmu jogurtu obohaceného o probiotické bakterie *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium* spp. na pacienty trpící intolerancí laktózy se ukázala jako úspěšná. Zařazení těchto probiotik do stravy dokázalo zmírnit příznaky intolerance laktózy (Masoumi et al. 2021). Další studie zabývající se intolerancí laktózy, která testovala vliv suplementace *B. animalis* subsp. *animalis* a *Lactobacillus plantarum* po dobu 6 týdnů v první části u slepých vzorků ukazovala vysoký placebo efekt, takže výsledky byly podobné jako u jedinců přijímajících aktivní látku. Výsledky na konci studie ovšem ukázaly výrazné zlepšení stavu u jedinců, kteří požívaly probioticky účinné rody (Roškar et al. 2017).

3.3 Faktory ovlivňující výskyt bifidobakterií

Zastoupení bifidobakterií ve střevní mikrobiotě je ovlivněno řadou faktorů. Prvotním faktorem je způsob porodu a výběr stravy již od prvních dní (volba mateřského mléka nebo syntetické kojenecké výživy). Strava je podstatným faktorem po celý život, a to jak zařazování potravin s obsahem probiotických bakterií, tak i množství probiotických potravin. Negativní vliv na stav bifidobakterií v trávicím traktu mají onemocnění a některá léčiva, především antibiotika. Negativní vliv antibiotik je možné potlačit suplementací probiotických výživových doplňků, nebo kombinací probiotik a prebiotik v synbiotických doplňcích stravy. Dále jsou blíže popsány nejdůležitější z faktorů ovlivňujících bifidobakterie ve střevním mikrobiomu člověka.

3.3.1 Porod a kojení

Kolonizace GIT začíná hned po narození. První bakterie, které kolonizují střeva, pocházejí z porodního ústrojí matky a zahrnují aerobní i anaerobní bakterie, jako jsou *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp. a *Bifidobacterium* spp. (McCracken & Lorenz 2001). Procentuální zastoupení bakterií ve stolici kojenců je zobrazuje **Obrázek 3**. Můžeme zde pozorovat porovnání množství v 1, 10, 30 a 90 dnech po porodu.



Obrázek 3: zastoupení bakteriálních rodů ve výkalech kojenců (Solis et al. 2010)

Nenapadená lidská placenta byla vždy považována za sterilní prostředí, ale Satokari et al. ve svých výzkumech prokázal přítomnost DNA bifidobakterií i laktobacilů na placentě. Kultivace na neselektivních médiích ovšem byla neúspěšná. Prokázalo se ale, že přenos bakteriální DNA přes placentu matky na dítě je možný, tudíž k mikrobiálnímu osídlení organismu pravděpodobně dochází již v prenatálním období (Satokari et al. 2009). Výsledný mikrobiom novorozence je nicméně velmi závislý na způsobu porodu. Při běžném vaginálním porodu je mikrobiom matky a potomka velmi podobný. V případě porodu císařským řezem se mikrobiom dítěte ale zřetelně liší (Bäckhed et al. 2015). V druhém případě totiž novorozeně při porodu nemají děložní čípek a pochvu, což je důležitý kontakt, při kterém dochází ke kolonizaci dítěte fekální a vaginální mikrobiotou matky (Goldenberg et al. 2008). Vertikální

přenos z matky na dítě byl potvrzen především u druhů *B. breve* a *B. longum*. Tyto bakterie pak byly hojně zastoupeny ve výkalech potomka a to až po dobu 6 měsíců (Milani et al. 2015).

Kojenecká mikrobiota se nevyznačuje vysokou rozmanitostí a složitostí (Arboleya et al. 2016). Významnými obyvateli trávicího traktu kojenců jsou právě bifidobakterie. Mezi dominantní druhy patří *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. breve* dále pak také *B. bifidum* a *B. pseudocatenulatum* (Underwood et al. 2015).

Je prokázáno, že významný vliv na mikrobiotu dítěte v tomto období má kojení. Lidské mléko obsahuje kompletní spektrum látek, které uspokojuje výživové požadavky novorozence. V jeho složení nalezneme základní nutrienty jako je laktóza, mastné kyseliny a bílkoviny, které vstřebává tenké střevo kojence (Neu 2007). Další bioaktivní látky potřebné pro výživu kojence se v lidském mléku nacházejí v mnohem přijatelnější formě, než v syntetických náhražkách na bázi kravského mléka (Hernell 2011). Jednou z podstatných složek lidského mléka pro formování mikrobioty kojence jsou oligosacharidy, které neslouží jako zdroj energie pro kojence, ale jsou základem pro rozvoj jeho střevní mikrobioty, především bifidobakterií (Thomson et al. 2018). Lidské mléko také obsahuje vlastní mikrobiotu, jejíž původ zůstává nejasný. Kojení pak přirozeně způsobuje přenos mikroorganismů a dalších látek z matky na dítě. Bylo prokázáno, že lidské mléko je jedním z prvních hlavních zdrojů bakterií pro střevo kojence, protože dítě, které pozře až 800 ml mléka za den, pozře současně i bakterie v množství 1×10^5 až 1×10^7 KTJ/g (Soto et al. 2014). Je zajímavé, že bifidobakteriální kmeny byly ve stolici novorozenat objeveny již po pěti dnech kojení, zatímco u nekojených novorozenat došlo při osídlování střev bifidobakteriemi ke značnému opoždění (Favier et al. 2003). Modulace mikrobioty probíhá nejintenzivněji do 1–2 let života. Po 3. roce života se osídlení střev začíná podobat dospělému jedinci (Voreades et al. 2014; Arboleya et al. 2016).

Bifidobakterie, jako jedny z mála mikroorganismů kojeneckého trávicího traktu dokážou získat energii z lidského mléka, což je pravděpodobně důvodem jejich početní převahy v prvním roce života (Garrido et al. 2013). Adaptace jednotlivých kmenů byla zřejmě odlišná, jelikož například *B. bifidum* je schopno využívat jak sacharidy mucinového typu, tak oligosacharidy mateřského mléka. Zatímco *B. longum* subsp. *infantis* je schopno degradovat pouze oligosacharidy mateřského mléka (Turroni et al. 2010).

Bifidobakterie navíc u kojenců hrají také důležitou roli při udržování zdraví, prevenci gastrointestinálních poruch a modulaci střevní mikrobioty. Světová zdravotnická organizace uvedla, že probiotické bakterie jsou nejdůležitější pro vývoj imunitního obranného systému (FAO/WHO 2002; Rajyalakshmi et al. 2019). Roli hrají i při snižování rizika infekcí dýchacích cest, zánětlivých onemocnění trávicího traktu, obezité či diabetes mellitus 2. typu (Georgieff et al. 2012). První roky života jsou tedy významným okamžikem pro modulaci střevní mikrobioty a podporu zdraví v pozdějším životě (Derrien et al. 2019). Bylo dokázáno, že *B. longum* subsp. *infantis* je mnohem účinnější při kolonizaci střeva než *B. animalis* subsp. *lactis*, a to i u kojenců krmených mateřským mlékem i u kojenců s náhradní výživou (Phavichitr et al. 2021). Po odstavení kojence dominance bifidobakterií v trávicím traktu klesne (Bottacini et al. 2014).

Mimo to se ukazuje, že dostatečné množství bifidobakterií v trávicím traktu dítěte může protektivně souviset i s alergickým astmatem nebo atopickou dermatitidou. Při porovnávání stolice zdravých dětí a dětí s těmito onemocněními bylo množství vykultivovaných bifidobakterií o třetinu vyšší u zdravých jedinců (Hatipoglu et al. 2014). Dalším polem

působení jsou průjmová onemocnění, kde suplementace *B. longum* subsp. *infantis* a *B. bifidum* v kombinaci s laktobacily byly při léčbě a prevenci u kojenců hodnoceny pozitivně (Saavedra et al. 1994; Lee et al. 2001).

3.3.2 Strava a suplementace probiotik

Současná definice probiotiky nazývá živé organismy, které při správném podání dostatečného množství mikroorganismů poskytují hostiteli přínos (Hill et al. 2014; Cunningham et al. 2021). Konzumace probiotických kultur má příznivé účinky nejen na člověka, ale i na domácí a ostatní zvířata (Hoover 2014). Tyto kultury zejména umožňují udržovat stálost vnitřního prostředí. Navíc působí preventivně proti osídlení GIT patogenními organismy (Fuller 1989). Suplementace probiotik se u těhotných žen také ukázala jako účinná při prevenci a léčbě infekce močových cest či bakteriálních vaginóz (Nova et al. 2007).

Probiotika mohou být přijímána ve formě potravin, nebo jako doplněk stravy. V obou formách je nezbytné dodržovat zásady a postupy pro přežití probiotických bakterií až do místa účinku. Na produktech obsahujících probiotické kultury by mělo být uvedeno množství životaschopných mikrobů v době výroby a správný způsob skladování. Tyto informace spotřebiteli garantují uvedené množství probiotik v termínu trvanlivosti výrobku (Rajyalakshmi et al. 2019).

Účinné probiotikum by mělo splňovat několik zásad: vykazovat příznivý účinek na hostitele, být nepatogenní a netoxické, skládat se z velkého množství životaschopných buněk, přežít cestu GIT, mít dobré senzorycké vlastnosti, zůstat vitální i během skladování či používání a izolace by měla proběhnout ze stejného druhu jako předpokládaný hostitel (Fuller 1992; Collins & Gibson 1999). Jejich kolonizační schopnost může být specifická, jak druhově, tak i na úrovni kmene (Bunešová et al. 2012).

Nejčastějším zdrojem probiotických bakterií ve stravě jsou fermentované mléčné výrobky, jejichž zdravotní přínos byl známý dlouho předtím, než byly objeveny jednotlivé mikroorganismy (Leahy et al. 2005). Fermentované mléčné výrobky běžně obsahují *B. animalis*, v jogurtech můžeme dále nalézt i *B. longum*. V některých zmrzlinách se setkáme s *B. animalis* subsp. *lactis*, také v sýrech a sýrových výrobcích je běžně přítomen tento druh (Ranadheera et al. 2010). Probiotika byla dlouho spojována pouze s potravinami, nicméně v dnešní době roste trend suplementovat je také v kapslích jako doplňky stravy, což by v případě všestranné stravy a nenarušeného mikrobiomu nemělo být potřebné. Volba vhodných substrátů pro dodání probiotik by měla být výrazně zohledněna při vývoji funkčních probiotických potravin (Ranadheera et al. 2010).

Většina mikroorganismů s probiotickým využitím kromě bifidobakterií se řadí do rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Streptococcus* (Lata 2021). Hlavní skupinou probiotických mikroorganismů jsou obecně bakterie mléčného kvašení (Collins & Gibson 1999).

Složení probiotik by mělo být podobné tomu, které se nachází v trávicím traktu hostitele přirozeně a má velký vliv na jeho zdraví. Probiotika podporují zdraví střev, mají vliv na hladinu cholesterolu, krevní tlak či imunitní odpovědi organismu (Lata 2021).

Jako probiotika se používají především ta, která hostitel nestráví a následně zvyšují počty bifidobakterií a dalších probiotických bakterií ve střevech (Ventura et al. 2007). Rod *Bifidobacterium* je jeden z nejstudovanějších probiotických rodů, který je účinný při udržení

a obnově homeostázy (Sarkar & Mandal 2016). Jako substrát růstu pro probiotické rody včetně rodu *Bifidobacterium* mohou být použity například přírodní gummy a škrob. Mají vhodné technologické vlastnosti a pro spotřebitele jsou bezpečné a biologicky odbouratelné (Modrackova et al. 2019b). V potravinářství se jako probiotikum často využívá *B. animalis* subsp. *lactis* (Milani et al. 2013). Ač jsou komerčně používané druhy bifidobakterií nepatogenní a bezpečné pro běžnou populaci, u pacientů se špatným zdravotním stavem nebo zhoršenou imunitou je nutné zvážit případná zdravotní rizika (Rajyalakshmi et al. 2019). Komplikace by mohly nastat při užívání probiotik jedinci po operaci trávicího traktu, při aktivním zánětu, nebo po imunosupresivní či radiační terapii. Nevhodné je také užívání v raných obdobích života, především u předčasně narozených dětí (Frič 2011).

3.3.3 Prebiotika

Koncept prebiotik je podobný jako u probiotik a tím je příznivý vliv na zdraví skrz střevní mikrobiotu, jedná se ale o odlišný mechanismus (Leahy et al. 2005). Prebiotiky můžeme označit nestravitelné složky potravy, které díky své nestravitelnosti prochází GIT až do tlustého střeva, kde mohou pozitivně ovlivňovat růst či aktivitu některých bakteriálních druhů, což může znatelně ovlivnit složení mikrobiomu. Prebiotika jsou většinou nestravitelné oligosacharidy, především pak fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, xylooligosacharidy a inulin (Gibson & Roberfroid, 1999). Aktuálně platná definice označuje jako prebiotika substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy, což přináší zdravotní benefity. Nejčastějším místem působení je GIT, ale méně často se můžeme setkat s působením prebiotik skrz kožní nebo vaginální mikrobiotu (Gibson et al. 2017). Některé formy prebiotik se přirozeně vyskytují v potravinách, jako jsou obilniny, luštěniny, ovoce a zelenina. Zařazení prebiotik do stravy a jejich suplementace mají příznivý vliv na zdraví. Například tím může být pozitivně ovlivněno právě množství bifidobakterií v trávicím traktu, snížení hladiny cholesterolu, zmírnění gastrointestinálních poruch nebo zvýšení imunomodulačních účinků. V neposlední řadě strava bohatá na prebiotika a vlákninu zvyšuje sytost (Lockyer & Stanner 2019). Podávání dávek čištěných glukooligosacharidů se ukázalo jako prospěšné také při problémech s trávením a tolerancí laktózy (Azcarate-Peril et al. 2017).

3.3.4 Synbiotika

Výživový doplněk obsahující kombinaci probiotik a prebiotik v jednom preparátu můžeme nazvat jako synbiotika (Frič 2011). Vhodná kombinace probiotik a prebiotik podporuje synergický účinek (Ranadheera et al. 2010). V případě bifidobakterií jsou substrátem pro udržení živé složky např. fruktooligosacharidy. Způsobují dostatečný a snadno dostupný přísun specifického substrátu k fermentaci, který daný mikroorganismus potřebuje (Collins & Gibson 1999).

3.3.5 Antibiotika

Lidský GIT může být často vystavován působení antibiotik z důvodu léčby či prevence infekčních chorob způsobených bakteriemi a houbami. Každá antibiotická léčba má vliv na modulaci mikrobiomu ve střevě, protože ne všechna antibiotika jsou dostatečně selektivní a mohou tak působit ne jen výhradně na patogeny (Duranti et al. 2017). Tento konvenční způsob sice patogeny vymýtí, ale často ponechává střeva méně kolonizovaná a tím náchylnější k opětovné nákaze (Sarkar & Mandal 2016). Bylo prokázáno, že antibiotická terapie snižuje celkovou bakteriální rozmanitost a postihuje až 33 % mikrobiální populace (O'Sullivan et al. 2012). U mladých dospělých po krátkodobém širokospektrém antibiotickém zásahu je do 45 dnů možná téměř komplexní obnova mikrobiomu. U těchto respondentů byly ale chybějící rody i po 180 dnech stále nezjistitelné (Palleja et al. 2018). Nežádoucím následkem léčby antibiotiky může být průjem, jeho výskyt i trvání však lze značně omezit současným užíváním probiotických mikroorganismů, jako je například *B. longum*, případně v kombinaci s *Lactobacillus acidophilus* (Orrhage et al. 1994).

4 Metodika

Součástí této bakalářské práce bylo stanovení bifidobakterií z fekálních vzorků od 15 lidských dárců bez gastrointestinálních obtíží a následná identifikace pro jejich zařazení do sbírky mikroorganismů Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze.

4.1 Příprava médií

Nejprve byly připraveny zkumavky s fyziologickým roztokem (K_2HPO_4 1,2 g/l, KH_2PO_4 0,333 g/l; oba Lach-Ner, Czechia; 75 % roztok), glycerinem (VWR, USA; 25 % roztok) a doplněný perlami podle potřeby pro homogenizaci vzorku. Připravené zkumavky sloužily pro odběry fekálních vzorků. Pro mikrobiologický rozbor byly připraveny ředící řady, **Tabulka 3**, a pro izolaci a kultivaci kolonií neselektivní Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem (WSP; oba Oxoid, UK), **Tabulka 4**. Anaerobní prostředí v těchto roztocích bylo zajištěno metodou roll-tube podle Hungate (1969). Odstranění kyslíku probíhalo ve vertikální koloně s obsahem mědi (ve formě hrubých měděných pilin). Kolona byla cívkou zahřívána na 350 °C; redukce mědi bylo dosaženo průchodem plynného vodíku kolonou zespodu vzhůru. Aby bylo zabráněno výbuchu bylo nutné trubici naplnit oxidem uhličitým, kvůli vytlačení veškerého kyslíku. Oxid uhličitý případně dusík byl do kolony vpouštěn pomalu – probubláváním roztoku. Po zbavení kyslíku následovala sterilace média.

Tabulka 3: Složení ředících řad

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Trypton	5 g
Nutrient broth	5 g
Yeast extract	2,5 g
Tween ® 80	0,5 ml
Cystein	0,25 g

Tabulka 4: Složení neselektivního média pro odebrané izoláty

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Wilkins-chalgren anaerobe agar	33 g
Soya pepton	5 g
Tween ® 80	1 ml
Cystein	0,5 g

Pro stanovení celkového počtu anaerobních bakterií kultivací bylo připraveno médium Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem (WSP; oba Oxoid, UK), **Tabulka 5**. Pro detekci a kvantifikaci bifidobakterií byly použity dvě selektivní modifikovaná média WSP. Do prvního byla přidána kyselina octová (1 ml/l; Sigma-Aldrich, USA) a mupirocin (100 mg/l; Oxoid, UK), **Tabulka 6** podle Rada & Petr (2000) (Rada & Petr 2000); do druhého mupirocin (100 mg/l; Oxoid, UK), norfloxacin (200 mg/l; Oxoid, UK) a kyselina octová (1 ml/l; Sigma-Aldrich, USA), **Tabulka 7** podle (Vlková et al. 2015).

Tabulka 5: Složení média na celkové počty anaerobních bakterií (WSP)

Látka	Množství
Voda	100 ml
Wilkins-chalgren agar	4,3 g
Soya pepton	0,5 g
Cystein	0,05 g
Tween ® 80	0,1 ml

Tabulka 6: Složení média WSP s mupirocinem a octovou kyselinou (WSP-MUP)

Látka	Množství
Voda	100 ml
Wilkins-chalgren agar	4,3 g
Soya pepton	0,5 g
Cystein	0,05 g
Tween ® 80	0,1 ml
Mupirocinové disky	1 balení
K. octová	100 µl

Tabulka 7: Složení média WSP s norfloxacinem, mupirocinem a octovou kyselinou (WSP-NORF)

Látka	Množství
Voda	90 ml
Wilkins-chalgren agar	4,3 g
Soya pepton	0,5 g
Cystein	0,05 g
Tween ® 80	0,1 ml
Mupirocinové disky	1 balení
Roztok norfloxacinu (1 mg NORF/1 ml dH ₂ O/10 µl k. octové)	10 ml

4.2 Mikrobiologický rozbor fekálních vzorků

Všechny uvedené mikrobiologické analýzy fekálních vzorků byly provedeny s informovaným souhlasem dárců. U odebraného vzorku stolice bylo provedeno zvážení a přepočítání navážky pro přesné převedení vzorku do druhého ředění. Po řádné homogenizaci vzorku vortexem bylo injekční stříkačkou ze zkumavky odebráno vypočtené množství a převedeno do druhého ředění. Vzorek byl následně sériově naředěn desítkovým ředěním až do koncentrace 10^{-9} . Mikrobiologický rozbor byl proveden deskovou metodou. Do připravených Petriho misek o průměru 35 mm bylo aplikováno 0,5 ml inokula, které bylo zalito odpovídajícím agarem. Uzavřené Petriho misky byly kultivovány v anaerostatu za anaerobních podmínek vytvořených pomocí AnaeroGenu (Thermo Scientific, UK) při 37 °C po dobu 48 hodin.

4.3 Kvantifikace a izolace narostlých kolonií

Po 48 hodinách bylo spočítáno množství narostlých kolonií na každé počitatelné Petriho misce, vynásobeno dvěma a dále byl vypočítán dekadický logaritmus počtu kolonií tvořících jednotku na gram (\log_{10} KTJ/g).

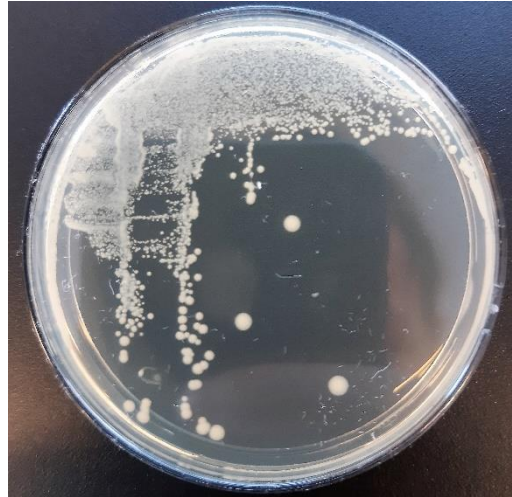
Před samotnou kvantifikací byly odebrány izoláty narostlých kolonií vždy ze selektivních médií pro bifidobakterie. Za aseptických podmínek bylo odebráno 1 μ l mikrobiologickou kličkou zhruba 6 morfologicky odlišných kolonií z každého vzorku a přeneseno do předem připravených zkumavek s anaerobním prostředím (Hungate 1969) s neselektivním médiem pro kultivaci odebraných izolátů při 37 °C po dobu 24 hodin.

4.4 Identifikace izolátů

Po 24hodinové kultivaci izolátů byl zkontrolován nárůst bakterií ve zkumavkách, **Obrázek 4** a jejich morfologie a čistota pod mikroskopem s fázovým kontrastem (Eclipse E200, Nikon, Japan). Na základě variability byly vybrány kultury pro další identifikaci. Vybrané kultury byly rozetřeny 10 μ l kličkou na Petriho misky o průměru 35 mm s předem připraveným neselektivním WSP agarem. Misky byly kultivovány dnem vzhůru v anaerostatu spolu s AnaeroGenem po dobu 48 hodin při 37 °C, **Obrázek 5**. Z každé Petriho misky byla odebrána jedna kolonie 1 μ l kličkou, která byla přenesena do zkumavky s neselektivním WSP médiem pro kultivaci, **Tabulka 5**. V případě, že se na jedné misce nacházelo více kolonií s různými kultivačními charakteristikami, bylo odebráno od každé z nich několik kopií. Následovala kultivace při 37 °C po dobu 24 hodin. Narostlé kultury byly opět zkontrolovány mikroskopicky. V případě kontaminace bylo nezbytné kulturu opět přečistit, tzn. přetřít ji kličkou na Petriho misku s WSP médiem. U čistých kultur se mohlo přistoupit k dalším postupům identifikace.



Obrázek 4: Nárůst izolátů po 24 hodinách (zleva: agregáty, rovnoměrný zákal, peleta na dně) (*D. Resová*)



Obrázek 5: Vykultivované kolonie na Petriho misce (*D. Resová*)

4.4.1 Detekce enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy (F6PPK test)

Bifidobakterie mají unikátní vlastnost a to, že pro štěpení sacharidových hexóz používají enzym F6PPK. Detekce tohoto enzymu je používána pro rodovou identifikaci bifidobakterií (Vlková & Rada 2013). Pro zjištění přítomnosti enzymu je nezbytné narušit buňky bakterií, aby byl jejich obsah převeden do roztoku. Pokud buňka obsahuje F6PPK, tak po přidání jednotlivých roztoků dochází k fialovému zbarvení. Pokud vzorek zůstane žlutý, jedná se o negativní reakci a nebyla tedy potvrzena rodová příslušnost.

Testování proběhlo v 2ml zkumavkách (Eppendorf; Slovakia), do kterých bylo převedeno 1,5 ml kultury. Řádně označené a uzavřené zkumavky byly odstředěny centrifugou rychlostí 14 500 otáček po dobu 2 minut. Supernatant byl slit a peleta resuspendována v 75 μ l Bifipufu. Dále bylo napipetováno 50 μ l CTAB a následně bylo vše řádně zvortexováno. Po 5minutové kultivaci za pokojové teploty bylo přidáno 31 μ l roztoku 2 a 50 μ l roztoku 7. Následovala 30minutová kultivace při 37 °C. Následně bylo do vzorků napipetováno 188 μ l roztoku 3 a inkubováno 10 minut při pokojové teplotě. Posledním krokem bylo postupné přidání 125 μ l roztoků 4, 5 a 6. Zbarvil-li se roztok do fialova, byl test vyhodnocen jako pozitivní, **Obrázek 6**. Složení roztoků popisuje **Tabulka 8** (Orban & Patterson 2000).

Tabulka 8: Roztoky pro F6PPK test

Bifipuf	0,12 g K_2HPO_4 ; 0,33 g KH_2PO_4 ; 0,05 g cystein; 100 ml H_2O
Roztok 2	roztok NaF (0,6 g/100 ml H_2O), Na-iodoacetát (1 g/100 ml H_2O)
Roztok 3	roztok hydroxylaminu (13,9 g/100 ml), pH 6,5 (NaOH)
Roztok 4	15% roztok TCA (trichloroctové kyseliny)
Roztok 5	4 M HCl
Roztok 6	roztok $FeCl_3$ (5 g/100 ml H_2O ; + 310 μ l HCl)
Roztok 7	fruktózo-6-fosfát (substrát pro působení enzymu, 1 dávka = 6,6 mg/0,02 ml H_2O)
CTBA	roztok detergentu cetridium bromidu (CTAB, 45 mg/100 ml H_2O)



Obrázek 6: Pozitivní (vlevo) a negativní (vpravo) reakce na test F6PPK (D. Resová)

4.4.2 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS, neboli hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem je nástroj pro mikrobiální identifikaci a diagnostiku. Mikroorganismy jsou identifikovány buď z intaktních buněk, nebo buněčných extraktů. Analyzovaný vzorek se následně porovnává se spektrální databází a je určen rod, druh, poddruh či kmen zkoumaného mikroorganismu (Singhal et al. 2015).

1 ml kultury byl stočen na centrifuze při rychlosti 14 500 otáček po dobu dvou minut. Supernatant byl slit a usazená peleta resuspendována v 500 μ l 70% etanolu. Roztok byl zvortexován a následně stočen při 14 500 otáček po dobu 2 minut. Veškerý etanol ze zkumavek byl odpipetován a vzorek byl ponechán 10 minut sušit. Vysušená peleta byla resuspendována nejprve v 15 μ l 70% kyseliny mravenčí a následně bylo přidáno 15 μ l acetonitrilu. Zvortexované zkumavky byly opět stočeny centrifugou při 14 500 otáčkách po dobu 2 minut. Na předem připravenou destičku byl nanesen 1 μ l od každého vzorku ve dvou kopiích. Po zaschnutí byl vzorek překryt 1 μ l HCCA matricí (kyselina α -kyano-4-hydroxybenzoátová) podle pokynů Bruker Daltonik (Bruker Daltonik GmbH, Německo). Interpretaci výsledků MALDI-TOF MS vysvětluje **Tabulka 9**.

Tabulka 9: Interpretace MALDI-TOF MS výsledků

Rozsah	Interpretace	Barva
2,00 – 3,00	Identifikace druhu s vysokou mírou jistoty	zelená
1,70 – 1,99	Identifikace s nízkou mírou jistoty – jistá rodová příslušnost	žlutá
0,00 – 1,69	Identifikace organismu nelze provést	červená

4.5 Uchování sbírkových izolátů bifidobakterií

Čisté a úspěšně zidentifikované kmeny bifidobakterií byly aplikovány do 2 ml kryozkumavek společně s Bifipufrem (0,12 g K_2HPO_4 ; 0,33 g KH_2PO_4 , oba Lach-Ner, Slovakia; 0,05 g cystein Oxoid, UK; 100 ml dH_2O) a glycerinem (VWR, USA) v poměru 3:2. Poté byly uchovány při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

5 Výsledky

5.1 Kultivační stanovení počtů bifidobakterií ve fekálních vzorcích lidí bez gastrointestinálních obtíží

Mikrobiologické analýze bylo podrobena celkem 15 fekálních vzorků od dárců bez gastrointestinálních obtíží ve složení 10 žen a 5 mužů různého věku v průměru $25,67 \pm 18,58$ let. Celkové počty kultivovatelných anaerobních bakterií (CP) dosahovaly v průměru $9,48 \pm 0,22$ log KTJ/g. Pro stanovení bifidobakterií byly použity dvě selektivní média. Průměrný počet bifidobakterií v médiu WSP s mupirocinem a kyselinou octovou (WSP-MUP) byl $8,95 \pm 0,35$ log KTJ/g a u média WSP s norfloxacinem, mupirocinem a kyselinou octovou (WSP-NORF) $9,21 \pm 0,35$ log KTJ/g, **Tabulka 10**.

Z Petriho misek s počítatelnými koloniemi na selektivních médiích bylo na základě variability vybráno 183 kolonií bakterií, které byly izolovány a znovu kultivovány pro další identifikaci.

Tabulka 10: Množství kolonií tvořících jednotku (log KTJ/g)

Vzorek	log KTJ/g		
	CP	WSP-MUP	WSP-NORF
1	9,41	8,41	8,62
2	9,46	8,98	8,75
3	9,42	8,96	8,92
4	9,43	9,37	9,11
5	9,62	8,82	8,82
6	10,09	9,25	9,11
7	9,56	8,86	8,55
8	9,44	8,92	8,75
9	9,16	8,72	8,52
10	9,59	9,30	9,16
11	9,30	8,89	8,88
12	9,15	9,10	8,31
13	9,33	8,09	7,86
14	9,59	9,14	8,80
15	9,67	9,44	9,21
Průměr	9,48 ± 0,22	8,95 ± 0,35	8,76 ± 0,35

Vysvětlivky:

- CP – celkové počty kultivovatelných anaerobních bakterií na WSP médiu
- WSP-MUP – počet kultivovatelných bakterií (bifidobakterií) narostlých na WSP médiu s mupirocinem a kyselinou octovou
- WSP-NORF – počet kultivovatelných bakterií (bifidobakterií) narostlých na WSP s norfloxacinem, mupirocinem a kyselinou octovou

5.2 Identifikace vybraných izolátů

Celkem bylo izolováno 183 narostlých kolonií ze selektivních medií pro stanovení bifidobakterií, a to z médií WSP-MUP a WSP-NORF. Každý izolát byl podroben kontrole čistoty a morfologické analýze pod fázovým mikroskopem (fotografie některých izolátů vybraných k dalšímu testování se nacházejí v **příloze I**). Delší tyčinky, rozvětvené tyčinky a tyčinky tvořící agregáty byly nejčastěji detekovanou morfologií sledovaných bakteriálních buněk. Na základě variability bylo nakonec z celkových 183 izolátů vybráno 80, u kterých byla ověřována jejich příslušnost k rodu *Bifidobacterium* pomocí F6PPK testu a následovala u nich dále identifikace pomocí MALDI-TOF MS, **Tabulka 12**.

5.2.1 F6PPK test

F6PPK test byl důležitým ukazatelem při určování rodové identifikace izolátů. Z 80 testovaných izolátů byla příslušnosti k rodu *Bifidobacterium* jednoznačně potvrzena u 72. U izolátů D55 a D64 byl výsledek nejasný. V těchto případech bylo potřeba přihlídnout k jiným způsobům identifikace, které ukázaly, že se jednalo o rod *Bifidobacterium* s vysokou mírou jistoty. U třech izolátů D70, D75 a D83 vyšel test jako negativní, ale i tak bylo provedeno kontrolní testování další metodou. U zbývajících třech testovaných izolátů vyšel test jako negativní a identifikace na MALDI-TOF MS potvrdila, že se nejednalo o zástupce rodu *Bifidobacterium*, ale o narostlé kontaminace z prostředí.

5.2.2 MALDI-TOF MS

Pomocí MALDI-TOF MS byly identifikovány izoláty na úroveň druhu, popřípadě rodu, **Tabulka 12**. Nejčastěji detekovaným druhem z celkových 80 testovaných izolátů byl *B. longum* (37) a *B. adolescentis* (31). Méně často poté byly detekovány druhy *B. animalis* (4), *B. catenulatum* (4) a *B. pseudocatenulatum* (1). Ve střevní mikrobiotě lidských dárců bez gastrointestinálních obtíží se podařilo izolovat také druh *B. angulatum* (3). Bifidobakteriální druhy izolované z jednotlivých fekálních vzorků i s věkem hostitele obsahuje **Tabulka 11**. Zbývajících 3 izoláty, D70, D75 a D83 **Tabulka 12** neobsahuje, jelikož výsledek F6PPK testu byl potvrzen a nejednalo se tedy o rod *Bifidobacterium*. Bylo to potvrzeno i MALDI-TOF MS identifikací, kdy byly zidentifikovány jako druhy *Bacillus cereus* (2) a *Cutibacterium acnes* (1).

Tabulka 11: Detekované druhy bifidobakterií ve střevní mikrobiotě jednotlivých hostitelů

Číslo vzorku	Věk	Druhy bifidobakterií
1.	8	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i>
2.	9	<i>B. adolescentis</i>
3.	11	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. angulatum</i>
4.	25	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i>
5.	33	<i>B. longum</i>
6.	28	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i>
7.	10	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>
8.	12	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i>
9.	22	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
10.	50	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
11.	50	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> ,
12.	25	<i>B. longum</i>
13.	71	<i>B. adolescentis</i>
14.	30	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
15.	1	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>

5.3 Rozšíření sbírky bifidobakterií

Z celkových 80 testovaných izolátů bylo 77 zidentifikovaných na úroveň rodu jako *Bifidobacterium* spp. 73 izolátů bylo poté zidentifikováno s vysokou mírou jistoty druhové identifikace a byly následně uloženy do sbírky bifidobakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU v Praze. Dané divoké kmeny bifidobakterií od lidských dárců bez gastrointestinálních obtíží jsou součástí kontrolní skupiny bifidobakteriálních druhů, které budou využity pro testování v rámci dysbiotické mikrobioty, antibiotické rezistence bifidobakterií a dalších projektů KMVD.

Tabulka 12: Seznam izolátů bifidobakterií – mikroskopická kontrola, F6PPK test a MALDI-TOF MS identifikace

#	ID izolátu	Kód	Kultivační médium	Mikroskopická kontrola	F6PPK test	MALDI-TOF MS identifikace (1)	Skóre 1	MALDI-TOF MS identifikace (2)	Skóre 2
1	MUP 1/8A	D1	WSP-MUP	řetízky tyčinek	+	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2,20	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> subsp. <i>kashiwanohense</i>	2,18
2	MUP 1/7B	D2	WSP-MUP	krátké, tenké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,18	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,14
3	NORF 1/7B	D3	WSP-NORF	rozvětvené t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,21	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,19
4	NORF 1/7C	D4	WSP-NORF	krátké tenké t.	+	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2,26	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2,20
5	NORF 1/7D	D5	WSP-NORF	tenké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,24	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,23
6	MUP 2/8A	D6	WSP-MUP	pravidelné t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,01	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,05
7	NORF 2/7B	D7	WSP-NORF	shluky t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,27	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,36
8	NORF 2/7D	D8a	WSP-NORF	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,27	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,25
9	NORF 2/7D	D8b	WSP-NORF	kratší t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,24	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,29
10	NORF 2/7H	D9	WSP-NORF	shluky t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,13	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,13
11	MUP 3/8C	D10	WSP-MUP	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,15	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,70
12	MUP 3/8D	D11	WSP-MUP	shluky	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,22	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,26
13	MUP 3/8E	D12	WSP-MUP	shluky	+	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	2,05	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	2,03
14	NORF 3/7D	D13	WSP-NORF	krátké zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	1,96	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	1,99
15	NORF 3/7E	D14	WSP-NORF	krátké zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	2,00	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	1,92
16	MUP 4/8A	D15	WSP-MUP	dlouhé tenké t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,14	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,10
17	MUP 4/8B	D55	WSP-MUP	dlouhé rovné t.	+ / -	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,25	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,20
18	MUP 4/7A	D16	WSP-MUP	krátké tenké t.	+	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1,97	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2,01
19	MUP 4/7B	D17	WSP-MUP	dlouhé tenké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,14	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,28
20	MUP 4/7C	D18	WSP-MUP	dlouhé tenké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,14	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,17
21	NORF 4/8A	D19	WSP-NORF	nepravidelné t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,21	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,26
22	NORF 4/8B	D56	WSP-NORF	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,23	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,99
23	NORF 4/7B	D20	WSP-NORF	kratší t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,25	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,21

24	NORF 4/7C	D21	WSP-NORF	krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,21	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,26
25	NORF 4/7D	D22	WSP-NORF	shluky	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,08	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> subsp. <i>kashiwanohense</i>	2,02
26	MUP 5/7C	D23	WSP-MUP	tenké t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,27	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,18
27	MUP 5/7D	D24	WSP-MUP	tenké t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,26	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,25
28	NORF 5/7E	D25	WSP-NORF	rozvětvené t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,14	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,24
29	MUP 6/8B	D26	WSP-MUP	dlouhé tenké t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,20	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,18
30	MUP 6/8C	D27	WSP-MUP	agregáty	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,09	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,26
31	NORF 6/8C	D28	WSP-NORF	agregáty	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,08	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,18
32	NORF 6/7D	D29	WSP-NORF	agregáty	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,15	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,05
33	MUP 7/8B	D30	WSP-MUP	agregáty	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,20	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,08
34	MUP 7/7C	D31	WSP-MUP	krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,26	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,22
35	MUP 7/7E	D32	WSP-MUP	rovné t.	+	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2,13	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2,18
36	NORF 7/7C	D33	WSP-NORF	shluky delších t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,25	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,16
37	MUP 8/8B	D34	WSP-MUP	rozvětvené t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,18	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,17
38	MUP 8/8C	D35	WSP-MUP	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,06	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,04
39	MUP 8/7E	D36	WSP-MUP	rovné krátké t.	+	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2,18	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2,11
40	NORF 8/8A	D37	WSP-NORF	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,00	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,08
41	NORF 8/7D	D38	WSP-NORF	krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,29
42	MUP 9/7E	D40	WSP-MUP	velmi krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,24
43	MUP 9/7F	D41	WSP-MUP	velmi krátké t.	+	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	2,29	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	2,23
44	NORF 9/8A	D42	WSP-NORF	shluky t.	+	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	1,98	<i>Bifidobacterium animalis</i>	1,98
45	NORF 9/7F	D43	WSP-NORF	velmi krátké t.	+	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2,13	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	2,33
46	MUP 10/8A	D44	WSP-MUP	velmi krátké t.	+	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	2,25	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	2,22
47	MUP 10/8C	D45	WSP-MUP	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,00	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,21
48	MUP 10/7F	D46	WSP-MUP	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,24	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,16
49	NORF 10/8A	D47	WSP-NORF	dlouhé zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,21	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,17
50	NORF 10/7D	D48	WSP-NORF	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,23	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,15
51	NORF 10/7E	D49	WSP-NORF	delší t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,13	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,18

52	MUP 11/8A	D50	WSP-MUP	rovné t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,20	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,17
53	MUP 11/8A	D50A	WSP-MUP	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,16	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,10
54	MUP 11/7E	D51	WSP-MUP	delší t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,26	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,21
55	MUP 11/7G	D52	WSP-MUP	shluky	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,11	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,09
56	NORF 11/7E	D53	WSP-NORF	shluky	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,07	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,03
57	MUP 12/7E	D58	WSP-MUP	rozvětvené t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,06	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,09
58	NORF 12/7C	D61	WSP-NORF	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,00	<i>Bifidobacterium longum</i>	1,86
59	MUP 13/7B	D61A	WSP-MUP	shluky	+	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,04	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,08
60	NORF 13/7C	D63	WSP-NORF	krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,19	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,27
61	NORF 13/7E	D64	WSP-NORF	shluky	+ / -	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,96	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,87
62	MUP 14/8B	D65	WSP-MUP	dlouhé t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,10	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,04
63	NORF 14/8B	D67	WSP-NORF	delší zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,23	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,09
64	NORF 14/8B	D67A	WSP-NORF	zahnuté t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,09	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,02
65	NORF 14/7C	D68	WSP-NORF	řetízky z t.	+	<i>Bifidobacterium oedipus</i>	1,62	012_001_GM	1,63
66	NORF 14/7D	D69	WSP-NORF	krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,03	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,97
67	NORF 14/7E	D70	WSP-NORF	shluky	-	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,71	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,57
68	NORF 14/7F	D71	WSP-NORF	delší t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,03	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,10
69	MUP 15/8A	D72	WSP-MUP	shluky	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,12	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,08
70	MUP 15/8B	D73	WSP-MUP	shluky	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,18	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,17
71	MUP 15/8C	D74	WSP-MUP	krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,20	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,18
72	MUP 15/8D	D75	WSP-MUP	shluky	-	<i>Bifidobacterium rosetti</i>	1,69	<i>Bifidobacterium faecale</i>	1,61
73	MUP 15/7E	D76	WSP-MUP	delší t.	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,03	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,10
74	MUP 15/7F	D77	WSP-MUP	shluky	+	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,12	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	2,08
75	NORF 15/8A	D78	WSP-NORF	krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,18	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,17
76	NORF 15/8B	D79	WSP-NORF	krátké t.	+	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,20	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,18
77	NORF 15/7F	D83	WSP-NORF	shluky	-	<i>Bifidobacterium rosetti</i>	1,69	<i>Bifidobacterium faecale</i>	1,61

Vysvětlivky:

- WSP-MUP – Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou
- WSP-NORF – Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, norfloxacinem, mupirocinem a kyselinou octovou
- t. – tyčinky
- F6PPK test - - negativní výsledek
- F6PPK test + - pozitivní výsledek
- F6PPK test +/- - nejasný výsledek
- Zelená barva (rozsah score identifikace 2,00–3,00) – identifikace s vysokou mírou jistoty
- Žlutá barva (rozsah score identifikace 1,70–1,99) – identifikace s nízkou mírou jistoty – jistá rodová příslušnost
- Červená barva (rozsah score identifikace 0,00–1,69) – identifikace organismu nelze provést

6 Diskuze

Rod *Bifidobacterium* patří mezi komenzální sacharolytické bakterie, jejichž množství s přibývajícím věkem klesá (Ventura et al. 2007). Jsou přirozeným kolonizátorem trávicího traktu a podstatnou součástí střevního mikrobiomu nejen lidí, ale i zvířat (Hoover 2014). Nejvyšší zastoupení ve střevním mikrobiomu bifidobakterie dosahují v prvních třech letech života lidského hostitele (Arbolea et al. 2016). Jsou nejdůležitějším článkem při trávení oligosacharidů mateřského mléka, proto vyšší zastoupení nalezneme u dětí kojených než u dětí s umělou mléčnou výživou. Střevní mikrobiom se s přechodem na normální stravu přizpůsobí přijímaným látkám a kojenecké bifidobakteriální druhy postupně nahradí druhy typické pro mikrobiotu dospělého jedince (Hernell 2011). Přínos bifidobakterií pro lidský organismus je nezanedbatelný. Velký vliv na imunitu hostitele mají jejich metabolity, především organické kyseliny, octová a mléčná. V tlustém střevě vytvářejí kyselejší pH, čímž zvyšují obranyschopnost střeva hostitele vůči kolonizaci potenciálními patogeny. Vzniklé kyselé prostředí také podporuje tvorbu některých vitamínů a minerálních látek (Wong et al. 2006; O'Callaghan & van Sinderen 2016). Probiotické bifidobakterie se nepoužívají jen k prevenci gastrointestinálních potíží, ale také k podpoře jejich léčby. Jako takové lze zmínit například gastroenteritidu, průjem, syndrom dráždivého tračníku, nedostatečné trávení laktózy, infekci *Helicobacter pylori* či zánětlivá onemocnění střev (Lata 2021). Jelikož se jedná většinou o striktně anaerobní bakterie, jejich kultivace není tak snadná, ale kvůli svojí bezpečnosti, příznivým účinkům na zdraví hostitele a snadné aplikaci se s oblibou bifidobakterie užívají jako probiotika (Hoover 2014).

V rámci screeningu výskytu bifidobakterií u fekálních vzorků lidských dárců bez gastrointestinálních obtíží ve věku $25,67 \pm 18,58$ se jejich množství pohybovalo mezi 10^7 a 10^9 KTJ/g, konkrétně v médiu WSP-MUP to bylo $8,95 \pm 0,35$ log KTJ/g a v médiu WSP-NORF $8,76 \pm 0,35$ log KTJ/g. Pro srovnání, v japonské studii při analýze přes 400 lidských fekálních vzorků všech věkových skupin bylo detekováno množství *B. longum* v počtech $8,7 \pm 0,9$ log KTJ/g (Kato et al. 2017). Což je velmi podobné hodnotám zjištěným v této práci, kde ovšem byl zjišťován celkový počet bifidobakterií, tudíž se dá předpokládat, že v japonské studii byl celkový počet bifidobakterií vyšší. Podobně také Bunesova et al. (2017) detekovali bifidobakterie ve vysokých kultivačních počtech $9,62 \pm 0,35$ log KTJ/g fekálního vzorku u lidí vegetariánů a $9,36 \pm 0,57$ log KTJ/g u lidí na konvenční stravě. To vypovídá o pravděpodobně zanedbatelném vlivu konzumace masa na množství bifidobakterií v trávicím traktu člověka. V další studii bylo testováno 12 zdravých starších dobrovolníků, v jejichž fekálních vzorcích bylo stanoveno $8,52 \pm 0,26$ log KTJ/g bifidobakterií. V této studii byl zkoumán vliv podávaných fruktooligosacharidů *in vivo* na počty bifidobakterií. Po 4 týdnech suplementace prebiotiky se projevil zřetelný nárůst bifidobakterií na $9,17 \pm 0,17$ log KTJ/g. Lze tedy předpokládat, že fruktooligosacharidy mají příznivé prebiotické bifidogenní účinky. Xylooligosacharidy jsou dalším běžně užívaným prebiotikem, kdy pouhý 1 gram denně po dobu tří týdnů podávání vede ke zvýšení počtu bifidobakterií v GIT (Okazaki et al. 1990). Právě přirozený obsah prebiotických složek ve stravě je jedním z významných důvodů vysokého počtu bifidobakterií ve střevní mikrobiotě (Lockyer & Stanner 2019) a pravděpodobně i důvodem vysokého počtu bifidobakterií detekovaných ve fekálních vzorcích hostitelů v této práci. Prebiotika, především vláknina, je totiž běžně přijímaná ve stravě formou zeleniny,

ovoce, luštěnin či obilovin (Lockyer & Stanner 2019). Mezi potraviny přispívající k navýšení množství bifidobakterií patří navíc i mléčné výrobky, které samotné probiotické mikroorganismy přirozeně obsahují. Mezi druhy, se kterými se nejčastěji setkáme v těchto potravinách patří *B. longum* a *B. animalis* subsp. *lactis* (Ranadheera et al. 2010).

Naopak, velmi nízké, spíše žádné zastoupení bifidobakterií v tlustém střevě byly zjištěny u Hadzů. Jedná se o skupinu lidí, žijících v Tanzanii, kteří žijí původním způsobem života a stále se živí lovem a sběrem. Možným důvodem eliminace výskytu bifidobakterií by mohla být právě absence mléka a mléčných výrobků v jejich stravě. Zároveň také Hadzové nechovají hospodářská zvířata, které mohou být dalším možným zdrojem bifidobakterií, se kterými tedy vůbec nepřicházejí do styku (Schnorr et al. 2014). Při geografické izolaci Hadzů je totiž velmi pravděpodobné, že nedochází k žádnému kontaktu s jakýmkoliv hospodářskými zvířaty, tudíž ani přenos bifidobakterií nemůže proběhnout touto cestou (Moeller et al. 2013). Je zajímavé, že westernizace, a s tím související rozvoj řady civilizačních onemocnění, je také spojována s nižším zastoupením komenzálních bakterií ve střevě člověka (Cucinotta et al. 2021). Pokud je zdraví narušeno střevními onemocněními bez známé příčiny, jako jsou například zánětlivá onemocnění střev, kolorektální karcinom a další, tak množství bifidobakterií většinou značně klesá. U dětí trpících Crohnovou chorobou se hodnoty pohybují okolo 10^7 KTJ/g a méně, kdežto ve střevě zdravých dětí množství bifidobakterií dosahuje až hodnot 10^9 KTJ/g (Modrackova et al. 2019a). Jiná studie zabývající se také zánětlivými onemocněními střev dokonce uvádí ještě nižší počty bifidobakterií, a to pouze 10^5 KTJ/g. Snížené množství bifidobakterií bylo také detekováno u lidí s kolorektálním karcinomem ($4,94 \pm 0,40$ log KTJ/g) (Gueimonde et al. 2007) a laktózovou intolerancí (10^3 KTJ/g) (Vitellio et al. 2019). U lidí s laktózovou intolerancí byly hodnoty bifidobakterií zvýšeny po probiotické intervenci *B. longum* a *Lactobacillus rhamnosus* po dobu 30 dnů na 10^5 KTJ/g (Vitellio et al. 2019).

Na základě těchto zjištění by proto bylo vhodné zvažovat zařazení suplementace probiotických bifidobakteriálních kultur s cílem obnovy přirozené střevní mikrobioty, která běžně obsahuje vysoké počty komenzálních bifidobakterií. Nicméně je ale vždy nutné zvážit, o jaké problémy a individualitu hostitele se jedná, protože podání bifidobakterií nemusí být vždy zcela vhodné (Sarkar & Mandal 2016). Nevhodné je užívání probiotik například po operacích nebo při aktivním zánětu GIT, nedoporučuje se také podání probiotik v ranném období života, zvláště pak nedonošeným novorozencům (Frič 2011).

Velmi důležité je také zvážení testování probiotických vlastností dalších bifidobakteriálních druhů, které jsou přirozenou složkou střevní mikrobioty dané skupiny hostitelů. Například pro kojence by bylo vhodné zařadit druhy bifidobakterií, které se přirozeně vyskytují v jejich střevní mikrobiotě. V této práci z kojenecké stolice byly izolovány druhy *B. adolescentis* a *B. longum* subsp. *longum*. U dospělých jedinců to byly nejčastěji *B. adolescentis*, *B. longum* a dále také *B. animalis* a *B. catenulatum*. Komerčně využívané probiotické preparáty obsahují buď jednotlivé kmeny, nebo jsou založeny na kombinaci většího množství kmenů/druhů/rodů bakterií, například velmi častá je kombinace *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp., které bývají využívány pro obnovení původní mikrobioty například po užívání antibiotik (Cremonini et al. 2002).

V této práci byla použita dvě selektivní média pro stanovení bifidobakterií. Médium s mupirocinem by mělo být obecně méně selektivní ve srovnání s médiem obsahující navíc k mupirocinu ještě norfloxacin (Rada & Petr 2000; Vlková et al. 2015). V rámci této práce

nícméně toto zjištění nebylo jednoznačně potvrzeno. Pro kultivační stanovení bifidobakterií z fekálních vzorků lidí bez gastrointestinálních obtíží byla obě použitá média dostatečně selektivní a umožnila nárůst bifidobakterií bez významných rozdílů a jsou tedy vhodnými médii pro jejich kultivaci z fekálních vzorků lidských hostitelů. Konkrétně například u vzorku č. 1 bylo množství KTJ/g vyšší při použití média s norfloxacinem, zatímco u ostatních vzorků byly hodnoty stejné nebo velmi podobné, **Tabulka 10**.

Jedním z hlavních znaků určující rod *Bifidobacterium* je produkce enzymu F6PPK (Scardovi 1986; Vlková & Rada 2013). Test na zjištění F6PPK předcházela konkrétní druhové identifikaci na MALDI-TOF MS. Většina izolátů bifidobakterií vykazovala jasně pozitivní výsledek na přítomnost enzymu F6PPK, nicméně byly také detekovány dva izoláty (D55 a D64), jejichž reakce nebyla zcela jednoznačná. Důvodem mohla být vzniklá kontaminace z prostředí, a tedy testování kultury, která nebyla čistá, nebo také testování kultury v nevhodné fázi růstové křivky. Přesto byly i tyto izoláty identifikovány pomocí MALDI-TOF MS pro ověření jejich identity. U kmenů, které vykazovaly výsledek F6PPK testu negativní, nebo u kterých výsledek nebyl zcela jasný, se i na následující identifikaci míra druhové jistoty ukázala jako nízká. Dva izoláty byly identifikovány jako *Bacillus cereus*, který je často přenášen potravinami a způsobuje potíže, jako je průjem a zvracení (Granum & Lindbäck 2012). Výskyt tohoto mikroorganismu v rámci testování střevní mikrobioty lidí bez gastrointestinálních obtíží lze nejpravděpodobněji zdůvodnit jako kontaminaci během subkultivace izolátu z prostředí laboratoře, ve které v době identifikací probíhal experiment s *Bacillus* ssp. Třetí izolát, který nebyl bifidobakterií, byl identifikován jako *Cutibacterium acnes*. Výskyt tohoto mikroorganismu lze opět zdůvodnit předpokladem kontaminace z pokožky při přípravě vzorků pro identifikaci. *C. acnes* je totiž běžnou součástí mikrobiomu lidské kůže (Dréno et al. 2018).

MALDI-TOF MS se dříve nepoužívala pro běžnou identifikaci bakterií. Až později se tato metoda stala rutinní pro stanovování bakterií, především kvůli její rychlosti a spolehlivosti (Cherkaoui et al. 2010; Timperio et al. 2017). Rychlost identifikace je podstatná především v oblasti klinické a diagnostické identifikace na rozdíl od mikrobiologie environmentální nebo aplikované (Timperio et al. 2017). Jelikož bifidobakterie patří mezi komenzální bakterie a jejich osídlení trávicího traktu hostiteli většinou přináší benefity, aktualizace dostupné MALDI-TOF MS databáze o nově popsané druhy bifidobakterií je méně častá než v případě některých potenciálně patogenních a patogenních bakterií, které mohou způsobovat závažné zdravotní komplikace hostiteli, jako například některé patogenní kmeny *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* nebo *Staphylococcus aureus*. Tento důvod ovšem zřejmě není příčinou nízké druhové jistoty při identifikaci některých izolátů v rámci této práce. Lidské fekální kultivovatelné bifidobakterie jsou totiž často zkoumaným tématem především kvůli jejich probiotickým schopnostem (Sarkar & Mandal 2016), a dá se tedy předpokládat, že u zdravých jedinců ze stolice nebudou izolovány nové druhy bifidobakterií. Nízká míra druhové jistoty při identifikaci bifidobakteriálních izolátů byla konkrétně zjištěna u kmenů D68, D70, D75 a D83. Důvodem mohl být nedostatečný nárůst kultury, její kontaminace, chyba při přípravě analytu pro MALDI-TOF MS identifikaci, nedostatečná homogenizace matrice, její nevhodné skladování nebo chybné nanesení matrice či analytu na testovací destičku.

Jelikož věkové rozpětí dárců fekálních vzorků bylo velké ($25, 67 \pm 18,58$) a jejich počet nízký a nerovnoměrný, je nevhodné porovnávat kultivační množství bifidobakterií mezi

věkovými skupinami. Proto se zaměříme spíše na zastoupení druhů u jednotlivých dárců. Dominantními bifidobakteriemi kojeneckého trávicího traktu jsou kromě i zde izolovaného *B. longum* subsp. *longum*, také *B. longum* subsp. *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* a *B. pseudocatenulatum* (Hoover 2014). V rámci této práce u dětí mladších tří let byly izolovány také druhy *B. adolescentis* a *B. longum*. *B. adolescentis* je typický zástupce dospělých jedinců, ale u kojenců se může také vyskytovat (Arboleya et al. 2016). Fekální vzorky ostatních hostitelů analyzované v této práci obsahovaly především *B. adolescentis* a *B. longum*. *B. animalis* subsp. *lactis* bylo detekováno pouze u vzorků dvou hostitelů. Je možné, že výskyt tohoto druhu byl způsoben vyšším obsahem mléčných výrobků v dietě hostitelů, protože *B. animalis* subsp. *lactis* se často vyskytuje ve fermentovaných mléčných výrobcích, a to především v jogurtech a sýrech (Ranadheera et al. 2010). Další, tentokrát pouze u jednoho hostitele izolovaný druh je *B. angulatum*. *B. angulatum* bylo prvotně izolováno z lidských výkalů a odpadních vod (Scardovi & Crociani 1974), ale v současnosti je podle některých studií spíše ojedinělým druhem v lidské střevní mikrobiotě (Mattarelli & Biavati 2018; Zakharevich et al. 2019). Dalším detekovaným druhem byl *B. catenulatum*, který byl izolován ze tří fekálních vzorků, což je neobvyklé, protože vícero studií se shoduje na tom, že u dospělých jedinců se hojně vyskytuje (Hoover 2014; Arboleya et al. 2016; Kato et al. 2017). Důvodem by mohla být například volba selektivního média, při které jsou podstatné dvě základní informace, a to selektivita pro daný druh, který má být kultivován a nutriční požadavky bakterií potřebné k růstu (Ferraris et al. 2010). Některé druhy bifidobakterií mohou upřednostňovat také jiné živiny a mohou, ale nemusí být zcela rezistentní vůči danému antibiotiku (Vlková et al. 2015). Například nárůst *B. longum* subsp. *infantis* bychom mohli očekávat na médiu obohaceném o oligosacharidy mateřského mléka (Bottacini et al. 2014), nebo *B. bifidum* na substrátu s mucinem (Pechar et al. 2014). Pro stanovení dalších druhů bifidobakterií pomocí selektivních médií by mohly být využity substráty, které daný druh umí využívat, jako jsou například některé přírodní gummy (Modrackova et al. 2019b). Do budoucna by tedy pro detekci dalších pravděpodobně přítomných druhů bifidobakterií ve střevní mikrobiotě člověka, které mohly být u testovaných vzorků přítomny (nicméně pravděpodobně nebyly v tak vysokých počtech, aby mohly být izolovány), bylo vhodné zajištění dalších selektivních faktorů. Cílem této práce nicméně nebylo selektivní stanovení jednotlivých druhů, ale kvantifikace bifidobakterií pomocí dvou selektivních médií pro *Bifidobacterium* spp. a rutinní screening detekovaných druhů na těchto médiích.

Pro porovnání kultivačních počtů bifidobakterií a jejich druhového zastoupení u fekálních vzorků dárců bez zdravotních obtíží v závislosti na věku (zastoupení v kojenecké a dospělé fekální mikrobiotě) je nezbytné otestování většího počtu vzorků, které budou rovnoměrně zastoupeny u obou testovaných skupin. Výsledky této BP nicméně naznačují, že jsou bifidobakterie běžnou součástí fekální mikrobioty lidí bez zdravotních obtíží bez závislosti na věku hostitele. Zároveň byla potvrzena přítomnost druhů běžně se vyskytujících se u člověka. Metoda MALDI-TOF MS se navíc osvědčila jako spolehlivý nástroj pro identifikaci lidských divokých kmenů bifidobakterií. Velkým přínosem této práce navíc bylo rozšíření sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze o tyto divoké kmeny bifidobakterií, které budou využity jako součást kontrolní skupiny při testování dysbiotické lidské střevní mikrobioty, při testování antibiotické rezistence bifidobakterií a dalších výzkumech zabývajících se těmito střevními komenzály.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout základní vědecké poznatky o rodu *Bifidobacterium*, dále provést kultivační stanovení počtů bifidobakterií ze vzorků stolice lidí bez gastrointestinálních obtíží a na závěr provést izolaci, kultivaci a identifikaci bifidobakteriálních kmenů pro rozšíření kontrolní skupiny bifidobakterií ve sbírce Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze pro další testování. Všechny cíle bakalářské práce byly splněny.

Hypotézou této práce byl předpoklad hojného výskytu bifidobakterií ve střevní mikrobiotě lidí bez gastrointestinálních obtíží s dílčí hypotézou klesajícího množství bifidobakterií s rostoucím věkem dárců. První část hypotézy byla potvrzena. Střevní mikrobiota lidí bez gastrointestinálních obtíží je bohatým prostředím na obsah komenzálních bifidobakterií, jejichž kultivační počty dosahovaly 10^7 – 10^9 KTJ/g u všech testovaných lidských fekálních vzorků. Kultivační počty bifidobakterií s přibývajícím věkem dárců sice zpravidla klesaly, ale vzhledem k nízkému počtu testovaných vzorků nelze dílčí hypotézu zcela potvrdit a lze tedy konstatovat, že hypotéza byla pouze částečně potvrzena.

Ze stolice od 15 lidských dárců bez gastrointestinálních obtíží bylo mikrobiologickou analýzou pomocí deskové metody celkem izolováno a úspěšně identifikováno 77 kmenů bifidobakterií, ze kterých 73 bylo charakterizováno na úroveň druhu pomocí MALDI-TOF MS. Všechny 73 správně zidentifikovaných kmenů bylo uloženo do sbírky bifidobakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze.

Celkem bylo detekováno 6 různých druhů bifidobakterií. Nejčastěji detekovanými druhy byly *B. longum* a *B. adolescentis*, po kterých následovaly *B. animalis*, *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum*. Zajímavým zjištěním byla také izolace a identifikace druhu *B. angulatum*, který ze stolice od lidských hostitelů nebývá běžně kultivačně detekován.

Rozšířená sbírka bifidobakterií je v současné době již využívána při testování antibiotické rezistence bifidobakterií a jednotlivé kmeny budou dále využity pro naplánované testování dysbiotické lidské střevní mikrobioty a další studie.

8 Literatura

- Alberoni D, Gaggia F, Baffoni L, Modesto MM, Biavati B, Di Gioia D. 2019. *Bifidobacterium xylocopae* sp. nov. and *Bifidobacterium aemilianum* sp. nov., from the carpenter bee (*Xylocopa violacea*) digestive tract. *Systematic and Applied Microbiology* **42**:205-216.
- Arboleya S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. 2016. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- Azcarate-Peril MA, Ritter AJ, Savaiano D, Monteagudo-Mera A, Anderson C, Magness ST, Klaenhammer TR. 2017. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**:E367-E375.
- Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, Flint HJ. 2006. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and environmental microbiology* **72**:3593-3599.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of microbiology* **50**:117-132.
- Bottacini F, Ventura M, van Sinderen D, O'Connell Motherway M. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories* **13**:S4.
- Bozkurt H. 2021. A new bacterial transfer therapy for ibd: endoscopic bifidobacterium and xyloglucan administration. *Inflammatory Bowel Diseases* **27**:S37-S38.
- Broekaert WF, Courtin CM, Verbeke K, Van de Wiele T, Verstraete W, Delcour JA. 2011. Prebiotic and Other Health-Related Effects of Cereal-Derived Arabinoxylans, Arabinoxylan-Oligosaccharides, and Xylooligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51**:178-194.
- Bunešová V, Domig KJ, Killer J, Vlková E, Kopečný J, Mrázek J, Ročková Š, Rada V. 2012. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* **18**:166-168.
- Bäckhed F, et al. 2015. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe* **17**:690-703.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. 2010. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology* **48**:1169-1175.
- Collins MD, Gibson GR. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**:1052s-1057s.
- Cremonini F, Di Caro S, Covino M, Armuzzi A, Gabrielli M, Santarelli L, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. 2002. Effect of different probiotic preparations on anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *The American Journal of Gastroenterology* **97**:2744-2749.
- Cucinotta U, Romano C, Dipasquale V. 2021. Diet and Nutrition in Pediatric Inflammatory Bowel Diseases. *Nutrients* **13**:655.
- Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, Holscher HD, Hunter K, Manurung S, Obis D. 2021. Shaping the future of probiotics and prebiotics. *Trends in Microbiology*.

- D'Aimmo MR, Modesto M, Mattarelli P, Biavati B, Andlid T. 2014. Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. *Anaerobe* **30**:169-177.
- De Palma G, Cinova J, Stepankova R, Tuckova L, Sanz Y. 2010. Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *Journal of leukocyte biology* **87**:765-778.
- De Vries W, Stouthamer A. 1967. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *Journal of Bacteriology* **93**:574-576.
- Derrien M, Alvarez A-S, de Vos WM. 2019. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* **27**:997-1010.
- Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. 2018. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and *acne vulgaris*: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **32**:5-14.
- Duranti S, et al. 2017. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes among Human Gut-Derived Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **83**:e02894-02816.
- Duranti S, et al. 2019. Characterization of the phylogenetic diversity of five novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium castoris* sp. nov., *Bifidobacterium callimiconis* sp. nov., *Bifidobacterium goeldii* sp. nov., *Bifidobacterium samirii* sp. nov. and *Bifidobacterium dolichotidis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **69**:1288-1298.
- Duranti S, et al. 2020. Characterization of the phylogenetic diversity of two novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium cebidarum* sp. nov. and *Bifidobacterium leontopitheci* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**:2288-2297.
- D'Argenio G, Mazzacca G. 1999. Short-chain fatty acid in the human colon. *Advances in Nutrition and Cancer* **2**:149-158.
- Egan M, O'Connell Motherway M, Kilcoyne M, Kane M, Joshi L, Ventura M, van Sinderen D. 2014. Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium. *BMC Microbiology* **14**:282.
- Fanedl L, Nekrep FV, Avguštin G. 1998. Random amplified polymorphic DNA analysis and demonstration of genetic variability among bifidobacteria isolated from rats fed with raw kidney beans. *Canadian Journal of Microbiology* **44**:1094-1101.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Available from https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (accessed 25.04. 2021).
- Favier CF, de Vos WM, Akkermans ADL. 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* **9**:219-229.
- Felis GE, Dellaglio F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology* **8**:44.
- Ferraris L, Aires J, Waligora-Dupriet A-J, Butel M-J. 2010. New selective medium for selection of bifidobacteria from human feces. *Anaerobe* **16**:469-471.
- Frič P. 2011. Střevní mikroflóra, gastrointestinální ekosystém a probiotika. *Medicína pro praxi* **7**:408-413.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology* **66**:365-378.
- Fuller R. 1992. Probiotics: the scientific basis, Springer-Science+Business Media, Dordrecht
- Garrido D, Dallas DC, Mills DA. 2013. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology (Reading, England)* **159**:649-664.

- Georgieff M, Piovanetti Y, Queenan J. 2012. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* **129**:e827.
- Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **14**:491.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1999. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Dunn Clinical Nutrition Centre, Cambridge, United Kingdom*
- Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. 2008. Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet* **371**:75-84.
- Gomes AMP, Malcata FX. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* **10**:139-157.
- Granum P.E., Lindbäck T. 2012. *Bacillus cereus*. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*:491-502.
- Gueimonde M, Ouwehand A, Huhtinen H, Salminen E, Salminen S. 2007. Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG* **13**:3985.
- Hatipoglu H, Demirci M, Siraneci R, Akay HK, Tokman HB, Hatipoglu N, Torun MM, Yuksel P, Kocazeybek BS, Aka S. 2014. The relationship between bifidobacteria and allergic asthma and/or allergic dermatitis: A prospective study of 0-3 years-old children in Turkey. **28**: 98-103
- Hernell O. 2011. Human milk vs. cow's milk and the evolution of infant formulas. *Milk and milk products in human nutrition* **67**:17-28.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **11**:506.
- Hoover D.G. 2014. *Bifidobacterium*. Pages 216-222 in Batt CA, and Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, Oxford. United Kingdom
- Hungate R.E. 1969. Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. Pages 117-132 in Norris JR, and Ribbons DW, editors. *Methods in Microbiology*. Academic Press. University of California U.S.A.
- Iwasaki H, Araki Y, Ito E, Nagaoka M, Yokokura T. 1990. Structure of macroamphiphiles from several *Bifidobacterium* strains. *Journal of Bacteriology* **172**:845-852.
- Kato K, Odamaki T, Mitsuyama E, Sugahara H, Xiao J-z, Osawa R. 2017. Age-related changes in the composition of gut *Bifidobacterium* species. *Current microbiology* **74**:987-995.
- Killer J, Kopečný J, Mrazek J, Koppova I, Havlik J, Benada O, Kott T. 2011. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**:1315-1321.
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunešová V, Mrázek J, Vlková E. 2018a. Gene encoding the CTP synthetase as an appropriate molecular tool for identification and phylogenetic study of the family *Bifidobacteriaceae*. *MicrobiologyOpen* **7**:e00579.
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunešová V, Vlková E. 2018b. The threonine-tRNA ligase gene region is applicable in classification, typing, and phylogenetic analysis of bifidobacteria. *Journal of Microbiology* **56**:713-721.

- Kim J, Cho Y, Seo M-R, Bae MH, Kim B, Rho M, Pai H. 2020. Quantitative characterization of *Clostridioides difficile* population in the gut microbiome of patients with *C. difficile* infection and their association with clinical factors. *Scientific Reports* **10**:17608.
- Kircher M, Heyn P, Kelso J. 2011. Addressing challenges in the production and analysis of illumina sequencing data. *BMC genomics* **12**:1-14.
- Konieczna P, Akdis CA, Quigley EMM, Shanahan F, O'Mahony L. 2012. Portrait of an immunoregulatory bifidobacterium. *Gut Microbes* **3**:261-266.
- Lata P. 2021. Probiotics for Human Health. Pages 181-212. *Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine*. Springer.**29**:104-114
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **98**:1303-1315.
- Lee J-H, O'Sullivan DJ. 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**:378-416.
- Lee MC, Lin Lh Fau - Hung KL, Hung Kl Fau - Wu HY, Wu HY. 2001 Oral bacterial therapy promotes recovery from acute diarrhea in children. *Acta paediatrica taiwanica*, **52**:301-305
- Lockyer S, Stanner S. 2019. Prebiotics—an added benefit of some fibre types. *Nutrition Bulletin* **44**:74-91.
- Losurdo G, Principi M, Iannone A, Ierardi E, Di Leo A. 2016. The Interaction Between Celiac Disease and Intestinal Microbiota. *Journal of Clinical Gastroenterology* **50**:S145-S147.
- Maldonado NC, Ficoseco CA, Mansilla FI, Melián C, Hébert EM, Vignolo GM, Nader-Macías MEF. 2018. Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. *Livestock Science* **212**:99-110.
- Marcobal A, Sonnenburg JL. 2012. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection* **18**:12-15.
- Martinello F, Roman CF, SOUZA PAd. 2017. Effects of probiotic intake on intestinal bifidobacteria of celiac patients. *Arquivos de gastroenterologia* **54**:85-90.
- Masoumi SJ, Mehrabani D, Saberifiroozi M, Fattahi MR, Moradi F, Najafi M. 2021. The effect of yogurt fortified with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. probiotic in patients with lactose intolerance. *Food Science & Nutrition*.**9**:1704-1711
- Mattarelli P, Biavati B. 2018. Species in the genus *Bifidobacterium*. Pages 9-48. *The Bifidobacteria and Related Organisms*. Elsevier.
- McCracken VJ, Lorenz RG. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota: Microreview. *Cellular microbiology* **3**:1-11.
- Mekadim C, Bunešová V, Vlková E, Hroncová Z, Killer J. 2019. Genetic marker-based multi-locus sequence analysis for classification, genotyping, and phylogenetics of the family Bifidobacteriaceae as an alternative approach to phylogenomics. *Antonie van Leeuwenhoek* **112**:1785-1800.
- Milani C, et al. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81**:e00036-00017.
- Milani C, Duranti S, Lugli GA, Bottacini F, Strati F, Arioli S, Foroni E, Turrone F, Van Sinderen D, Ventura M. 2013. Comparative Genomics of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Reveals a Strict Monophyletic Bifidobacterial Taxon. *Applied and Environmental Microbiology* **79**:4304-4315.
- Milani C, et al. 2015. Exploring Vertical Transmission of Bifidobacteria from Mother to Child. *Applied and Environmental Microbiology* **81**:7078-7087.
- Modesto M, Biavati B, Mattarelli P. 2006. Occurrence of the Family Bifidobacteriaceae in Human Dental Caries and Plaque. *Caries Research* **40**:271-276.

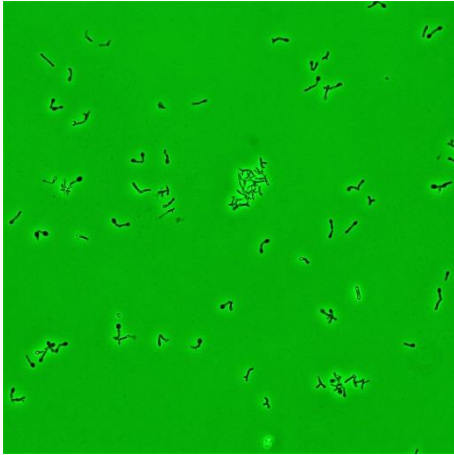
- Modrackova N, Bunesova V, Vlkova E, Musilova S, Mrvikova I, Bronsky J, Copova I, Hradsky O, Nevoral J. 2019a. Enteral Nutrition as a Growth Medium for Cultivable Commensal Bacteria and Its Effect on Their Quantity in the Stool of Children with Crohn's Disease. *Journal of medicinal food* **22**:810-816.
- Modrackova N, Makovska M, Mekadim C, Vlkova E, Tejnecky V, Bolechova P, Bunesova V. 2019b. Prebiotic potential of natural gums and starch for bifidobacteria of variable origins. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* **20**:100199.
- Modrackova N, Vlkova E, Tejnecky V, Schwab C, Neuzil-Bunesova V. 2020. Bifidobacterium β -Glucosidase Activity and Fermentation of Dietary Plant Glucosides Is Species and Strain Specific. *Microorganisms* **8**:839.
- Moeller AH, Peeters M, Ndjanga J-B, Li Y, Hahn BH, Ochman H. 2013. Sympatric chimpanzees and gorillas harbor convergent gut microbial communities. *Genome research* **23**:1715-1720.
- Mondot S, de Wouters T, Doré J, Lepage P. 2013. The Human Gut Microbiome and Its Dysfunctions. *Digestive Diseases* **31**:278-285.
- Moraes AC, de Almeida-Pittito B, Ferreira SRG. 2019. Chapter 41 - The Gut Microbiome in Vegetarians. Pages 393-400 in Faintuch J, and Faintuch S, editors. *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications*. Academic Press.
- Neu J. 2007. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *The American journal of clinical nutrition* **85**:629S-634S.
- Neuzil-Bunesova V, et al. 2020. Bifidobacterium canis sp. nov., a novel member of the Bifidobacterium pseudolongum phylogenetic group isolated from faeces of a dog (Canis lupus f. familiaris). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**:5040-5047.
- Neuzil-Bunesova V, et al. 2021. Five novel bifidobacterial species isolated from faeces of primates in two Czech zoos: Bifidobacterium erythrocebi sp. nov., Bifidobacterium moraviense sp. nov., Bifidobacterium oedipodis sp. nov., Bifidobacterium olomucense sp. nov. and Bifidobacterium panos sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **71**.
- Ng PC, Kirkness EF. 2010. Whole genome sequencing. *Genetic variation*:215-226.
- Nova E, Wörnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Romeo J, Marcos A. 2007. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *British Journal of Nutrition* **98**:S90-S95.
- O'Callaghan A, van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- O'Sullivan Ó, et al. 2012. Alterations in intestinal microbiota of elderly Irish subjects post-antibiotic therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**:214-221.
- Okazaki M, Fujikawa S, Matsumoto N. 1990. Effects of xylooligosaccharide on growth of bifidobacteria. *Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaiishi= Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science* **43**:395-401.
- Orban JI, Patterson JA. 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods* **40**:221-224.
- Orrhage K, Brismar B, Nord CE. 1994. Effect of Supplements with Bifidobacterium longum and Lactobacillus acidophilus on the Intestinal Microbiota during Administration of Clindamycin. *Microbial Ecology in Health and Disease* **7**:17-25.
- Palleja A, et al. 2018. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nature Microbiology* **3**:1255-1265.
- Pechar R, Rada V, Parafati L, Musilova S, Bunesova V, Vlkova E, Killer J, Mrazek J, Kmet V, Svejstl R. 2014. Mupirocin-mucin agar for selective enumeration of Bifidobacterium bifidum. *International Journal of Food Microbiology* **191**:32-35.

- Phavichitr N, et al. 2021. Impact of synbiotics on gut microbiota during early life: a randomized, double-blind study. *Scientific Reports* **11**:3534.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & nutrition* **6**:285-306.
- Rada V, Petr J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods* **43**:127-132.
- Rajyalakshmi K, Oudah MA, Babu MK, Priya AS, Shabana S, Satya AK. 2019. Benefaction of probiotics in human gastro intestinal tract. **4**:459-465
- Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* **43**:1-7.
- Reuter G. 2001. The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. *Current issues in intestinal microbiology* **2**:43-53.
- Roy D. 1996. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology* **29**:11-29.
- Roškar I, Švigelj K, Štempelj M, Volfand J, Štabuc B, Malovrh Š, Rogelj I. 2017. Effects of a probiotic product containing Bifidobacterium animalis subsp. animalis IM386 and Lactobacillus plantarum MP2026 in lactose intolerant individuals: Randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods* **35**:1-8.
- Saavedra JM, Bauman Na Fau - Oung I, Oung I Fau, Yolken RH. 1994, Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The lancet*, *344*(8929), 1046-1049.
- Sarkar A, Mandal S. 2016. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research* **192**:159-171.
- Satokari R, Grönroos T, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. 2009. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Letters in Applied Microbiology* **48**:8-12.
- Scardovi V. 1986. Genus Bifidobacterium. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*:1418-1434.
- Scardovi V, Crociani F. 1974. Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium dentium, and Bifidobacterium angulatum: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **24**:6-20.
- Schnorr SL, et al. 2014. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature Communications* **5**:3654.
- Segata N, Haake S, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, Huttenhower C, Izard J. 2012. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biology* **13**:R42.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews* **90**:859-904.
- Sela DA, Mills DA. 2010. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends in Microbiology* **18**:298-307.
- Servin AL. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* **28**:405-440.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Solís G, de los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M. 2010. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* **16**:307-310.

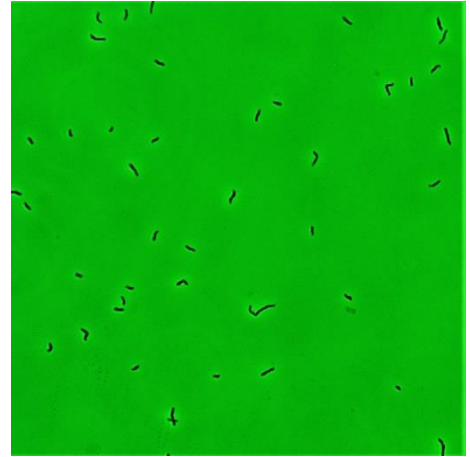
- Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. 2014. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **59**:78-88.
- Thomson P, Medina DA, Garrido D. 2018. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology* **75**:37-46.
- Tijjani KI, James M, Altin C. 2020. Probiotics and their attributes in human health therapy: review. *International journal of research -granthaalayah* **8**:158-164.
- Timperio AM, Gorrasi S, Zolla L, Fenice M. 2017. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. *PloS one* **12**:e0181860.
- Turroni F, Bottacini F, Foroni E, Mulder I, Kim J-H, Zomer A, Sánchez B, Bidossi A, Ferrarini A, Giubellini V. 2010. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:19514-19519.
- Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2015. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. *Pediatric research* **77**:229-235.
- Valdés-Varela L, Hernández-Barranco AM, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M. 2016. Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* growth and toxicity when co-cultured in different prebiotic substrates. *Frontiers in microbiology* **7**:738.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Van Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**:495-548.
- Ventura M, Turroni F, Canchaya C, Vaughan EE, O'Toole PW, van Sinderen D. 2009. Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Frontiers in Bioscience* **14**:3214-3221.
- Ventura M, Van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**:205-223.
- Vitellio P, Celano G, Bonfrate L, Gobetti M, Portincasa P, De Angelis M. 2019. Effects of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus* on Gut Microbiota in Patients with Lactose Intolerance and Persisting Functional Gastrointestinal Symptoms: A Randomised, Double-Blind, Cross-Over Study. *Nutrients* **11**:886.
- Vlková E, Rada V 2013. Cvičení z potravinářské mikrobiologie: pro posluchače FAPPZ. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Vlková E, Salmonová H, Bunešová V, Geigerová M, Rada V, Musilová Š. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* **34**:27-33.
- Voreades N, Kozil A, Weir TL. 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in Microbiology* **5**.
- Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. 2006. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* **40**.
- Zakharevich NV, Nezametdinova VZ, Averina OV, Chekalina MS, Alekseeva MG, Danilenko VN. 2019. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium angulatum* GT102: Potential Genes and Systems of Communication with Host. *Russian Journal of Genetics* **55**:847-864.

9 Samostatné přílohy

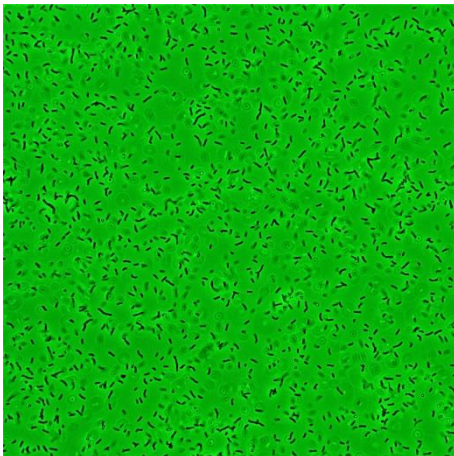
Příloha 1: fotografie bifidobakterií pod mikroskopem s fázovým kontrastem



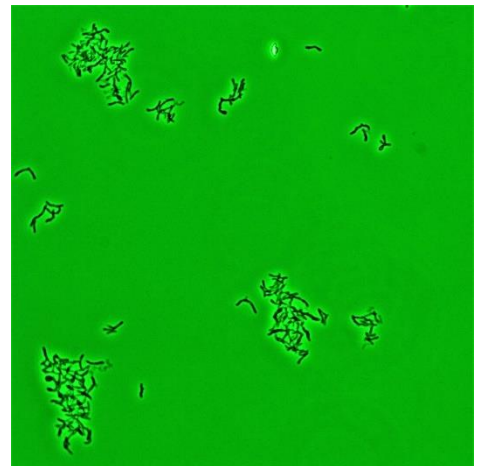
B. longum (D. Resová)



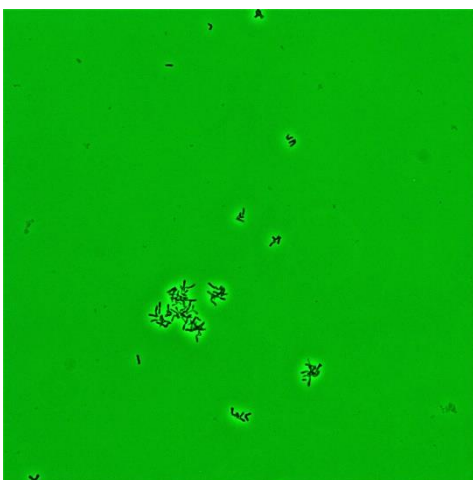
B. adolescentis (D. Resová)



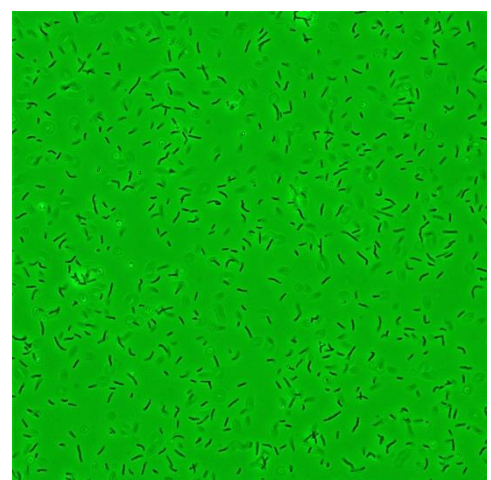
B. animalis (D. Resová)



B. catenulatum (D. Resová)



B. angulatum (D. Resová)



B. pseudocatenulatum (D. Resová)