

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Testování ureázové aktivity bakterií rodu *Bifidobacterium*

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Šárka Vidunová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

Konzultantka práce: Ing. Nikol Modráčková

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Testování ureázové aktivity bakterií rodu *Bifidobacterium* " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za odborné rady, cenné připomínky, trpělivost a čas, který mi věnovala při vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí pracovního prostoru a vytvoření vhodných pracovních podmínek.

Testování ureázové aktivity bakterií rodu *Bifidobacterium*

Souhrn

Střevní mikrobiota se skládá z rozsáhlého souboru mikroorganismů. Rod *Bifidobacterium* patří mezi bakterie, hojně se vyskytující v trávicím traktu lidí i zvířat. Navíc jsou tyto bakterie pro jejich pozitivní vliv na zdraví hostitele, hojně používány jako probiotika. V diplomové práci jsem navázala na svou práci bakalářskou (Identifikace, charakterizace a význam druhu *Bifidobacterium longum*, 2017) a pokračovala s testováním ureázové aktivity u rodu *Bifidobacterium*. Ureázová aktivita může do značné míry ovlivnit zdraví hostitele, a to jak pozitivním tak negativním dopadem.

Cílem této práce bylo navržení spolehlivé biochemické metody pro testování ureázové aktivity u bakterií rodu *Bifidobacterium* a následná detekce této aktivity u vybraných izolátů bifidobakterií. Většina testovaných kmenů pocházela z oficiálních sbírek, byla tak u nich známa i jejich genomová sekvence a informace o přítomnosti genů pro ureázovou aktivitu. Přítomnost vybraného genu (*UreC*) byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce s doporučenými primery pro tento gen. Jelikož tyto primery nebyly specifické pro bifidobakterie, tak byly v rámci testování navrženy a optimalizovány nové funkční specifické primery. Bylo použito celkem 63 kmenů bifidobakterií, které pocházely z různých ekologických nik a na základě původu a diety hostitele byla předpokládána jejich ureázová aktivita.

Vyhodnocením testů bylo zjištěno, že schopnost využití močoviny odráží původ izolátů. Na druhou stranu testování nepotvrdilo, že bifidobakterie pocházející od hostitelů s vysokým množstvím bílkovin a močoviny v dietě, častěji vykazují ureázovou aktivitu, což zamítá stanovenou hypotézu. Zajímavé výsledky byly zaznamenány u izolátů pocházejících z kravského bachoru, jelikož žádný izolát, i přes vysoký obsah močoviny v potravě hostitele, nevykazoval ureázovou aktivitu. Ureázová aktivita byla zaznamenána především u izolátů pocházejících z trávicího traktu kojenců, prasat a opic.

Klíčová slova: Bifidobakterie, dieta, probiotika, močovina, ureáza

Testing of urease activity of the genus *Bifidobacterium*

Summary

The intestinal microflora consists of an extensive system of microorganisms. Genus *Bifidobacterium* belongs to bacteria, which is abundant in the digestive tract of humans and animals. In addition, these bacteria are often used as probiotics because of their positive effect on the host health. Following my bachelor thesis (Identification, characterization and significance of the species *Bifidobacterium longum*, 2017), in this diploma thesis I have continued with testing of genus *Bifidobacterium* urease activity. This activity can considerably affect the health of the host, positively or negatively.

The aim of this thesis was to design a reliable biochemical method for testing urease activity bacteria of genus *Bifidobacterium* and subsequent detection of this activity in selected bifidobacteria isolates. Most of the strains have been originated from official collections, therefore the presence of their genomic sequence and information of urease activity genes were also known. The presence of the selected gene (*UreC*) was verified by polymerase chain reaction with the recommended primers for this gene. Because these primers were not specific for bifidobacteria, new functional specific primers were designed and optimized during testing. A total of 63 strains of bifidobacteria, derived from different ecological niches, were tested and different urease activity based on their assumed origin and host diets.

The evaluation of these tests revealed that the urea utilization reflects the origin of the isolates. On the other hand, testing did not proved that bifidobacteria derived from hosts with high protein and urea in diets. It often showed urease activity and rejected the established hypothesis. Interestingly, despite the high urea content of the host diet, all cow rumen isolates, do not showed urease activity. Urease activity has been reported mainly in gastrointestinal tract isolates of infants, pigs and monkeys.

Keywords: Bifidobacteria, diet, probiotics, urea, urease

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Hypotéza a cíl práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Rod <i>Bifidobacterium</i>	9
3.1.1 Obecná charakteristika.....	9
3.1.2 Fyziologie a metabolismus bifidobakterií.....	10
3.1.3 Genom bifidobakterií	12
3.1.4 Význam a adaptace	14
3.1.5 Výskyt bifidobakterií	17
3.2 Metabolismus dusíkatých látek.....	18
3.2.1 Ureázová aktivita	20
2.2.1.1 Ureázová aktivita a její pozitivní vliv	23
2.2.1.2 Ureázová aktivita a patogenita	23
3.2.2 Močovina	24
4 Metodická část.....	26
4.1 Výběr spolehlivých metod pro testování ureázové aktivity.....	26
4.1.1 Komerční biochemické soupravy	27
4.1.2 Modifikované agary s pH indikátorem	28
4.1.3 Modifikovaná tekutá média s pH indikátorem	29
4.2 Testování ureázové aktivity.....	30
4.2.1 Příprava bakteriálních kultur	30
4.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	34
5 Výsledky	38
5.1 Výběr spolehlivých metod pro testování ureázové aktivity.....	38
5.2 Biochemické testování ureázové aktivity	40
5.3 PCR detekce.....	41
6 Diskuze	45
7 Závěr.....	48
8 Seznam literatury	49
9 Přílohy	56

1 Úvod

Střevní mikrobiota představuje velmi složité mikrobiální společenství, jehož kolektivní genom kóduje funkce, které mají významný vliv na fyziologii hostitele. Rod *Bifidobacterium* tvoří součást mikrobioty lidí i zvířat. Tyto bakterie se mohou do značné míry podílet na zdraví hostitele. Bifidobakterie jsou schopné využít mnoho sacharidových substrátů a přeměnit je na organické kyseliny, které příznivě ovlivňují trávicí trakt hostitele. Díky těmto pozitivním schopnostem jsou bifidobakterie komerčně využívány jako probiotika do nejrůznějších výrobků. Jedním z dalších substrátů, který jsou schopny některé druhy bifidobakterií využít je močovina. Tato schopnost může být nápomocná při recyklaci dusíku v těle. Recyklace dusíku ve střevě je důležitá zejména v prvních týdnech života. Ureázová aktivita je také žádoucí mimo jiné v bachoru u přežvýkavých zvířat a při nedostatku bílkovin ve stravě. Ureolytické bakterie a ureáza jsou důležité pro správné využití močoviny a snížení toxicity amoniaku. Avšak amoniak, vznikající rozkladem močoviny může v nadměrném množství napomáhat k patogenezi některých onemocnění. Příkladem těchto onemocnění je infekce ledvin nebo jaterní encefalopatie.

2 Hypotéza a cíl práce

Hypotéza:

Izoláty bifidobakterií, pocházející od hostitelů s dietou bohatou na bílkoviny a s vysokým obsahem močoviny v dietě častěji vykazují ureázovou aktivitu.

Cíl praktické části:

Prvotním cílem praktické části je navržení a výběr vhodné biochemické a molekulárně genetické metody detekce ureázové aktivity u bifidobakterií. Dále pak detekovat ureázovou aktivitu bifidobakterií izolovaných z různých hostitelských prostředí pomocí vybraných biochemických a molekulárně genetických metod a porovnat detekované výsledky s genomickými informacemi.

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Bifidobacterium*

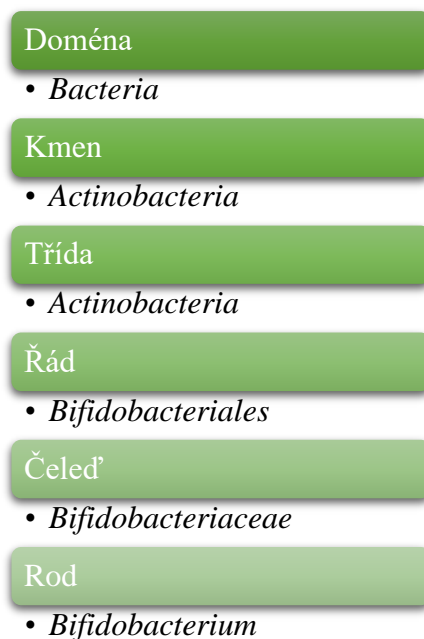
3.1.1 Obecná charakteristika

Bifidobakterie se řadí do kmene *Actinobacteria*, rodu *Bifidobacterium*, který byl klasifikován Orla-Jensenem roku 1924 (Biavati et al. 2000). Taxonomické zařazení bifidobakterií je zobrazeno na obr. 1.

Bifidobakterie jsou anaerobní mikroorganismy netvořící spory, s vysokým obsahem G + C (55 - 67%), vyskytující se jednotlivě, v řetězcích i shlucích (Felis & Dellaglio 2007; Lee & O'Sullivan 2010). Morfologie bakterií je označována jako bifidní nebo nepravidelná do tvaru písmene V nebo Y. Gram-pozitivní buněčná stěna těchto nepravidelných tyčinkovitých bakterií se skládá z peptidoglykanového obalu, složeného z *N*-acetyl-D-glukosaminu, kyseliny muramové, ornitinu, aspartátu, glutamátu, alaninu a serinu v poměru 1: 1: 1: 1: 3: 2: 1 (Lee & O'Sullivan 2010). Složení aminokyselin v tetrapeptidech se mezi jednotlivými druhy liší, díky čemuž mohou být lépe rozpoznány. Obvykle je peptid složen z aminokyselin jako L-alanin, kyselina D-glutamová, L-ornithin nebo lysin, a D-alanin. Základními sacharidy v buněčné stěně těchto bakterií jsou glukóza, galaktóza a často také rhamnóza. Teichoové kyseliny ve spojení s polysacharidovým řetězcem jsou zodpovědné za přilnutí bakterií k povrchu střeva. Lipoteichoové kyseliny také určují hydrofobní charakter bifidobakterií (Biavati et al. 2000).

Jelikož jsou bifidobakterie kolonizátoři tlustého střeva, musí být schopny při průchodu přes ústní dutinu, žaludek a tenké střevo překonat různé osmotické, oxidační, žlučové a kyselé bariéry. Největší ochranou jsou povrchové exopolysacharidy nebo pouzdra a bílkovinné struktury na povrchu bakteriálních buněk, kterými jsou fimbrie a pili. Tyto bílkovinné struktury umožňují adhezi k střevní sliznici, pohyb a interakci s jinými mikroorganismy (Bottacini et al. 2017).

Obr. 1: Taxonomické zařazení bifidobakterií (upraveno podle Ventura et al. 2004)



3.1.2 Fyziologie a metabolismus bifidobakterií

Obecně jsou zástupci rodu *Bifidobacterium* označováni za anaerobní organizmy. Některé druhy však dokáží v přítomnosti oxidu uhličitého kyslík tolerovat (Scardovi 1986). Vysokou kyslíkovou toleranci vykazuje poddruh *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, který je hojně součástí fermentovaných mléčných výrobků a probiotických doplňků. Anaerobní bakterie mají různé stupně tolerance na základě aktivit přítomných enzymů pro odstranění reaktivních druhů kyslíku. Mezi tyto enzymy patří NADH oxidáza, NADH peroxidáza a superoxid dismutáza (Shin & Park 1997; Lee & O'Sullivan 2010). Teplotní minimum růstu těchto bakterií je v rozmezí 25–28 °C, naopak teplotní maximum se pohybuje mezi 43–45 °C (Scardovi 1986). Optimální teplota pro růst lidských bifidobakterií je v rozmezí mezi 36 až 38 °C, zatímco pro bifidobakterie, pro něž je hostitel zvíře, je optimální teplota vyšší, většinou kolem 41 až 43 °C. Jsou však i výjimky, u kterých může růstové optimum teplot dosahovat až 49,5 °C, jako je to např. *Bifidobacterium thermacidophilum* (Dong et al. 2000). Optimální pH pro růst těchto bakterií je v rozmezí 6,5 až 7,0. Hraníčními pH, při kterých růst ustává je 4,5–5,0 a nižší a naopak 8,0–8,5 a vyšší (Scardovi 1986). Avšak některé kmeny, např. *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a *B. animalis* subsp. *lactis* vykazují růst i při pH 3–5 (Matsumoto et al. 2004). Tato vlastnost je důležitá pro přežití ve vyšších částech trávicí soustavy (Ventura et al. 2004; Bunešová et al. 2014). Bifidobakterie jsou kataláza negativní,

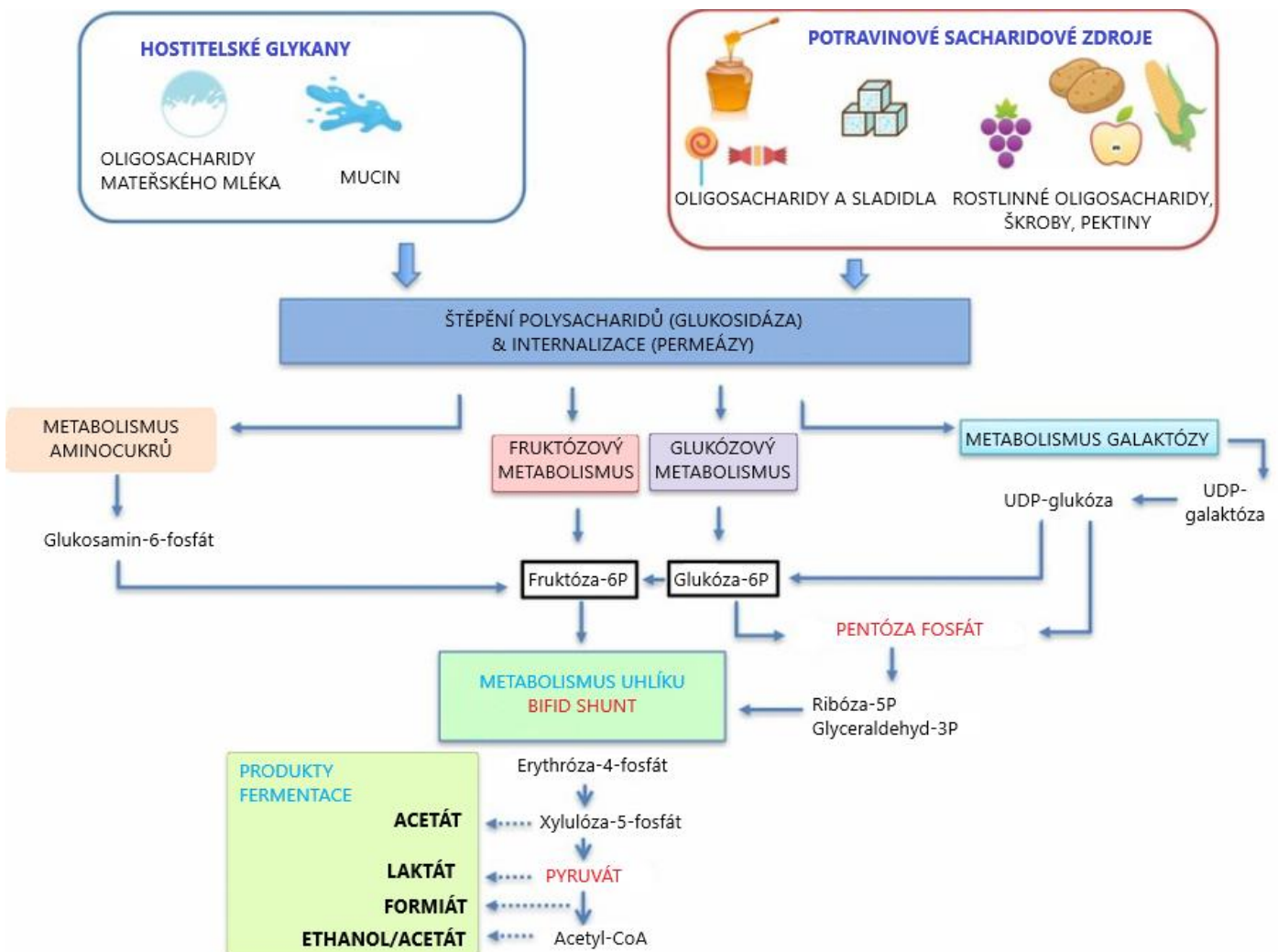
s výjimkou druhů *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides*, které byly původně izolovány z trávicího traktu včel. Tyto dva druhy vykazují katalázu pozitivní, a dokáží tedy růst v přítomnosti kyslíku (Felis & Dellaglio 2007).

Bifidobakterie v gastrointestinálním traktu mohou využívat rozmanité množství sacharidů, které nebyly rozloženy v horní části traktu. Mezi nejčastější sacharidové substráty patří rostlinné oligosacharidy a polysacharidy. Jednotlivé bifidobakteriální kmeny mohou mít různé schopnosti utilizace sacharidů. Některé druhy mohou fermentovat komplexní zdroje uhlíku jako je žaludeční mucin, xylooligosacharidy, (trans) galaktooligosacharidy, sójové oligosacharidy, maltooligosacharidy, fruktooligosacharidy, pektin a jiné rostlinné oligosacharidy (Pokusaeva et al. 2011). Zatímco většina bakterií přednostně využívá jednoduché cukry, např. glukózu, před složitějšími sacharidy, mnoho bifidobakterií upřednostňuje disacharidy nebo oligosacharidy. Důvodem je pravděpodobně evoluční adaptace na prostředí bohaté na složitější sacharidy (Lee & O'Sullivan 2010).

Sacharidy mohou být bakteriemi asimilovány různými mechanismy. Jeden z častých mechanismů je usnadněná difuze. Při tomto procesu se nespotebovává energie, ale proces je spřažen s procesy na energii závislé, jako je protonový symport, symport kovových iontů a primární aktivní transport (Degnan & Macfarlane 1993).

Střevní bakterie rozkládají polymerní sacharidy na nízkomolekulární oligosacharidy, které mohou být následně degradovány na monosacharidy použitím širokého spektra sacharolytických enzymů (Pokusaeva et al. 2011). Sacharidové fermentace u bifidobakterií jsou zobrazeny na obr. 2. V případě bifidobakterií, které jsou heterofermentativní organizmy, jsou hexózy, jako je glukóza nebo fruktóza, rozkládány charakteristickou metabolickou cestou označovanou jako fruktózo-6-fosfátová dráha neboli „*bifid shunt*“. Hlavní enzym fruktóza-6-fosfoketoláza štěpí fruktózu-6-fosfát na acetyl-1-fosfát a erytrózu-4-fosfát. Přítomnost enzymu fruktóza-6-fosfoketolázy je považována za důležitý taxonomický znak pro zařazení organismů do čeledi *Bifidobacteriaceae* (Felis & Dellaglio 2007). Jako hlavní produkty fermentace vzniká kyselina octová a kyselina mléčná v molárním poměru 3:2. Některé bifidobakterie mohou vytvářet i další organické kyseliny a etanol, které mohou ovlivňovat jejich růst. Kyselina máselná, propionová a oxid uhličitý (výjimka degradace glukonátu) nejsou touto metabolickou cestou vytvářeny (Ventura et al. 2004).

Obr. 2: Sacharidové fermentační cesty bifidobakterií (upraveno podle Bottacini et al. 2017)



3.1.3 Genom bifidobakterií

Rod *Bifidobacterium* v současné době zahrnuje kolem 80 druhů a poddruhů (List of prokaryotic names with standing nomenclature 2018). První úplná sekvenace bifidobakteriálního genomu proběhla v roce 2002 u *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCC2705 (Schell et al. 2002). Všechny sekvenované genomy se pohybují v rozmezí od 1,73 Mb (*Bifidobacterium indicum*) po 3,25 Mb (*Bifidobacterium biavatii*), což odpovídá 1 352 – 2 557 genům (Milani et al. 2016)

Bifidobakterie jsou schopné v trávicí soustavě využívat mnoho druhů sacharidů, jež nebyly rozloženy ve vyšších částech traktu. Metabolická adaptace na komplexní prostředí bohaté na sacharidy u rodu *Bifidobacterium* vyjadřuje i přítomnost genů kódujících velké množství enzymů modifikujících sacharidy. Předpokládá se, že více než 8 % identifikovaných genů ve většině studovaných bifidobakteriálních genomů se podílí na metabolismu sacharidů, což je o 30 % více než je tomu u většiny ostatních mikroorganismů gastrointestinálního traktu (GIT) (Pokusaeva et al. 2011). Výskyt a exprese konkrétních genů u bakterií záleží z velké části na prostředí, na které je určitý druh adaptovaný. Například poddruh *B. longum* subsp. *longum*, vyskytující se převážně v tělech dospělých lidí, obsahuje větší počet genů podílejících se na využití komplexních sacharidů a polyolů. Naopak genom poddruhu *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, dominantní mikroorganismus v tlustém střevě kojenců, obsahuje méně genů pro využití rostlinných komplexních sacharidů a větší počet genů, u kterých se předpokládá, že se podílejí na využití oligosacharidů mateřského mléka (Lee & O'Sullivan 2010).

Bifidobakteriální genomy obsahují geny, u kterých se předpokládá, že se podílejí na biosyntéze všech dvaceti aminokyselin. Záleží však na konkrétním růstovém médiu, zda se tyto geny projeví. Aminokyseliny mohou být syntetizovány z meziproductů, mezi něž patří ribóza-5-fosfát, glycerát-3-fosfát, pyruvát, fosfoenolpyruvát, oxalacetát a 2-oxoglutarát. Výsledky studií biosyntézy vitamínů bifidobakterií ukázaly, že druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *longum* mohou produkovat vitaminy thiamin (B1), niacin (B3), pyridoxin (B6), kyselinu listovou (B9) a kobalamin (B12) (Deguchi et al. 1985; Lee & O'Sullivan 2010).

U většiny bifidobakterií nejsou běžně detekovány plazmidy. Přibližně jen 20 % izolovaných bifidobakterií obsahují detekovatelné plazmidy. Některé plazmidy byly kompletně sekvenovány. Jejich velikost se pohybovala od 1 800 až 10 200 párů bází. Obsahová analýza odhalila rozdílný obsah G + C oproti hlavnímu chromozomu, což naznačuje, že mohou původně pocházet z jiných mikroorganismů (Lee & O'Sullivan 2010). Některé z bifidobakterií obsahují CRISPRs struktury, což jsou malé, identické, opakující se sekvence DNA. Počet opakujících se sekvencí může být rozdílný mezi různými bakteriemi například v rozmezí od 2 až 249. Tyto struktury byly nalezeny v sedmi z devíti analyzovaných bifidobakteriálních genomů. Bylo prokázáno, že CRISPRs se podílí na získání rezistence proti napadení bakteriofágy nahrazením sekvence DNA segmentem, pocházející z bakteriofágové DNA (Barrangou et al. 2007; Lee & O'Sullivan 2010).

3.1.4 Význam a adaptace

Předpokládá se, že rod *Bifidobacterium* hraje důležitou roli v lidském zdraví a je spojen s řadou příznivých účinků včetně udržování zdravé střevní mikrobioty a imunomodulace. Rozmanitost a počet bifidobakterií kolonizujících trávicí trakt se liší v závislosti na věku, stravě, genetice, mikrobiálních interakcích, zdravotním stavu hostitele a faktorů životního prostředí (Foley et al. 2008). Bakteriální kolonizace lidského organismu začíná bezprostředně po porodu a závisí na mnoha faktorech, mezi něž patří např. způsob porodu (císařský, vaginální), typ kojení, následná strava, využití antibiotik, hygienické podmínky a prodělaná onemocnění, zejména gastrointestinální infekce (Eckburg et al. 2005).

Bifidobakterie patří mezi první převládající skupiny anaerobních bakterií v lidském organismu a předpokládá se, že podporují ochranu proti patogenům produkcí antimikrobiálních činidel (např. organické kyseliny a bakteriociny) a blokováním jejich adheze na sliznici (Rastall et al. 2005, Lee & O'Sullivan 2010). Díky těmto pozitivním schopnostem jsou bifidobakterie komerčně využívány jako probiotika. Stejně jako většina střevních bakterií jsou i bifidobakterie sacharolytické a hrají důležitou roli při fermentaci sacharidů v tlustém střevě (D'Argenio & Mazzacca 1999; Pokusaeva et al. 2011). Aktivita probiotických bakterií včetně bifidobakterií může být selektivně stimulována různými sacharidy, nazývané prebiotika (Gibson 2008). Mezi tyto látky patří zejména oligosacharidy, jako jsou fruktooligosacharidy, isomaltooligosacharidy, galaktooligosacharidy a xylooligosacharidy. Prebiotika odolávají hydrolyze zažívacími enzymy a při průchodu tenkým střevem nejsou absorbovány, a tak se dostávají až do tlustého střeva, kde jsou fermentovány příslušnou mikrobiotou. Bylo prokázáno, že oligosacharidy, vázané 1-4 glykosidickou vazbou, byly selektivně využívány všemi bifidobakteriemi, některými druhy laktobacilů a *Bacteroides*, zatímco nebyly fermentovány rody *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Fusobacterium* a *Escherichia coli*. *In vitro* i *in vivo* studie prokázaly, že galaktooligosacharidy vedly k významnému nárůstu koncentrace bifidobakterií v tlustém střevě člověka i zvířat (Amaretti et al. 2007). Bakterie rodu *Bifidobacterium* vytvářejí při degradaci sacharidů mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) a další organické sloučeniny, z nichž některé mohou být přínosné pro hostitele. Tyto látky jsou rozpustné ve vodě a jsou snadno absorbovány v těle (Russell et al. 2011). SCFA jsou vysoce kalorické a mohou být absorbovány kolonocyty, kde jsou metabolizovány a následně využity jako zdroj energie. Dále pak mohou být SCFA využívány jaterními a svalovými buňkami a stimulovat absorpci sodíku a vody v tlustém střevě (D'Argenio & Mazzacca 1999; Russell

et al. 2011). Produkce SCFA v tlustém střevě má přímý vliv na absorpci amoniaku (Russell et al. 2011).

Už v 19. století Tissier, poté co poprvé objevil bifidobakterie, tvrdil, že vyšší počet těchto bakterií ve stolici zdravých kojenců je pravděpodobným důvodem nižšího výskytu kojeneckých průjmů (Lee & O'Sullivan 2010). Druhy, vyskytující se v těle dospělého člověka jako jsou *Bifidobacterium adolescentis* a *B. longum* subsp. *longum*, jsou fyziologicky vybaveny ke štěpení rostlinných polysacharidů. Kojenecké druhy *B. longum* subsp. *infantis* a *B. bifidum* se adaptovaly k utilizaci oligosacharidů mateřského mléka. Hlavními komponenty mateřského mléka jsou D-glukóza, D-galaktóza, L-fukóza, N-acetylglukosamin a kyselina sialová. Tyto dva uvedené kojenecké druhy se adaptovaly pomocí enzymů α -fukosidáz, sialidáz, hexosaminidáz, lakto-N-biosidáz a α - a β -galaktozidáz, pomocí nichž degradují příslušné oligosacharidy (Bunesova et al. 2016). Mnoho studií potvrzuje vyšší počet bifidobakterií a nižší výskyt gastroenteritidy u kojeneckých dětí v porovnání s dětmi krmenými náhradní výživou. Stimulace bifidobakterií mateřským mlékem mělo také za následek jejich vyšší výskyt ve střevě s následným potlačením nežádoucích střevních bakterií. Tento inhibiční účinek byl také podpořen změnou fekálního pH během prvních 7 týdnů po narození. U kojeneckých dětí bylo okolo pH 6, na rozdíl od kojenců krmených umělou výživou, u nichž se pohybovaly hodnoty blízké pH 7, což bylo pravděpodobně zapříčiněno produkcí kyseliny octové a mléčné bifidobakteriemi (Lee & O'Sullivan 2010).

Rakovina je stále globálně jednou z nejběžnějších příčin úmrtí. Hlavní problém léčby rakoviny chemoterapií tkví v tom, že tento léčebný postup ovlivňuje nejen buňky rakovinné, ale i normální. Bakterie mléčného kvašení společně s bifidobakteriemi vykazují chemoprotektivní účinky rakoviny tlustého střeva, močového měchýře, jater, prsou a žaludku (Wei et al. 2018)

Rod *Bifidobacterium* může být užitečný i při léčbě zácpy u starších osob. S přibývajícím věkem počet populací bifidobakterií v tlustém střevě klesá, což může být jedním z přispívajících faktorů zácpy. Tento fakt je pravděpodobně zapříčiněn lubrikačním efektem bifidobakterií během průchodu stolice a produkce exopolysacharidů, které mohou působit jako projímadlo (O'Sullivan 2001; Lee & O'Sullivan 2010).

Některé druhy rodu *Bifidobacterium* jsou schopné produkovat konjugovanou kyselinu linolovou (CLA). CLA se přirozeně vyskytuje v živočišné tukové tkáni a mléce přežvýkavců. CLA vzniká v důsledku mikrobiální biohydrogenace kyseliny linolové a linolenové v bahu přežvýkavců. Bylo prokázáno, že CLA normalizuje sníženou glukózovou toleranci a zamezuje růst hyperglykémie. CLA také ovlivňuje produkci leptinu, což je hormon

vylučovaný tukovou tkání. Leptin reguluje příjem potravy. CLA se tudíž může nepřímo podílet na snížení tělesné hmotnosti (Russell et al. 2011).

Druhy *B. longum*, *B. animalis* subsp. *lactis* a *Bifidobacterium breve* vykazují antimikrobiální aktivitu proti patogenům díky jejich konkurenčnímu vyloučení. Tyto druhy umožňují dekonjugaci solí žlučových kyselin a jsou schopné přilnout na hleny nebo střevním epitelu. Tyto vlastnosti jsou důležité při určování zdraví prospěšných a probiotických mikroorganismů (Ventura et al. 2004).

Díky svému probiotickému účinku jsou bifidobakterie používány v mnohých výrobcích, jako jsou jogurty, zakysané smetany, sýry, sušená mléka, zmrzliny a další mléčné výrobky. Jeden z nejpoužívanějších poddruhů využívaných v potravinářství je *B. animalis* subsp. *lactis*, dále pak *B. longum* subsp. *infantis* a druhy *B. breve*, *B. bifidum* a *B. longum* subsp. *longum* (Hawkins 1993; Milani et al. 2013). Mléčné výrobky jsou doporučovány i pro jedince trpící laktózovou intolerancí. Fermentované potraviny jsou vhodnější pro pacienty z důvodu naštěpení laktózy mikrobiálními kulturami zahrnující i bifidobakterie (Lee & O'Sullivan 2010).

3.1.5 Výskyt bifidobakterií

Bifidobakterie se vyskytují v trávicím traktu lidí i zvířat. Byly izolovány z výkalů zvířat, lidské stolice, vagíny, bachoru dobytka, z kanalizačních vod, zubního kazu a plaku a z hmyzu, žijící sociálním způsobem života (Felis & Dellaglio 2007). Podle Ventury (2004) můžeme bifidobakterie dle jejich výskytu rozdělit do šesti ekologických nik: lidské střevo, ústní dutina, potraviny, zažívací trakt zvířat, střeva hmyzu a odpadní vody.

Mezi „lidskou“ skupinu bifidobakterií, které byly objeveny zejména v trávicím traktu nebo ve stolici dospělého člověka nebo kojence, zahrnujeme *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve* a *B. angulatum*. (Ventura et al. 2004). Z lidských výkalů či trávicího traktu byly objeveny také *Bifidobacterium gallicum*, *B. stercoris* a *B. kashiwanohense* (Bunešová et al. 2014). Bifidobakterie byly objeveny také v ústní dutině, a to *Bifidobacterium dentium*, která se podílí na vzniku zubního plaku a pravděpodobně i zubního kazu (Ventura et al. 2004; Ventura et al. 2009).

V mléce a mléčných výrobcích se vyskytují převážně *B. animalis* subsp. *lactis* izolované z jogurtu, *B. crudilactis* objeveny v syrovém mléce a nepasterizovaných sýrech a *B. mongoliense* izolované z tradičního mongolského nápoje „airag“ vyrobeného z fermentovaného kravského mléka (Bunešová et al. 2014). Nejedná se o druhy, které se vyskytují v trávicím traktu zvířat produkujících mléko. Druhy, které byly izolovány z výkalů jehňat, telat a krav jsou *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, *B. globosum*, *B. thermophilum*, *B. choerinum*, *B. merycicum*, a *B. ruminantium*. Kdežto v trávicím traktu prasat byly izolovány druhy *Bifidobacterium aerophilum*, *B. longum*, *B. thermophilum*, *B. choerinum*, *B. psychroaerophilum*, *B. thermacidophilum* a *B. boum*. Bifidobakterie byly nalezeny ve výkalech i dalších zvířat, např. u drůbeže, králíků, myši nebo primátů. Dále byly izolovány ze slepého střeva kuřete a slepého střeva vepře a kravského bachoru (Ventura et al. 2004; Endo et al. 2012).

Z hmyzího trávicího traktu byly izolovány druhy *Bifidobacterium asteroides*, *B. coryneforme*, *B. incidium*, *B. bombi*, *B. actinocoloniiforme* a *B. bohemicum*. Nejčastěji byly izolovány z trávicího traktu čmeláků a včel, ale vyskytují se u různého hmyzu, např. švábů, vos nebo sršní (Bunešová et al. 2014).

Mnoho druhů bifidobakterií bylo objeveno v odpadních vodách v důsledku fekálního znečištění. Druhy *Bifidobacterium subtile* a *B. minimum* byly izolovány pouze z odpadních vod (Biavati et al. 1982).

3.2 Metabolismus dusíkatých látek

Dusík je pro život nezbytně důležitý. Na rozdíl od rostlin nejsou živočichové schopni fixovat vzdušný dusík a musí ho získávat z potravy. Souhra absorpce a vylučování dusíku močí a stolicí je hlavním faktorem v homeostatické regulaci rovnováhy dusíku. Hlavními zdroji dusíku jsou aminokyseliny a peptidy odvozené od stravou přijatých proteinů. Ty jsou využity jako stavební látky nebo zdroj energie. Proteiny jsou v těle neustále syntetizovány a štěpeny. Bezprostředním konečným produktem katabolismu proteinů je amoniak, který je ve větším množství pro buňky toxický. V organismech je odstraňování amoniaku řešeno několika způsoby. Ryby, pro něž je amoniak silně toxický, se jeho velké části zbavují uvolňováním přes žábry na základě koncentračního spádu (Stewart & Smith 2005). Amoniak je vysoce rozpustný ve vodě a relativně snadno prochází skrz buněčné membrány, a tak u ryb nemusí být přeměňován na jiné produkty. U suchozemských živočichů je amoniak převeden na močovinu nebo kyselinu močovou (Wright 1995). Savci se zbavují škodlivého amoniaku pomocí ornitinového cyklu, který probíhá v játrech a výsledným produktem je močovina (Stewart & Smith 2005).

V lidském organismu vznikají během metabolismu dusíkatých látek tři hlavní produkty: močovina, kreatin a kyselina močová. I když jsou tyto látky často považovány za konečné produkty, které jsou vylučovány z těla, jsou (zejména močovina) významně degradovány intestinálními bakteriemi (Wright 1978). Uvolněný dusík je poté hostiteli k dispozici a může znovu vstoupit do dusíkového cyklu a být použit jako substrát pro syntetické procesy (Wright 1995). V tomto procesu přechází močovina z jater, kde vzniká v průběhu ornitinového cyklu do krevního oběhu. Močovina je filtrována v ledvinách a 40 až 60 % jí je reabsorbováno a zbytek vyloučen močí. Močovina v krevním oběhu může být absorbována do trávicího traktu, kde je rozložena bakteriemi na amoniak a oxid uhličitý. Bakterie poté využívají amoniak pro syntézu aminokyselin a nukleotidů. Hostitel může absorbovat molekuly syntetizované bakteriemi nebo amoniak, čímž dusík „recykluje“ (Fuller & Reeds 1998; Stewart & Smith 2005). Tento proces je znázorněn na obr. 3. Pro různé skupiny savců se tento cyklus liší. Z tohoto pohledu se rozdělují do tří skupin: přežvýkaví (např. skot, ovce), nepřežvýkaví (např. prasata, myši) a člověk (Stewart & Smith 2005).

Mnoho studií se zaměřovalo na recyklaci dusíku u přežvýkavců, jakožto prostředek zlepšení produktivity hospodářských zvířat. Přežvýkavci mají trávicí systém speciálně přizpůsobený pro využívání komplexních rostlinných sacharidů (Stewart & Smith 2005). Pro syntézu bakteriálních proteinů je obzvláště důležitý předžaludek bachor. Amoniak

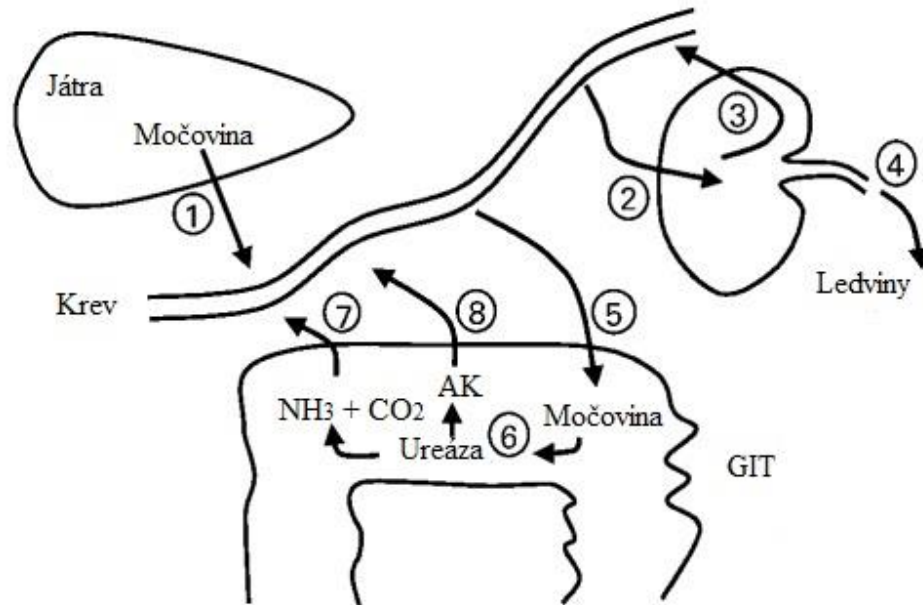
produkovaný bakteriemi je využíván pro jejich růst, a ty jsou následně dostupné hostiteli jako mikrobiální bílkovina. Pokud je však přežvýkavcům podáváno příliš mnoho močoviny, může nadměrná aktivita ureázy v bachoru vést k toxickému účinku, jelikož hydrolýza močoviny na amoniak překračuje rychlost využití amoniaku (Jin et al. 2017; Patra & Aschenbach 2018). Zvýšená utilizace močoviny ve střevě napomáhá k šetření vody v těle, což je důležité zejména u pouštních přežvýkavců, např. velbloudů či pouštních koz, jelikož se snižuje potřeba vylučovat močovinu ledvinami (Mousa et al. 1983).

U nepřežvýkavých je ureázová aktivita přítomna v jícnu, ileu, slepém střevě a zejména v tlustém střevě, nicméně ve srovnání s přežvýkavci je její aktivita relativně nízká (Patra & Aschenbach 2018). Předpokládá se, že je to z důvodu výskytu bakterií v tlustém střevě a absorpce většiny živin ve střevě tenkém (Stewart & Smith 2005). Avšak Hooper et al. (2001) a Buddington (2003) odhalili existenci ureolytických bakterií u nepřežvýkavců (psi, myši) i ve střevě tenkém. U monogastričních zvířat může zvýšená koncentrace amoniaku způsobit poškození sliznice GIT, což má za následek narušení absorpce živin, ztrátu energie, úbytek bílkovin a snížení růstu zvířete (Patra & Aschenbach 2018).

U člověka je hlavním místem hydrolýzy tlusté střevo, ale v menší míře také ústa a žaludek. Na štěpení močoviny v žaludku se zaměřilo mnoho studií, z důvodu objevu ureázu obsahující patogenní bakterie *Helicobacter pylori* (Stewart & Smith 2005). Bylo zjištěno, že významné množství lidských aminokyselin je mikrobiálního původu (Metges et al. 1999). Recyklace dusíku ve střevě je důležitá zejména v prvních týdnech života (Stewart & Smith 2005).

Ureolytické bakterie a ureáza jsou klíčové pro správné využití močoviny a snížení toxicity amoniaku (Patra & Aschenbach 2018).

Obr. 3: Cyklus recyklace dusíku (upraveno podle Stewart & Smith 2005)



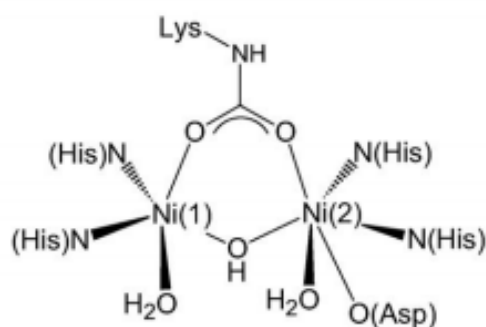
(1) Přestup močoviny z jater do krevního oběhu, (2) Filtrace močoviny ledvinami (3) Reabsorpce ledvinami (4) Vyloučení moči (5) Prostup do GIT (6) Rozštěpení ureázou (7) Reabsorpce amoniaku (8) Produkce aminokyselin a opětovná absorpce

3.2.1 Ureázová aktivita

Ureáza (aminohydroláza) je enzym produkován rostlinami, houbami a bakteriemi, který katalyzuje hydrolýzu močoviny na amoniak a oxid uhličitý. Rozkladem močoviny dochází k alkalizaci okolního prostředí (Kappaun et al. 2018). Aktivita tohoto enzymu umožňuje mikroorganismům využívat močovinu jako zdroj dusíku (Cotter & Hill 2003). U bakterií může ureáza ovlivňovat jejich virulenci. U rostlin mají ureázy většinou insekticidní a fungitoxické účinky (Kappaun et al. 2018). Syntéza ureázy může být konstitutivní nebo syntetizovaná jako reakce bakterií na stres nebo na pH prostředí (Cotter & Hill 2003).

Ureáza patří do rodiny amidohydroláz a fosfotriesteráz, které obsahují katalyticky aktivní kov na svých aktivních místech. Až na výjimky nesou ureázy na svých aktivních místech dva ionty niklu. Počet polypeptidových řetězců, které tvoří funkční jednotku, se liší podle zdroje ureázy. U rostlinných a fungálních ureáz tvoří funkční jednotku jediný polypeptidový řetězec, u bakterií je tvořena dvěma nebo dokonce třemi podjednotkami. Kromě dvou atomů niklu se aktivní místo skládá z jednoho karbamylovaného lysinu, čtyř histidinů a jednoho aspartátového zbytku (Kappaun et al. 2018). Na obr. 4 je znázorněná struktura ureázy.

Obr. 4: Struktura ureázy (Krajewska a Ciurli, 2005)



Ureáza je široce rozšířená mezi aerobními bakteriemi, ale zřídka se vyskytuje u anaerobních mikroorganismů. Přítomnost tohoto enzymu u rodu *Bifidobacterium* poprvé objevili Gibbons & Doetsch (1959), a to u bakterií izolovaných z kravského bacheru.

Ureáza patří mezi málo enzymů, které vyžadují pro svou činnost nikl a ve většině případů ho jiné kovy nemohou nahradit, aby vznikl enzym srovnatelné biologické aktivity (Moblely et al. 1995). Bakteriální ureázové genové klastry obsahují sedm až devět genů v závislosti na konkrétním druhu. Tyto geny kódují strukturní podjednotky ureázy a polypeptidy podílející se na biosyntéze niklu (Collins & D'Orazio 1993). Většina bakteriálních genových klastrů obsahuje geny ureABC kódující podjednotky γ , β a α , respektive tvoří ureázový apoenzym. Biogeneze funkční ureázy vyžaduje přítomnost a expresi doplňkových genů ureDEFG. *In vitro* experimenty vyhodnotily, že ureE pravděpodobně působí jako nosič niklu a ureDFG tvoří komplex držící apoenzym v konfiguraci, ve které je schopný přijmout nikl. Karbamylace enzymu je nutná pro začlenění účinného niklu, což vysvětluje zlepšení aktivity ureázy, když některé organismy rostou v prostředí bohaté na oxid uhličitý. Oxid uhličitý je také vylučován enzymem jako produkt (Burne & Chen 2000). Kromě příslušných genů se na biogenezi ureázy podílejí i jiné geny, například kovové přenašeče s vysokou afinitou jako je gen *nixA* u bakterie *Helicobacter pylori*. Tyto přenašeče zachytávají stopové množství niklu z prostředí (Moblely et al. 1995).

Collins & D'Orazio (1993) popsali pro ureolytické bakterie tři různé mechanismy exprese genu. Některé druhy konstitutivně vytvářejí ureázu; některé vytvářejí ureázu pouze tehdy, pokud je močovina přítomna v růstovém médiu; a třetí skupina vytváří ureázu pouze během růstu v prostředí chudém na dusík.

Jak již bylo zmíněno výše, syntéza ureázy je regulována mnoha faktory, mezi něž patří zejména koncentrace močoviny, amoniaku, dusíku, a pH média. Ureázová aktivita je často snížena vysokou koncentrací výsledného produktu amoniaku (Patra & Aschenbach 2018).

Mezi známé látky, které mohou inhibovat ureázovou aktivitu patří thioly, zejména b-merkptoethanol, kyselina acetohydroxamová, amidy a estery kyseliny fosforečné. Slabší inhibiční účinek mají také fluoridy, chinony, některé polyfenolycké sloučeniny (např. v zeleném čaji), kyseliny obsahující bór, citráty a těžké kovy (Kappaun et al. 2018). Různé faktory ovlivňující aktivitu ureázy jsou znázorněny v tabulce 1.

Tabulka 1: Faktory ovlivňující ureázovou aktivitu (upraveno podle Patra & Aschenbach 2018)

Faktor	Odezva
Ni (5mg/kg) + močovina (10g/kg)	Stimulace aktivity ureázy v bachoru ovcí
Mn, Mg, Ca, Sr, Ba, Co (5 a 10mM)	Inhibice aktivity ureázy
Ba, Ni, Mn (2 a 20 mM)	Stimulace aktivity ureázy v bachoru ovcí
Cu, Zn, Cd (2 a 20 mM)	Inhibice aktivity ureázy v bachoru ovcí
Sr, Ca, Co (2 a 20 mM)	Inhibice aktivity ureázy v bachoru ovcí
Mn, Mg, Ca, Sr, Ba	Stimulace aktivity ureázy u bachorových bakterií
Na, K, Co	Inhibice aktivity ureázy u bachorových bakterií
Monensin (antibiotikum)	Inhibice aktivity ureázy v bachoru volů
Lasalocid (antibiotikum)	Inhibice aktivity ureázy v bachoru volů
pH	Optimální pH ureázy při 6,8 až 7,6
Močovina	Stimulace aktivity ureázy
Močovina	Nárůst populace ureolytických bakterií
Močovina (160 g/den)	V porovnání s bazální dietou (167 g/kg) neměla vliv na rozmanitost a složení ureolytických bakterií a aktivitu ureázy
Amoniak	Vysoká koncentrace amoniaku snížila aktivitu ureázy
Protein	Vyšší ureázová aktivita u nízkobílkovinné diety (23 g) v porovnání s vysokobílkovinnou (123 g) dietou u ovcí (jehňat)

2.2.1.1 Ureázová aktivita a její pozitivní vliv

Ureolytická mikrobiota v lidském střevě hydrolyzuje až 30 % veškeré močoviny produkované v těle (Kappaun et al. 2018). U přežvýkavců hraje ureáza velmi důležitou roli při uvolňování amoniaku, jakožto zdroje dusíku pro bachorovou mikrobiotu (Javorsky et al. 1987).

K vývoji zubního kazu dochází jako důsledku častého okyselování zubních biofilmů a následnému výskytu acidogenních a acidotolerantních mikroorganismů včetně mutantních streptokoků a *Lactobacillus* spp., které fermentují sacharidy a snižují tak pH. Bakterie, které mají pozitivní vliv na zdraví zubů, mohou rozkládat močovinu a arginin k vytvoření amoniaku. Tato produkce zvyšuje pH a pozitivně ovlivňuje rovnováhu mezi remineralizací a demineralizací zubů a napomáhá k zabránění výskytu kariogenních mikroorganismů (Liu et al. 2012; Mora & Arioli 2014).

Bakterie mléčného kvašení, *Streptococcus thermophilus*, široce rozšířená při výrobě mléčných výrobků, vykazuje ureázovou aktivitu. Z tohoto důvodu konzumenti jogurtů, fermentovaného mléka a sýrů požívají i živé buňky nesoucí aktivní molekuly ureázy (Mora & Arioli 2014). Yatsunencko et al. (2012) zkoumali mikrobiom střev dvou rozdílných komunit, a to malajské a americké. U malajské populace byla frekvence ureázového genu významně vyšší u dětské mikrobioty a s věkem postupně klesala, na rozdíl od Spojených států, kde zůstala nízká od dětství až do dospělosti. Vzhledem k tomu, že má ureáza vliv na recyklaci dusíku, zejména při nedostatku bílkovin ve stravě, je proto využití močoviny střevní mikrobiotou s vysokou pravděpodobností výhodné jak pro mikroorganismy, tak pro hostitele (Mora & Arioli 2014).

2.2.1.2 Ureázová aktivita a patogenita

Patogeneze některých onemocnění u lidí a zvířat mohou být spojeny s ureolytickou aktivitou bakterií nebo hub. Příkladem je enterobakterie *Proteus mirabilis*, která způsobuje alkalizaci moči a následný vznik močových kamenů. Tato bakterie také přispívá ke vzniku pyelonefritidy (infekce ledvin). Vzniklý amoniak napomáhá bakteriím v přilnutí na močové cesty, jelikož způsobuje poškození glykosaminoglykanové vrstvy, která ochraňuje epiteliální buňky před bakteriální infekcí (Rutherford 2014).

Další bakterií, která hojně využívá svou ureázovou aktivitu, je gramnegativní *Helicobacter pylori* (Kappaun et al. 2018). Tato mikroaerofilní bakterie kolonizuje žaludeční sliznici člověka, způsobuje infekce a žaludeční a duodenální vředy. Díky ureázové alkalizaci dokáže zneutralizovat i tak kyselé prostředí jako je žaludek (Mobley et al. 1991). Amoniak,

který vznikne při rozkladu močoviny, je toxický pro hostitelské epiteliální buňky, což vede k jejich poškození v místě infekce (Rutherford 2014). Podobně je tomu u bakterie *Yersinia enterocolitica*, u níž ureolytická aktivita umožňuje průchod žaludečním prostředím do dalších částí trávicího traktu (De Koning-Ward & Robins-Browne 1995).

U pacientů s akutním selháním jater je hlavním problémem hepatální encefalopatie, která je spojována s vysokým obsahem střevního amoniaku. Střevní mikroorganismy, které jsou ureáza pozitivní např. *Klebsiella* spp. a *Proteus* spp., jsou významnými producenty střevního amoniaku a podílejí se tak na patogenezi tohoto onemocnění. Závažnost hepatální encefalopatie může být snížena modulací střevní mikrobioty pomocí agens, jako je rifaximin, laktulosa, prebiotika a probiotika. Avšak i probiotika mohou být ureáza pozitivní (Mora & Arioli 2014). Wilson et al. (2014) hodnotili ureázovou aktivitu *Lactobacillus reuteri* na myších. I když je tato bakterie ureáza pozitivní, došlo k celkovému snížení této aktivity ve střevech. Bylo to pravděpodobně z důvodu potlačení fekálních bakterií, jelikož mikrobiota s převahou fekálních bakterií vykazovala aktivitu vyšší než u myší kolonizovaných *L. reuteri*.

Mezi další bakterie, u nichž má ureolytická aktivita klíčovou roli v patogenezi patří *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Ureoplasma urealyticum*, *Yersinia enterocolitica* a tato aktivita byla hlášena u nemocí jako urelitiáza, amoniakální encefalopatie, jaterní selhání a gastroduodenální infekce (Mora & Arioli 2014). Uvolňování oxidu uhličitého z močoviny ovlivňuje pH bakteriální homeostázy, fyziologii bakterií a pH prostředí, což také může do značné míry ovlivňovat patogenezi bakterií. Avšak z hlediska patogeneze má největší dopad uvolňování amoniaku (Burne & Chen 2000). Některé alkalofilní bakterie a patogen močového ústrojí *Ureoplasma ureolyticum* mohou ureolýzu používat také k tvorbě ATP (Smith et al. 1995).

Některé ureázy mohou mít i neenzymatické vlastnosti jako např. neurotoxicitu. Canatoxin je izoforma ureázy rostliny *Canavalia ensiformis* z čeledi bobovitých. Tento protein byl testován na myších, u nichž způsoboval křeče a smrt. Canatoxin je toxický i pro vláknité houby a kvasinky (Follmer et al. 2004).

3.2.2 Močovina

Močovina představuje asimilovatelný zdroj dusíku pro bakterie kolonizující vyšší organismy (Burne & Chen 2000). Močovina je hlavním produktem dusíkového metabolismu člověka a většiny suchozemských zvířat (Mora & Arioli 2014). Tato látka je produkována v játrech, přenášena krevním oběhem a vylučována ledvinami močí. Sérová koncentrace močoviny u zdravého člověka se pohybuje v rozmezí 1 až 10 mM. Její hladina v moči může

překročit 0,5 M. Močovina se také vyskytuje v sekretech exokrinních žláz v koncentracích ekvivalentních séru. U sterilních tkání je poměrně nevýznamnou složkou, která nemá žádnou zjevnou roli. Avšak v oblastech, kde jsou epiteliální povrchy kolonizovány mikroorganismy, jako je ústní dutina nebo střevo, může mít metabolismus močoviny mikrobiálními ureázami hluboký dopad na integritu tkání, mikrobiální ekologii a celkové zdraví hostitele (Burne & Chen 2000).

Močovina je také přítomna v lidském mléce. Lidské mléko obsahuje přibližně 15 % dusíku ve formě močoviny. V postnatálním období je důležité navýšení hladiny dusíku pro uspokojení požadavků správného růstu a metabolismu kojence a mikrobiotu GIT. Bylo zjištěno, že aminokyseliny v plazmě kojenců mohou být odvozeny od močoviny, poté co byly hydrolyzovány a využívány intestinální mikrobiotou. Pravděpodobně z tohoto důvodu je bakterie *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, jakožto jeden z prvních kolonizátorů střev, producentem aktivní ureázy (Mora & Arioli 2014).

Močovina je vylučována do všech částí trávicího traktu, počínaje ústní dutinou. Ve slinách je přítomna v koncentraci 3-10 mM, což představuje významný zdroj dusíku pro několik druhů orálních mikroorganismů např. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularis* a *Actinomyces naeslundii* napomáhajícím k zdraví zubů, viz výše (Mora & Arioli 2014).

Močovina se u přežvýkavců běžně používá jako neproteinový zdroj dusíku jakožto ekonomická náhrada proteinových krmiv (Kertz 2010).

4 Metodická část

Na základě výsledků zjištěných během zpracování bakalářské práce a praktických analýz laboratoří Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD), bylo zjištěno, že komerční biochemické testy vykazují značnou variabilitu výsledků během testování ureázové aktivity bakterií rodu *Bifidobacterium*. Tudíž bylo prvotním cílem práce navržení spolehlivé metody pro testování této aktivity.

4.1 Výběr spolehlivých metod pro testování ureázové aktivity

Pro výběr vhodné metody testování ureázové aktivity byla vybrána skupina 14 kmenů bifidobakterií společně s jedním kmenem *Streptococcus thermophilus*. Přehled kmenů je uveden v tabulce 2. Některé z kmenů byly vybrány na základě pozitivních výsledků ureázového testu v ANAEROTestu 23 v bakalářské práci a druh *Streptococcus thermophilus* z důvodu ureázové aktivity u využívaných startovacích kultur v mléčných výrobcích.

Tabulka 2: Přehled vybraných testovaných kmenů pro optimalizaci a výběr metod

Kmen	Izolováno
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i> (ETH 11-5)	Africký kojeneček
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (Danone)	Jogurt Activia
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i> DSM 28597	Prasečí výkaly
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> DSM 20090	Střevo kojence
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i> DSM 20211	Prasečí výkaly
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> DSM 20088	Střevo kojence
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> DSM 20219	Střevo dospělého člověka
<i>Streptococcus thermophilus</i> (ST)	Jogurt
<i>Bifidobacterium longum</i> MA 2	Kojeneček (stáří 1 měsíc)
<i>Bifidobacterium longum</i> TA 2	Kojeneček (stáří 2 měsíce)
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> MB 7/5	Dospělý člověk (konvenční dieta)
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> MB 7/6	Dospělý člověk (konvenční dieta)
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> MB 5/3	Dospělý člověk (konvenční dieta)
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> NB	Probiotický produkt Nutra Bona
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> IN 2	Kojenečká výživa

4.1.1 Komerční biochemické soupravy

Pro stanovení biochemické aktivity bylo vyvinuto mnoho biochemických identifikačních testů, detekující přítomnost produktů, metabolitů nebo enzymů, které vznikají utilizací různých látek. Pozitivní reakce je založena na změně barvy indikátoru v příslušném médiu. V práci jsem se blíže zabývala komerčními soupravami ANAEROTest 23 a RAPID 32 ID, které obsahují test na stanovení ureázové aktivity.

4.1.1.1 ANAEROTest 23

Souprava ANAEROTest 23 (Erba Lachema, Česká republika) je systém spojující 23 biochemických testů, umožňující identifikaci anaerobních bakterií na základě jejich sacharidového metabolismu. Testy jsou umístěny v jamkách mikrotitrační destičky. Při fermentaci daného sacharidového substrátu dochází ke změně barvy vlivem vzniku organických kyselin a přítomností acidobazického indikátoru. U ureázového testu dochází k rozkladu močoviny, vzniku amoniaku a navýšení pH.

Narostlé kultury (1 ml) byly stočeny v centrifuze (14500 otáček/min. po dobu 3 minut), supernatant slit a sediment propláchnut ve fyziologickém roztoku. Suspenze byla znovu centrifugována a supernatant odlit. Následně byly usazené bakteriální pelety promíchány v příslušném médiu pro ANAEROTest 23 a 0,15 ml suspenze bylo inokulováno do všech jamek testu. Destičky naočkované bakteriální suspenzí byly společně s vyvíječem anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid) vloženy do inkubačního sáčku, který byl posléze vzduchotěsně uzavřen a uložen do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C. Po 48 hod. inkubace byl test vyhodnocen pomocí barevné škály.

4.1.1.2 RAPID 32 ID

Komerční souprava RAPID 32 ID (BioMérieux, Francie) je soustava 32 testů, která je založena na rychlé fermentaci lyofilizovaných substrátů. Tato souprava testů je využívána k identifikaci anaerobních bakterií na základě barevných změn jednotlivých testů, vznikající při bakteriální aktivitě.

Narostlé kultury byly stočeny v centrifuze (14500 otáček/min. po dobu 3 minut), supernatant slit a sediment propláchnut ve fyziologickém roztoku. Posléze bylo připraveno inokulum z narostlých bakteriálních kultur a suspenzního média Rapid ID 32 A. Zákal suspenze byl upraven na úroveň 4,0 pomocí zákalové stupnice podle McFarlanda. Do všech jamek testu bylo aplikováno 0,15 ml bakteriální suspenze a jamka pro ureázový test byla

navíc zakápnuta parafinovým olejem. Následně proběhla aerobní inkubace při teplotě 37 °C po dobu 4 hodin a poté vyhodnocení podle barevných změn.

4.1.2 Modifikované agary s pH indikátorem

4.1.2.1 Modifikované API 50 CHL médium s přidavkem močoviny ve formě agaru

Modifikovaný API 50 CHL agar byl připraven v laboratorních podmínkách dle složení uvedené výrobcem média API 50 CHL (BioMérieux, France) a podle dodaného zdroje uhlíku upraven do tří variant:

- a. Dle složení uvedené výrobcem
- b. S přidavkem glukózy
- c. S přidavkem laktózy

V receptuře byla vynechána bronkmesolová fialová, která byla nahrazena jiným pH indikátorem, viz postup níže. Do všech variant byla přidána 40% močovina při finální koncentraci v médiu 2 % a jako pH indikátor fenolová červeň, jejíž použití je při pH 6,8 a vyšší, kdy přechází z kyselé žluté formy na zásaditou purpurově červenou. Počáteční pH bylo upraveno pomocí kyseliny octové či hydroxidu sodného na pH 6. Složení médií je uvedeno v příloze 1.

Do malé Petriho misky bylo nalito 5 ml agaru. Po zatuhnutí bylo naočkováno pomocí pipety 0,1 ml narostlé kultury. Toto inokulum bylo rozprostřeno po povrchu agaru sterilní plastovou jednorázovou inokulační kličkou. Kultivace probíhala anaerobně v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Po uplynutí této doby se výsledky vyhodnocovaly podle barevných změn vzniklých v agaru. Pozitivní narostlé kmeny se projevovaly zčervenáním agaru, u negativních kmenů zůstala barva agaru světle žlutá. Pozitivní a negativní reakce je zobrazena na obr. 5.

4.1.2.2 Urea base agar s přidavkem močoviny

Urea base agar byl připraven v laboratorních podmínkách dle složení uvedené výrobcem (Oxoid, UK) a na základě sacharidového zdroje upraven do tří variant:

- a. Dle složení uvedené výrobcem
- b. S přidavkem glukózy
- c. S přidavkem laktózy

Do všech variant Urea base agaru byla přidána 40% močovina při finální koncentraci v médiu 2 % a fenolová červeň, jakožto pH indikátor, reagující při pH 6,8 a vyšší. Počáteční

pH bylo opět upraveno pomocí kyseliny octové či hydroxidu sodného na pH 6. Složení je uvedeno v příloze 2.

Do Petriho misky bylo nalito 5 ml agarů a po jeho zatuhnutí bylo na agar naočkováno pomocí pipety 0,1 ml narostlé kultury, toto inokulum bylo rozprostřeno po povrchu agarů sterilní platovou jednorázovou inokulační kličkou. Kultivace probíhala v anaerobních podmínkách v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí této doby se výsledky vyhodnocovaly podle barevných změn vzniklých v agarů.

Obr. 5: Negativní (vlevo) a pozitivní (vpravo) reakce ureázového testu v modifikovaných agarů



4.1.3 Modifikovaná tekutá média s pH indikátorem

4.1.3.1 API 50 CHL médium s přidavkem močoviny

Médium API 50 CHL bylo připraveno v laboratorních podmínkách podle složení uvedené výrobcem (BioMérieux, France). Opět byla v receptuře vynechána bronkmesolová fialová, která byla nahrazena jiným pH indikátorem, viz postup níže.

Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována ve zkumavce Eppendorf rychlostí 14500 otáček/min. po dobu 3 minut. Supernatant byl odlit a sediment promíchán v 1 ml Bifipufu. Suspenze byla znovu centrifugována, supernatant slit a k sedimentu bylo přidáno 600 µl destilované vody. Do jamek testovací destičky bylo napipetováno 1350 µl média, 150 µl roztoku 2% močoviny a 150 µl bakteriálního kmene. Bifidobakterie byly ponechány v anaerobním prostředí při 37 °C a v intervalech 24 hod. byly kontrolovány barevné změny indikátoru a pomocí pH papírků měřeno pH.

4.1.3.2 Modifikované Wilkins-Chalgren médium v kombinaci s Nesslerovým činidlem

Modifikované Wilkins-Chalgren médium bylo uvařeno v laboratorních podmínkách podle složení uvedené výrobcem (Oxoid, UK) a upraveno do tří variant:

- a. Dle složení uvedené výrobcem
- b. S přidavkem laktózy
- c. S přidavkem sójového peptonu

Složení média je uvedeno v příloze 3.

Do médií v řádně označených penicilinkách (9 ml) bylo naočkováno 0,5 ml narostlé bakteriální kultury a pomocí injekční stříkačky aplikován 0,5 ml roztok 40 % močoviny. Následně probíhala kultivace za anaerobních podmínek v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

Pro zjištění ureázové aktivity bylo odebráno 0,5 ml média do zkumavek Eppendorf, k němuž bylo následně přidáno 50 µl 2 M NaOH a 75 µl Nesslerova činidla. V případě pozitivní reakce došlo ke vzniku amoniku, což se projevilo vznikem oranžové sraženiny.

4.2 Testování ureázové aktivity

Pro testování ureázové aktivity byly vybrány médium a agar API 50 CHL podle složení uvedené výrobcem s modifikací pH indikátoru, jak je uvedeno výše, jakožto nejspolehlivější metody při testování kontrolní skupiny.

4.2.1 Příprava bakteriálních kultur

Pro další testování ureázové aktivity bylo použito 64 izolátů rodu *Bifidobacterium* pocházející z oficiálních sbírek DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), ATCC (American Type Culture Collection) a CCM (Czech Collection of Microorganism), u nichž byla známa jejich přesná identita a genom. Mikroorganismy byly vybrány z různých ekologických nik. Seznam použitých sbírkových druhů bifidobakterií je uveden v tabulce 3.

Izoláty byly uchovávány při teplotě - 20 °C v modifikovaném Wilkins-Chalgrem bujónu s přidavkem Bifipufu (20% v/v) a glycerolu (20% v/v). Bakteriální kmeny byly rozmrazeny a 0,5 ml kultury naočkováno do tekutého, anaerobního modifikovaného Wilkins-Chalgrem bujónu (9 ml). Bakterie byly poté kultivovány za anaerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 48 hod. Čistota narostlých kultur byla kontrolována pomocí fázově kontrastního mikroskopu (Nikon Eclipse E 200LED MV RS, Japan). Takto narostlé a mikroskopicky

zkontrolované čisté kultury byly znovu přeočkovány a kultivovány 24 hod. pro vytvoření pracovní kultury. Další postup viz API 50 CHL médium s přidavkem močoviny a viz modifikované API 50 CHL médium s přidavkem močoviny a glukózy ve formě agaru.

Tabulka 3: Přehled testovaných sbírkových bifidobakterií

Druh, poddruh	Původně izolováno	Izoloval, rok	Kód
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i> ^a	Trávicí trakt čmeláka	Killer et al. 2011	22766
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ^c	Střevo člověka	Reuter 1963	4987
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ^a	Bachor skotu	Reuter 1963	20087
<i>Bifidobacterium animalis</i> ^c	Psí výkaly	Mitsuoka 1969	4988
<i>Bifidobacterium animalis</i> ^a	Trávicí trakt myši	Masco et al. 2004	26074
<i>Bifidobacterium animalis subsp. animalis</i> ^a	Krysí výkaly	Masco et al. 2004	20104
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> ^a	Jogurt	Masco et al. 2004	10140
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> ^a	Jogurt	Masco et al. 2004	10104
<i>Bifidobacterium asteroides</i> ^a	Trávicí trakt včely medonosné	Scardovi & Trovatelli 1969	20089
<i>Bifidobacterium avesonii</i>	Výkaly tamarína (<i>Saguinus oedipus</i>)	Michelini et al. 2015	100685
<i>Bifidobacterium biavatii</i> ^a	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al. 2012	23969
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^a	Střevo dospělého člověka	Orla-Jensen 1924	20215
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^a	Střevo dospělého člověka	Orla-Jensen 1924	20082
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^b	Stolice kojence	Orla-Jensen 1924	29521
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^c	Stolice kojence	Orla-Jensen 1924	3762
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^a	Střevo dospělého člověka	Orla-Jensen 1924	20239
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^a	Stolice kojence	Orla-Jensen 1924	20456
<i>Bifidobacterium</i>	Trávicí trakt čmeláka	Killer et al. 2011	22767

<i>bohemicum</i> ^a			
<i>Bifidobacterium bombi</i> ^a	Trávicí trakt čmeláka	Killer et al. 2009	19703
<i>Bifidobacterium breve</i> ^b	Střevo kojence	Reuter 1963	15700
<i>Bifidobacterium callitrichos</i> ^a	výkaly kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	Endo et al. 2012	23973
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> ^a	Stolice člověka	Scardovi & Crociani 1974	16992
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> ^c	Stolice člověka	Scardovi & Crociani 1974	4989
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> subsp. <i>kashiwanohense</i> ^a	Stolice kojence	Morita et al. 2011	21854
<i>Bifidobacterium coryneforme</i> ^a	Trávicí trakt včely medonosné	Biavati et al. 1982	20216
<i>Bifidobacterium cuniculi</i> ^a	Králičí výkaly	Scardovi et al. 1979	20435
<i>Bifidobacterium gallicum</i> ^a	Střevo dospělého člověka	Lauer 1990	20093
<i>Bifidobacterium globosum</i> ^a	Bachor skotu	Yaeshima et al. 1992	20092
<i>Bifidobacterium hapali</i> ^a	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i> L.)	Michelini et al. 2016	100202
<i>Bifidobacterium choerinum</i> ^a	Výkaly selete	Scardovi et al. 1979	20434
<i>Bifidobacterium indicum</i> ^a	Trávicí trakt včely medonosné	Scardovi & Trovatelli 1969	20214
<i>Bifidobacterium lemorum</i> ^a	Výkaly lemura (<i>Lemur catta</i>)	Modesto et al. 2015	28807
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ^b	Stolice kojence	Reuter 1963	17930
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ^a	Střevo kojence	Reuter 1963	20088
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ^c	Střevo kojence	Reuter 1963	4990
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ^a	Střevo kojence	Reuter 1963	20090
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> ^a	Střevo dospělého člověka	Matteuzzi et al. 1971	20219
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i> ^a	Prasečí výkaly	Yanokura et al. 2015	28597
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i> ^a	Prasečí výkaly	Matteuzzi et al. 1971	20211

<i>Bifidobacterium magnum</i> ^a	Králičí výkaly	Scardovi & Zani 1974	20222
<i>Bifidobacterium merycicum</i> ^a	Bachor skotu	Biavati & Mattarelli 1991	6492
<i>Bifidobacterium minimum</i> ^a	Odpadní voda	Biavati et al. 1982	20102
<i>Bifidobacterium moukalabense</i> ^a	Výkaly gorily nížinné (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	Tsuchida et al. 2014	27321
<i>Bifidobacterium myosotis</i> ^a	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i> L.)	Michelini et al. 2016	100196
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> ^a	Stolice kojence	Scardovi et al. 1979	20438
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> ^a	Prasečí výkaly	Mitsuoka 1969	20099
<i>Bifidobacterium pullorum</i> ^a	Kuřecí výkaly	Trovatelli et al. 1974	20433
<i>Bifidobacterium pullorum</i> subsp. <i>saeculare</i> ^a	Králičí výkaly	Biavati et al. 1992	6531
<i>Bifidobacterium ramosum</i> ^a	Výkaly tamarína pinčiho (<i>Saguinus oedipus</i>)	Michelini et al. 2017	100688
<i>Bifidobacterium ruminantium</i> ^a	Bachor skotu	Biavati & Mattarelli 1991	6489
<i>Bifidobacterium saguini</i> ^a	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al. 2012	23967
<i>Bifidobacterium scardovii</i> ^a	Lidská krev	Hoyles et al. 2002	13734
<i>Bifidobacterium stellenboschense</i> ^a	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al. 2012	23968
<i>Bifidobacterium stercoris</i> ^a	Stolice člověka	Kim et al. 2010	24849
<i>Bifidobacterium subtile</i> ^a	Odpadní voda	Biavati et al. 1982	20096
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i> ^a	Výkaly selete	Zhu et al. 2003	17755
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i> ^a	Odpadní voda	Dong et al. 2000	15837
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> ^a	Prasečí výkaly	Mitsuoka 1969	20210
<i>Bifidobacterium</i>	Bachor skotu	Mitsuoka 1969	20212

<i>thermophilum</i> ^a			
<i>Bifidobacterium tissieri</i> ^a	Výkaly mládřat kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i> L.)	Michelini et al. 2016	100201
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i> ^a	Zubní plak křečka	Okamoto et al. 2008	17777

^a - DSM – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany)

^b – ATCC – Americká sbírka typových kultur (American Type Culture Collection)

^c – CCM Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)

4.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR byla použita pro detekci genů podílející se na ureázové aktivitě. Před provedením PCR byla nejprve izolována DNA z čistých kultur. Poté byla smíchána směs pro PCR s DNA a vložena do termocykleru, kde proběhla PCR reakce. Následně byly PCR produkty naneseny do gelu a gel vložen do elektroforézy na 60 min a 130 V, poté byl gel prosvícen UV světlem a zachycen grafický záznam – elektroforeogram.

4.2.2.1 Izolace DNA

- 1) 1 ml bakteriální suspenze ve 2 ml zkumavce Eppendorf byly centrifugovány v centrifuze MINI Spin (Eppendorf) rychlostí 14500 otáček/min. po dobu 3 minut.
- 2) Ze zkumavky byl opatrně odlit supernatant a ponechán pouze sediment.
- 3) Sediment byl promíchán se 100 µl roztoku PrepMan Ultra.
- 4) Suspenze byla zahřáta v termocykleru na 100 °C po dobu 10 minut.
- 5) Suspenze byla ponechána v pokojové teplotě po dobu 2 minut.
- 6) Suspenze byla centrifugována v centrifuze rychlostí 14500 otáček/min. po dobu 3 minut.
- 7) Ze zkumavky bylo odpipetováno 50 µl supernatantu do nové sterilní zkumavky Eppendorf.
- 8) Izolovaná DNA byla použita na PCR nebo zmrazeno pro pozdější testování.

4.2.2.2 Příprava PCR směsi

Směs pro PCR byla připravena podle tabulky 4 v tomtéž pořadí a uvedeném množství. Směs byla promíchána a krátce zcentrifugována. Reakční pufr, směs nukleotidů a Taq DNA polymeráza byly přidány ve formě master mixu (DreamTaq™ Green PCR Master mix 2x,

Thermo Scientific). Byly použity 4 druhy párů primerů, jejichž sekvence jsou uvedené v tabulce 5, 6 a 7. Jednotlivé složky byly rozpipetovány do eppendorfových zkumavek a doplněny 1 μ l vyizolovanou DNA do celkového množství 25 μ l. Testování primerů proběhlo na zkušební skupině mikroorganismů uvedené v tabulce 2 (vyjma *Streptococcus thermophilus*).

Tabulka 4: Složení směsi pro PCR

Komponenta	Množství (μ l)
Master mix	12,5
PCR voda	9,5
Primer 1 ^a	1
Primer 2 ^a	1
Templátová DNA ^b	1
Celkem	25

^a – v koncentraci 5 pmol/ μ l, ^b – v koncentraci 10 – 30 ng/ μ l

Tabulka 5: PCR primery – navržené Walter et al. (2010)

Primer	Sekvence primerů 5'-3'	Teplota nasednutí (°C)	PCR produkt (bp)
UreC-F	GAAAGTCTTTTTGGTGGTGG	50-55 (gradient)	324
UreC-R	AACGTCGTCAGGAATCTTAG	55-65 (gradient)	

Tabulka 6: PCR primery – navržené ve spolupráci s Elena Maria Martino, IGFL – Francie (2017)

Primer	Sekvence primerů 5'-3'	Teplota nasednutí (°C)	PCR produkt (bp)
Ure_ABC_F	GAAGTTGGGAATGATGCGAC	57	300
Ure_ABC_R	ACGACTTCCAATTCTTGCC		
Ure_D_F	TGGACGACCTGTATTTTCGAG	57	300
Ure_D_R	CGTTCGAGAACACCGAGT		

Tabulka 7: PCR primery – navržené Jiřím Killerem, AV ČR (2019)

Primer	Sekvence primerů 5'-3'	Teplota nasednutí (°C)	PCR produkt (bp)
UreCBifF	AACCTCATCATCGARGTC	51	887
UreCBifR	CAGACCATCATCATGTC		

4.2.2.3 PCR proces

Zkumavky byly umístěny do termocykleru a poté spuštěna PCR reakce. PCR program probíhal ve třech opakujících se fázích. Počáteční denaturace probíhala při teplotě 95 °C po dobu 5 minut, následovalo 32 cyklů zahrnujících denaturaci po dobu 30 sekund při teplotě

95 °C. Pro optimalizaci teploty nasednutí byl u primerů ureC zvolen teplotní gradient v rozmezí 50-55°C a následně 55-65°C. U primerů Ure_ABC a Ure_D probíhalo nasednutí primerů 30 sekund při 57 °C. Elongace probíhala po dobu 30 sekund při 72 °C. Finální krok elongace trval 10 minut při 72 °C, načež následovalo ochlazení na 4 °C. Primer UreCBif byl nejprve vyzkoušen podle programu uvedeným výrobcem. Z důvodu nespecifičnosti reakce a vzniku většího počtu produktů než bylo požadováno, byl program optimalizován, viz tabulka 8. S daným programem byly otestovány všechny kmeny uvedené v tabulce 3.

Tabulka 8: PCR programy s primery UreCBif

Fáze	Navrženo autorem		Upraveno v rámci diplomové práce	
Počáteční denaturace	95 °C	5 min	95 °C	5 min
Denaturace	95 °C	45 s	95 °C	30 s
Nasednutí primerů	50 °C	55 s	51 °C	30 s
Elongace	72 °C	70 s	72 °C	1 min
Finální elongace	72 °C	7 min	72 °C	10 min
Ochlazení	4 °C	∞	4 °C	∞

4.2.2.4 Agarózová gelová elektroforéza

Jedná se o poslední krok PCR, díky němuž byly detekovány vzniklé PCR produkty. Princip elektroforézy spočívá v migraci elektricky nabitých částic v elektrickém poli.

Postup:

- 1) Do 100 ml TAE (Tris-acetát-EDTA) pufru (0,75 krát koncentrovaný) byl přidán 1 g práškové agarózy.
- 2) Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě (3 min.)
- 3) Do směsi bylo přidáno 5 µl GelRed barviva (Biotum).
- 4) Roztok byl nalit do elektroforézy, do nádoby s hřebínky a nechal se ztuhnout při laboratorní teplotě (cca 30 min.).
- 5) Hřebínky byly opatrně vyjmuty, čímž vznikly komůrky pro PCR směs.
- 6) Gel byl zalit TAE pufrem v nádobě elektroforézy.
- 7) Do jamek v gelu bylo automatickou pipetou nanášeno po 5 µl PCR směsi. Do první a poslední jamky byl nanášen velikostní standart v objemu 2,5 µl, který byl přidán pro odhad velikosti pozorovaných fragmentů DNA. Velikost fragmentu se udává jako počet bází – bp (base pair).

- 8) Nádoba elektroforézy byla přikryta víkem a připojena ke zdroji napětí 130 V po dobu 60 minut.

4.2.2.5 Vyhodnocení

Po hodině elektroforézy byl gel přenesen, vizualizován pomocí Gel-Doc systému (BioRad) a byl pořízen elektroforeogram.

5 Výsledky

5.1 Výběr spolehlivých metod pro testování ureázové aktivity

Při výběru spolehlivé metody byla testována skupina 15 kmenů bakterií, pocházející z různých ekologických nik.

V ANAEROtestu 23 byly pozitivní kmeny DSM 28597, DSM 20211, MB 7/5 a MB 7/6. U ostatních kmenů byla reakce negativní. U testu RAPID 32 ID nevyšel žádný pozitivní výsledek. Z důvodu nepřesných výsledků a finanční náročnosti komerčních testů nebyly vybrány pro další testování ureázové aktivity.

Dalšími metodami stanovení ureázové aktivity byly API 50 CHL a Urea base médium s přídavkem močoviny ve formě agaru. Oba agary byly připraveny ve třech variantách: podle složení uvedené výrobcem, s přídavkem glukózy a s přídavkem laktózy. U varianty podle výrobce bez cukru byl zaznamenán pozitivní výsledek pouze u kmenů DSM 28597, DSM 20211, MB 7/5 a MB 7/6. Ostatní kmeny neprojevily ureázovou aktivitu. Ve variantách API i Urea base s přídavkem glukózy a laktózy vykazovaly všechny kmeny pozitivní reakci, kromě kmenu Danone a DSM 20219, což je pozitivní, jelikož tyto kmeny by měly být ureáza negativní. Naopak tomu bylo u agaru Urea base se složením podle výrobce, kdy ani jeden kmen neprojevil barevnou reakci.

Jako tekuté médium bylo vybráno API 50 CHL připravené v laboratorních podmínkách podle složení uvedené výrobcem média a s přídavkem močoviny. Z testovaných 15 kmenů projeví 4 kmeny barevnou změnu – vykazovaly ureázovou aktivitu a došlo u nich k výraznému navýšení pH, které se pohybovalo v rozmezí 7,7 až 7,9. Jednalo se o kmeny DSM 28597, DSM 20211, MB 7/5 a MB 7/6. Ostatní kmeny byly ureáza negativní s pH v rozmezí 5,4 až 5,7. Tato metoda byla z navržených metod nejspolehlivější a byla proto vybrána společně s API 50 CHL agarem pro další testování ureázové aktivity.

Wilkins-Chalgren médium s přídavkem močoviny bylo připravené ve třech variantách. V médiu připraveném podle složení uvedené výrobcem byly dva kmeny pozitivní a jeden vykazoval slabě pozitivní reakci. Ve variantě s přídavkem sójového peptonu nevykazoval žádný kmen ureázovou aktivitu. V médiu s přídavkem laktózy došlo u dvou kmenů k barevné změně a lehkému zakalení, vykazovaly tudíž pozitivní reakci. Nicméně pozitivní reakce nebyly příliš výrazné, proto tato metoda nebyla vybrána pro další testování ureázové aktivity. Výsledky všech testovaných metod jsou zobrazeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Výsledky ureázových testů vybraných metod

KOMERČNÍ S.			AGARY						MÉDIA			
Kmen	AT 23	RAP	API a	API b	API c	U B ^a	U B ^b	U B ^c	AP I ^a	WC a	WC c	WC d
ETH 11-5	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Dano ne	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DSM 28597	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
DSM 20090	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
DSM 20211	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
DSM 20088	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
DSM 20219	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ST	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
MA 2	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
TA 2	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
MB 7/5	+	-	+	+	+	-	+	+	+	*	-	-
MB 7/6	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
MB 5/3	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
NB	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
IN 2	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-

Vysvětlivky:

(+) - pozitivní reakce, (-) - negativní reakce, (AT 23) - ANAERObtest 23, (RAP) - RAPID 32 ID, (UB) – Urea Base médium, (WC) - Wilkins-Chalgren médium, (^a) - dle složení uvedené výrobcem, (^b) – s přidavkem glukózy, (^c) - s přidavkem laktózy, (^d) – s přidavkem sójového peptonu

5.2 Biochemické testování ureázové aktivity

Při testování ureázové aktivity na základě biochemických reakcí bylo otestováno 63 sbírkových kmenů rodu *Bifidobacterium*. V tabulce 7 jsou uvedeny kmeny, které v biochemických testech reagovaly pozitivně. Barevnou změnu vykazovalo 10 kmenů. Při pozitivní reakci došlo k navýšení pH v rozmezí 7,3-8,5. U ureáza negativních kmenů se pH pohybovalo v rozmezí 5,2-6,4. Testované kmeny pocházely z různých ekologických nik. Všechny kmeny izolované ze stolice dospělého člověka, mléčných výrobků, kravského bacheru, krve, zubního plaku, trávicího traktu včel a čmeláků, trávicího traktu psa, kuřat a hlodavců reagovaly negativně. Ureáza pozitivní kmeny pocházely ze stolice kojenců, výkalů kosmanů, výkalů prasat, výkalů králíků a odpadní vody. Jednalo se o kmeny druhu *B. kashiwanohense*, *B. callitrichos*, *B. bifidum*, *B. tissieri*, *B. subtile*, *B. bifidum* *B. magnum* a poddruhu *B. longum* subsp. *suis*, *B. longum* subsp. *suillum* a *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*. Během prvotního testování byla ureázová aktivita detekována také u kmenů poddruhu *B. longum* subsp. *infantis* (DSM 20088 a DSM 20090) a ostatních kmenů *B. longum* bez poddruhového určení (MA 2, TA 2). Z výsledků je patrné, že aktivita se během biochemického testování nemusí vždy projevit, což je patrné z výsledků kmenů DSM 20088 a DSM 20090, které byly použity jakožto sbírkové i později a nedošlo k fenotypovému potvrzení s použitým biochemickým testem (tabulka 9 a příloha 4).

Tabulka 10 – Seznam pozitivních sbírkových kmenů (vyjma kmenů v tab. 9)

Druh, poddruh	Kód DSM	API médium	API agar	pH	Izolováno
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	21854	+	+	7,9	Stolice kojence
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	23973	+	+	8	výkaly kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	20099	+	+	7,7	Prasečí výkaly
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3762	+	+	7,6	Stolice kojence
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	100201	+	+	8,0	Výkaly mláďat kosmanů

					(<i>Callithrix jacchus</i>)
<i>Bifidobacterium subtile</i>	20096	+	+	7,3	Odpadní voda
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	29521	+	-	8,5	Stolice kojence
<i>Bifidobacterium magnum</i>	20222	+	+	8,5	Králičí výkaly
<i>Bifidobacterium longum subsp. suis</i>	20211	+	+	7,7	Prasečí výkaly
<i>Bifidobacterium longum subsp. suillum</i>	28597	+	+	7,7	Prasečí výkaly

Vysvětlivky:

(+) - pozitivní reakce, (-) - negativní reakce

5.3 PCR detekce

PCR detekce ureázových genů byla provedena se 4 různými páry primerů: UreC, Ure_ABC, Ure_D a UreCBif. Primery byly opět nejdříve testovány na zkušební skupině kmenů. Výsledky této skupiny jsou zobrazeny v tabulce 11.

Tabulka 11 – Výsledky zkušebních kmenů s testovanými primery

Kmen	UreC	Ure_ABC, Ure_D	UreCBif
(ETH 11-5)	-	-	+
(Danone)	-	-	-
DSM 28597	-	-	+
DSM 20090	-	+	+
DSM 20211	-	-	+
DSM 20088	-	+	+
DSM 20219	-	-	-
MA 2	-	-	N
TA 2	-	-	N
MB 7/5	-	-	+
MB 7/6	-	N	+
MB 5/3	-	-	+
NB	-	N	+
IN 2	-	+	+

Vysvětlivky:

(+) - pozitivní reakce, (-) - negativní reakce, (N) – nespecifická reakce (PCR produkt jiné velikosti)

Nejprve proběhlo testování s párem primerů UreC navrženými Walterem et al. (2010). Pro optimalizaci teploty nasednutí primerů byl zvolen teplotní gradient v rozmezí 50-55°C a následně 55-65°C a autorem navržený program. Nebyla však nalezena žádná vyhovující teplota pro využití těchto primerů pro detekci ureázových genů u bifidobakterií. Dalšími testovanými primery byly Ure_ABC a Ure_D navržené Dr. Maria Elena Martino ve spolupráci s IGFL (Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Francie). Bylo zjištěno, že tyto primery jsou specifické pro poddruh *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a z tohoto důvodu u všech ostatních druhů bifidobakterií nepoužitelné. Posledním z testovaných primerů byl UreCBif navržený Jiřím Killerem (2019). PCR program byl spuštěn dle pokynů navrhovatele, ale bylo zjištěno, že reakce není specifická a vzniká větší počet produktů, než je požadováno. Výsledek této reakce je zobrazen v příloze 7. Z tohoto důvodu byl program upraven a shledán po úpravě použitelný pro detekci genu *UreC* u bakterií rodu *Bifidobacterium* (příloha 8). S daným programem byly poté otestovány všechny uvedené testované sbírkové kmeny. Přehled pozitivních kmenů je zobrazen v tabulce 12. Jedná se o kmeny *B. callitrichos* DSM 23973, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20090, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* DSM 20088, *B. longum* subsp. *suillum* DSM 28597, *B. longum* subsp. *suis* DSM 20211, *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* ETH 11-5, *B. scardovii* DSM 13734, *B. subtile* DSM 20096, *B. tissieri* DSM 100201. Ostatní kmeny byly negativní, nebyl u nich nalezen testovaný gen (*UreC*) pro ureázovou aktivitu. Navíc jsou pro porovnání v tabulce zahrnuty i výsledky biochemického testování. Tyto výsledky byly dále porovnávány s genomovými informacemi. Genomy vybraných bifidobakterií pocházejí z databáze NCBI genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) a k analýze výsledků je používán program RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Data byla stažena a poskytnuta Věrou Neužil Bunešovou. Genomové informace vybraných kmenů jsou zobrazeny v příloze 5, ureázové geny bifidobakterií a jejich funkce v příloze 6. Podle uvedených informací by geny (*UrtA*, *UrtB*, *UrtC*, *UrtD*, *UrtE*, *Transp.*, *β/γ sub.*, *α sub.*, *UreE*, *UreF*, *UreG*, *UreD*) pro ureázovou aktivitu měly být přítomny v genomu *B. callitrichos* DSM 23973, *B. longum* subsp. *infantis* DSM 20090, *B. longum* subsp. *infantis* DSM 20088, *B. longum* subsp. *suillum* DSM 28597, *B. longum* subsp. *suis* DSM 20211, *B. longum* subsp. *suis* ETH 11-5, *B. scardovii* DSM 13734, *B. subtile* DSM 20096, *B. tissieri* DSM 100201, což koresponduje s výsledky PCR s navrženým primerem UreCBif. Jsou zde pouze 4 kmeny lišící se výsledkem biochemického testu. V případě *B. scardovii* nebyla zaznamenána ureázová aktivita prostřednictvím biochemického testu. Pravděpodobně nedošlo k expresi daného genu, nebo nebyl kmen kultivován za optimálních podmínek, jelikož dle genomických dat a PCR je zde

přítomen potřebný gen a celá řada ostatních genů pro ureázovou aktivitu. Naopak pozitivní reakce byla zaznamenána u kmenů *B. bifidum* ATCC 29521, *B. catenulatum* subsp. *kashiwanohense* DSM 21854, *B. magnum* DSM 20222, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* DSM 20099, ale potřebné geny nebyly detekovány. Zde se může jednat například o kontaminaci během testování. Typový kmen *B. kashiwanohense* DSM 21854 sice podle genomové analýzy nemá geny pro ureázovou aktivitu, nicméně jiný kmen tohoto druhu PV20-2 pocházející z afrického kojence těmito geny disponuje (příloha č. 5).

Výsledky této práce poukazují na přítomnost genů a samotné ureázové aktivity u druhu *B. longum* subsp. *infantis* a to u více kmenů, pocházejících z trávicího traktu kojence. Jedná se o kmeny *B. longum* subsp. *infantis* DSM 20090 a *B. longum* subsp. *infantis* DSM 20088. Z trávicího traktu kojence také pochází ureáza pozitivní kmen *B. longum* subsp. *suis* ETH 11-5. Oba kmeny *B. longum* subsp. *suillum* DSM 28597 a *B. longum* subsp. *suis* DSM 20211 pocházejí z trávicího traktu prasat. Kmeny *B. callitrichos* DSM 23973 a *B. tissieri* DSM 100201 mají původ v trávicím traktu kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*). Ureáza pozitivní kmen *B. scardovii* DSM 13734 byl izolován z krve a kmen *B. subtile* DSM 20096 z odpadních vod.

Tabulka 12 – Výsledky porovnání biochemických, PCR pro UreCBif a genomických informací vybraných sbírkových kmenů

Druh	Kód	Biochemický test	PCR UreCBif	Přítomnost UreC v genomu
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	29521	+	-	-
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	23973	+	+	+
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> subsp. <i>kashiwanohense</i>	21854	+	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	20090	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	20088	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	20219	-	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i>	28597	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	20211	+	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	ETH 11-5	+	+	+

<i>Bifidobacterium magnum</i>	20222	+	-	-
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	20099	+	-	-
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	13734	-	+	+
<i>Bifidobacterium subtile</i>	20096	+	+	+
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	100201	+	+	+

6 Diskuze

Ureáza patří mezi aminohydrolázy, štěpící močovinu na amoniak a oxid uhličitý. Tento enzym produkuje mnoho bakterií včetně některých druhů rodu *Bifidobacterium*. V těle člověka i zvířat se mohou ureolytické bakterie podílet na zlepšení využitelnosti dusíku. Tato aktivita může být výhodná pro mikroorganismy i pro hostitele, a to zejména v případě nedostatku bílkovin ve stravě (Yatsunencko et al. 2012). Rod *Bifidobacterium* patří mezi nejčastěji užívané probiotické rody. V současné době se řadí do tohoto rodu okolo 80 druhů a poddruhů (List of prokaryotic names with standing nomenclature 2019)

V této práci byla otestována ureázová aktivita u 63 kmenů rodu *Bifidobacterium*. Bylo vyzkoušeno 12 různých variant biochemických testů, z nichž 2 byly vyhovující. Jednalo se o ureázový test v modifikovaném médiu a agaru API 50 CHL s přidavkem močoviny, u varianty agar doplněno ještě o glukózu. Při detekování ureázových genů pomocí polymerázové řetězové reakce byly vyzkoušeny 4 typy párů primerů: UreC, Ure_ABC, Ure_D a UreCBif. Spolehlivou reakci poskytly pouze primery UreCBif navržené Jiřím Killerem. Ureázové geny byly detekovány u 9 sbírkových kmenů. Tyto výsledky korelovaly s genomickými daty získanými z databáze NCBI a analyzovanými programem RAST. V biochemických testech bylo pozitivních 12 kmenů, z nichž se 8 shodovalo s výsledky PCR. Pozitivní reakce v biochemických testech mohla být způsobena kontaminací či nespecifickou realci. Biochemické testy nejsou vždy zcela spolehlivé a doporučujeme kombinaci s molekulárně genetickými metodami. U biochemických testů je navíc potřeba více opakování a optimalizované podmínky kultivace.

Ureáza hraje důležitou roli při novorozeneckém vývoji. Močovina obsažená v lidském mléce vyrovnává nedostatek koncentrace bílkovin pro potřebu dusíku nejen pro kojence, ale i pro střevní bakterie. Lidské mléko obsahuje přibližně 15% dusíku ve formě močoviny. Podle Mora & Arioli (2014) je *B. longum* subsp. *infantis*, jakožto jeden z prvních druhů kolonizující trávicí trakt novorozence producentem aktivní ureázy. V biochemických testech se toto tvrzení potvrdilo, jelikož izoláty poddruhu *B. longum* subsp. *infantis* byly schopny močovinu rozložit. Při ověřování ureázové aktivity pomocí PCR byly nalezeny geny, za tuto aktivitu zodpovědné. Tento fakt také koreluje s daty získanými z genomů kmenů tohoto poddruhu. Kmenové rozdíly v rámci ureázové aktivity byly nalezeny mezi genomy kmenů druhu *B. kashiwanohense*, kdy typový kmen (DSM 21854) pocházející ze stolice 1,5 roku starého kojence (Morita et al. 2011) nemá ve svém genomu potřebné geny, ale kmen PV20-2

pocházející z 6 měsíců starého kojence tyto geny má (Vazquez-Gutierrez et al. 2015; Bunesova et al. 2016).

V posledních letech bylo objeveno mnoho nových druhů rodu *Bifidobacterium* u zástupců opic a poloopic. Příkladem jsou druhy *B. aerophilum* a *B. ramosum* izolované z výkalů tamarína pinčího (Michelini et al. 2017), *B. aesculapii* izolovaný z výkalů kosmana bělovousého (Modesto et al. 2014), *B. biavatii*, *B. callitrichos*, *B. reuteri*, *B. saguini* a *B. stellenboschense* z výkalů kosmana bělovousého a tamarína žltorukého (Endo et al. 2012), *B. eulemuris* z výkalů lemura tmavého (Michelini et al. 2016) a další. V této práci bylo testováno 11 kmenů pocházejících z trávicího traktu opic a poloopic, z nichž 2 kmeny projeví ureázovou aktivitu. Oba tyto kmeny pocházely z výkalů kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*). Z tohoto důvodu je možné, že ureázová aktivita může být zapříčiněna množstvím močoviny a dusíkatých látek v těle hostitele. *B. tissieri* navíc pochází z fekálních vzorků mláďete, takže i zde může mít na ureolytickou aktivitu vliv mateřského mléka v dietě (Michelini et al. 2016).

Studie Yanokury a kol. (2015) rozdělila poddruhy *B. longum* subsp. *suis* a *B. longum* subsp. *suillum* na základě ureázové aktivity. Podle této studie je *B. longum* subsp. *suis* ureáza pozitivní, zatímco *B. longum* subsp. *suillum* ureáza negativní. Toto tvrzení bylo v bakalářské i diplomové práci vyvráceno. V této práci byly testovány 2 kmeny poddruhu *B. longum* subsp. *suis*, z nichž oba dva vykazovaly ureázovou aktivitu. Pozitivní kmeny poddruhu *B. longum* subsp. *suis* byly izolovány z prasečích výkalů a stolice afrického kojence. U poddruhu *B. longum* subsp. *suillum* byl otestován 1 kmen, který byl ureáza pozitivní a byl izolován z prasečích výkalů, což nasvědčuje tomu, že ureázová aktivita může odrážet původ kmene a dietu hostitele.

Močovina je využívána jako zdroj neproteinového dusíku v potravě přežvýkavců jakožto ekonomická náhrada krmných proteinů. Močovina je hydrolyzována bachorovou bakteriální ureázou na amoniak, který je následně využit pro syntézu mikrobiálních proteinů, potřebných pro uspokojení proteinových požadavků přežvýkavců (Jin et al. 2018). V této práci bylo testováno 5 kmenů bifidobakterií pocházejících z bachoru přežvýkavců (*B. globosum* DSM 20092, *B. ruminantium* DSM 6489, *B. adolescentis* DSM 20087, *B. merycicum* DSM 6492 a *B. thermophilum* DSM 20212). Z důvodu vysokého obsahu močoviny v potravě přežvýkavců bylo předpokládáno, že tyto kmeny budou vykazovat ureolytickou aktivitu. Toto tvrzení se však nepotvrdilo, jelikož žádný z kmenů tuto aktivitu neprojevil. Je možné, že bifidobakterie kolonizující bachor, využívají amoniak hydrolyzovaný jinými ureolytickými bakteriemi, kdy mezi mikroorganismy může docházet ke komenzalismu. Podle studie Jin et

al. (2017) vykazují ureázovou aktivitu v bacheru nejvíce kmeny *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a čeledi *Methylococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Paenibacillaceae*, *Helicobacteraceae* a *Oxalobacteraceae*.

Ureázová aktivita je typická pro bakterie *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ureoplasma urealyticum* a další, u nichž působí jako faktor virulence (Mora & Arioli 2014). Ureázová aktivita se tak může podílet na rozvoji některých onemocnění např. žaludečních a duodenálních vředů, infekcí ledvin, močových kamenů či jaterní encefalopatie, kdy vzniklý amoniak napomáhá bakteriím v přilnutí na vnějších površích (např. žaludku, ledvin, močových cestách a játrech), jelikož způsobuje poškození vrstev, které ochraňují epiteliální buňky před bakteriálními infekcemi (Rutherford 2014).

Na druhou stranu ureolytické bakterie v lidském trávicím traktu hydrolyzují až 30 % veškeré močoviny, která vzniká během metabolismu dusíkatých látek (Kappaun et al. 2018). Uvolněný dusík je poté hostiteli k dispozici a může znovu vstoupit do dusíkového cyklu a být použit jako substrát pro syntetické procesy (Wright 1995). Ureolytické bakterie a ureáza jsou klíčové pro správné využití močoviny a snížení toxicity amoniaku (Patra & Aschenbach 2018). Ureázová aktivita také napomáhá k zabránění výskytu kariogenních mikroorganismů, má tak pozitivní vliv na zdraví zubů (Liu et al. 2012; Mora & Arioli 2014). U bifidobakterií, často využívaných jako probiotika, mohou být tyto vlastnosti přínosné a mít pozitivní dopad na člověka.

7 Závěr

V hypotetickém předpokladu diplomové práce byla očekávána ureázová aktivita především u izolátů rodu *Bifidobacterium*, pocházejících od hostitelů s vysokým obsahem bílkovin a močoviny v dietě, což nebylo plně potvrzeno. Byla však nalezena spojitost mezi ureázovou aktivitou bifidobakterií a jejich původem.

Byly nalezeny vhodné biochemické metody pro stanovení ureázové aktivity u bifidobakterií. I zde je potřeba brát v potaz, že se jedná o biochemické testy, kdy je třeba řádně metodu optimalizovat a unifikovat podmínky provedení a dělat ve více opakováních. Pro spolehlivé výsledky je však třeba kombinace s molekulárně genetickými metodami.

V rámci této práce byl nalezen a optimalizován specifický primer pro PCR vhodný k detekci jednoho z genů (*UreC*) zodpovědných za ureázovou aktivitu u rodu *Bifidobacterium*. Těchto genů je však více, tudíž by bylo vhodné do budoucna navrhnout i pro ně specifické primery. Bude tak možné lépe stanovit danou aktivitu bifidobakterií nejen na úrovni detekce, ale třeba i kvantifikace v totální bakteriální DNA izolované ze stolice kojenců v různém věku a dalších jedinců. Také bude třeba při optimalizaci primerů zkontrolovat další dostupné bifidobakteriální genomy a využít toho při optimalizaci PCR reakcí pro navržené primery.

Ureázová aktivita bifidobakterií představuje specifickou a přínosnou vlastnost, která má potenciál v probiotické aplikaci a její další výzkum je žádoucí.

8 Seznam literatury

- Amaretti A, Bernardi T, Tamburini E, Zanoni S, Lomma M, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides. *Applied and environmental microbiology* **73**:3637-3644.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. : CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**:1709–1712.
- Biavati B, Scardovi V, Moore WEC. 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of 4 new species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**:358 – 373.
- Bottacini F, van Sinderen D, Ventura M. 2017. Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *Biochemical Journal* **474**:4137–4152.
- Buddington RK. 2003. Postnatal changes in bacterial populations in the gastro-intestinal tract of dogs. *American Journal of Veterinary Research* **64**:646–651.
- Bunesova V, Lacroix C, Schwab C. 2016. Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium kashiwanohense*. *BMC Microbiology* **16**:1-12.
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Killer J, Musilová Š. 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes* **5**:377-388.
- Burne RA, Chen YM. 2000. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection* **2**:533–542.
- Collins CM, D’Orazio SEF. 1993. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Molecular Microbiology* **9**:907–913.
- Cotter PD, Hill C. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**:429-453.
- Czerkawski JW, Breckenridge W. 1982. Distribution and changes in urease (EC 3.5.1.5) activity in Rumen Simulation Technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition* **47**:331-348.
- D’Argenio G, Mazzacca G. 1999. Short-chain fatty acid in the human colon. Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **472**:149-158.

- De Koning-Ward TF, Robins-Browne RM. 1995. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity* **63**:3790–3795.
- Degnan B, Macfarlane G. 1993. Transport and metabolism of glucose and arabinose in *Bifidobacterium breve*. *Archives of Microbiology* **160**:144-151.
- Deguchi Y, Morishita T, Mutai M. 1985. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**:13–19.
- Eckburg P, Bik E, Bernstein C, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill S, Nelson K, Relman D. 2005. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**:1635-1638.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Schumann P, Pukall R, Dicks LM. 2012. *Bifidobacterium reuteri* sp. nov., *Bifidobacterium callitrichos* sp. nov., *Bifidobacterium saguini* sp. nov., *Bifidobacterium stellenboschense* sp. nov. and *Bifidobacterium biavatii* sp. nov. isolated from faeces of common marmoset (*Callithrix jacchus*) and redhanded tamarin (*Saguinus midas*). *Systematic and Applied Microbiology* **35**:92-97.
- Felis GE, Dellaglio F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **8**:4461.
- Foley S, Stolarczyk E, Mouni F, Brassart C, Vidal O, Aïssi E, Bouquelet S. 2008. Characterisation of glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (EC 2.6.1.16) and N-acetylglucosamine metabolism in *Bifidobacterium*. *Archives of Microbiology* **189**:157–167.
- Follmer C, Wassermann GE, Carlini CR. 2004. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science* **167**:241-246.
- Fuller MF, Reeds PJ. 1998. Nitrogen cycling in the gut. *Annual Reviews of Nutrition* **18**:385-411.
- Genus *Bifidobacterium*. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [online]. [cit. 2018-12-04]. Dostupné z: <http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html>
- Gibbons RJ, Doetsch RN. 1959. Physiological study of an obligately anaerobic ureolytic bacterium. *Journal of Bacteriology* **77**:417-428.
- Gibson GS. 2008. Prebiotics as gut microflora management tools. *Journal of Clinical Gastroenterology* **42**:75-79.

- Hawkins SM. 1993. Bifidobacteria in dairy products. *Cultured Dairy Products Journal* **28**:16-20.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**:881–884.
- Javorský P, Rybošová E, Havassy I, Horský K, Kmet V. 1987. Urease activity of adherent bacteria and rumen fluid bacteria. *Physiologia Bohemoslovaca* **36**:75-81.
- Jin D, Zhao S, Wang P, Zheng N, Bu D, Beckers Y. 2016. Insights into abundant rumen ureolytic bacterial community using rumen simulation system. *Frontiers in Microbiology* **7**:1006.
- Jin D, Zhao S, Zheng N, Beckers Y, Wang J. 2018. Urea metabolism and regulation by rumen bacterial urease in ruminants – a review. *Annals of Animal Science* **18**:303–318.
- Jin D, Zhao S, Zheng N, Bu D, Beckers Y, Denman SE, McSweeney CS, Wang J. 2017. Differences in Ureolytic Bacterial Composition between the Rumen Digesta and Rumen Wall Based on ureC Gene Classification. *Frontiers in Microbiology* **8**.
- Jones GA, MacLeod RA, Blackwood AC. 1964. Ureolytic rumen bacteria: II. Effect of inorganic ions on urease activity. *Canadian Journal of Microbiology* **10**:379-387.
- Kappaun K, Piovesan AR, Carlini CR, Ligabue-Braun R. 2018. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. *Journal of Advanced Research* **13**:3-17.
- Kertz AF. 2010. Urea feeding to dairy cattle: a historical perspective and review. *The Professional Animal Scientist* **26**:257-272.
- Krajewska B, Ciurli S. 2005. Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Probing acid–base groups of the active site by pH variation. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**:651–658.
- Lee JH, O’Sullivan DJ. 2010. Genomic Insights into Bifidobacteria. *American Society for Microbiology* **74**:378–416.
- Liu LH, Ludewig U, Frommer WB, von Wiren N. 2003. AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**:790–800.
- Liu YL, Nascimento M, Burne RA. 2012. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *International Journal of Oral Science* **4**:135-140.
- Mahadevan S, Sauer F, Erfle JD. 1976. Studies on bovine rumen bacterial urease. *Journal of Animal Science* **42**:745-753.

- Marini JC, Klein JM, Sands JM, Van Amburgh ME. 2004. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. *Journal of Animal Science* **82**:1157-1164.
- Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. 2004. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology* **93**:109-113.
- Matteuzzi D, Crociani F. 1973. Urease production and DNA-homology in the species *Bifidobacterium suis*. *Archiv für Mikrobiologie* **94**:93-95.
- Metges CC, Petzke KJ, el-Khoury AE, Henneman L, Grant I, Bedri S, Regan MM, Fuller MF, Young VR. 1999. Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. *American Journal of Clinical Nutrition* **70**:1046–1058.
- Michelini S, Modesto M, Filippini G, Spiezio C, Sandri C, Biavati B, Pisi A, Mattarelli P. 2017. *Bifidobacterium aerophilum* sp. nov., *Bifidobacterium avesanii* sp. nov. and *Bifidobacterium ramosum* sp. nov.: Three novel taxa from the faeces of cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus* L.). *Systematic and Applied Microbiology* **39**:229-236.
- Michelini S, Modesto M, Pisi AM, Filippini G, Sandri C, Spiezio C, Biavati B, Sgorbati B, Mattarelli P. 2016. *Bifidobacterium eulemuris* sp. nov., isolated from faeces of black lemurs (*Eulemur macaco*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**:1567-1576.
- Michelini S, Oki K, Yanokura E, Shimakawa Y, Modesto M, Mattarelli P, Biavati B, Watanabe K. 2016. *Bifidobacterium myosotis* sp. nov., *Bifidobacterium tissieri* sp. nov. and *Bifidobacterium hapali* sp. nov., isolated from faeces of baby common marmosets (*Callithrix jacchus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**:255-265.
- 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, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M. 2016. Genomics of the Genus *Bifidobacterium* Reveals Species-Specific Adaptation to the Glycan-Rich Gut Environment. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:980-991.

- Mobley HLT, Garner RM, Bauerfeind P. 1995. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene *nixA*: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Molecular Microbiology* **16**:97–109.
- Mobley HL, Hu LT, Foxall PA. 1991. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **187**:39-46.
- Modesto M, Michelini S, Stefanini I, Ferrara A, Tacconi S, Biavati B, Mattarelli P. 2014. *Bifidobacterium aesculapii* sp. nov., from the faeces of the baby common marmoset (*Callithrix jacchus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:2819-2827.
- Mousa HM, Ali KE, Hume ID. 1983. Effects of water deprivation on urea metabolism in camels, desert sheep and desert goats fed dry desert grass. *Comparative Biochemical and Physiological Anatomy* **74**:715–720.
- Mora D, Arioli S. 2014. Microbial Urease in Health and Disease. *PLOS Pathogens* **10**:1-4.
- Morita H, Nakano A, Onoda H, Toh H, Oshima K, Takami H, Murakami M, Fukuda S, Takizawa T, Kuwahara T, Ohno H, Tanabe S, Hattori M. 2011. *Bifidobacterium kashiwanohense* sp. nov., isolated from healthy infant faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**:2610 –2615.
- Muck RE. 1982. Urease activity in bovine feces. *Journal of Dairy Science* **65**:2157-2163.
- O’Sullivan DJ. 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:1751–1760.
- Patra AK, Aschenbach JR. 2018. Ureases in the gastrointestinal tracts of ruminant and monogastric animals and their implication in urea-N/ammonia metabolism: A review. *Journal of Advanced Research* **13**:39-50.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition* **6**:285–306.
- Rastall R, Gibson G, Gill H, Guarner F, Klaenhammer T, Pot B, Reid G, Rowland I, Sanders M. 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology* **52**:145-152.
- Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **149**:88-105.
- Rutherford JC. 2014. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLOS Pathogens* **10**:1-3.

- Scardovi V. 1984. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924. Bergey's manual of systematic bacteriology **1**:1418-1734.
- Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proceedings of the National Academy of Sciences **99**:14422–14427.
- Shin SY, Park JH. 1997. Activities of oxidative enzymes related with oxygen tolerance in *Bifidobacterium* sp. Journal of Microbiology and Biotechnology **7**:356–359.
- Smith CJ, Hespell RB, Bryant MP. 1981. Regulation of urease and ammonia assimilatory enzymes in *Selenomonas ruminantium*. Applied and Environmental Microbiology **42**:89-96.
- Smith DG, Russell WC, Ingledew WJ, Thirkell D. 1993. Hydrolysis of urea by *Ureaplasma urealyticum* generates a transmembrane potential with resultant ATP synthesis. Journal of Bacteriology **175**:3253–3258.
- Spears JW, Smith CJ, Hatfield EE. 1977. Rumen bacterial urease requirement for nickel. Journal of Dairy Science **60**:1073-1076.
- Starnes SR, Spears JW, Froetschel MA, Croom WJ. 1984. Influence of monensin and lasalocid on mineral metabolism and ruminal urease activity in steers. The Journal of Nutrition **114**:518-525.
- Stewart GS, Smith CP. 2005. Urea nitrogen salvage mechanisms and their relevance to ruminants, non-ruminants and man. Nutrition Research Reviews **18**:49–62.
- Vazquez-Gutierrez P, Lacroix C, Chassard C, Klumpp J, Jans C, Stevens MJA. 2015. Complete and Assembled Genome Sequence of *Bifidobacterium kashiwanohense* PV20-2, Isolated from the Feces of an Anemic Kenyan Infant. American society for microbiology **3**.
- Ventura M, Sinderen D, van, Fitzgerald FG, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. Antonie van Leeuwenhoek **86**:205-223.
- Ventura, M, Turrioni F, Zomer A, Foroni E, Giubellini V, Bottacini F, Canchaya C, Claesson MJ, He F, Mantzourani M, Mulas L, Ferrarini A, Gao B, Delledonne M, Henrissat B, Coutinho P, Oggioni M, Gupta RS, Zhang Z, Beighton D, Fitzgerald GF, O'Toole PV, van Sinderen D. 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 Genome Sequence Reflects Its Genetic Adaptation to the Human Oral Cavity. PLOS Genetics **5**.

- Walter J, Britton RA, Roos S. 2010. Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**:4645-4652.
- Wei H, Chen L, Lian G, Yang J, Li F, Zou Y, Lu F, Yin Y. 2018. Antitumor mechanisms of bifidobacteria. Oncology letters **16**:3-8.
- Wilson CM, Loach D, Lawley B, Bell T, Sims I. 2014. *Lactobacillus reuteri* 100-23 modulates urea hydrolysis in the murine stomach. Applied and Environmental Microbiology **80**:6104–6113.
- Wright PA. 1995. Nitrogen excretion:three end products, many physiological roles. The Journal of Experimental Biology **198**:273–281.
- Wrong O. 1978. Nitrogen metabolism in the gut. The American Journal of Clinical Nutrition **31**:1587-1593.
- Yatsunencko T, Rey FE, Manary M, Trehan I, Dominguez-Bello MG. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature **486**:222-227

9 Přílohy

Příloha 1: Složení API 50 CHL média

	Komponenty	Množství
Varianta č. 1	Polypepton	10 g
	Kvasnicový extrakt	5 g
	Tween 80	1 ml
	Fosforečnan draselný	2 g
	Octan sodný	5 g
	Citrát amonný	2 g
	Síran hořečnatý	0,2 g
	Síran manganatý	0,05 g
	Demineralizovaná voda	1000 ml
	Fenolová červeň	0,012 mg
	*Agar	15 g
Varianta č. 2	+ Glukóza	1 g
Varianta č. 3	+ Laktóza	1 g

* pouze u API agaru

Příloha 2: Složení Urea Base Agaru

	Komponenty	Množství
Varianta č. 1	Pepton	1 g
	Chlorid sodný	5 g
	fosforečnan sodný	1,2 g
	Dihydrogenfosforečnan draselný	0,8 g
	Agar	15 g
	Demineralizovaná voda	1000 ml
	Fenolová červeň	0,012 mg
	Varianta č. 2	+ Glukóza
Varianta č. 3	+ Laktóza	1 g

Příloha 3: Složení Wilkins-Chalgren média

	Komponenty	Množství
Varianta č. 1	Trypton	10 g
	Pepton	10 g
	Kvasniční extrakt	5 g
	Chlorid sodný	5 g
	L-arginin	1 g
	Na-pyruvát	1 g
	Hemin	5 mg
	Menadion	0,5 mg
	Demineralizovaná voda	1000 ml
	Fenolová červeň	0,012 mg
	Glukóza	1 g
Varianta č. 2	+ Laktóza	1 g
Varianta č. 3	+ Sójový pepton	1 g

Příloha 4: Výsledky ureázového testu v API 50 CHL s přidavkem močoviny

Druh, poddruh	Kód DSM	API médium	API agar	pH
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	22766	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	4987	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	20087	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium animalis</i>	4988	*	*	7,3
<i>Bifidobacterium animalis</i>	26074	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	20104	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	10140	-	-	6,2
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	10104	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	20089	-	-	6,3

<i>Bifidobacterium avesonii</i>	100685	-	-	6,3
<i>Bifidobacterium biavatii</i>	23969	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	20215	-	-	6,4
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	20082	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	29521	+	-	8,5
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3762	+	+	7,6
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	20239	-	-	6,4
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	20456	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	22767	-	-	5,7
<i>Bifidobacterium bombi</i>	19703	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium breve</i>	15700	-	-	6,3
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	23973	+	+	8
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	16992	-	-	5,2
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	4989	-	-	4,4
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	21854	+	+	7,9
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	20216	-	-	6,4
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	20435	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	20093	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium globosum</i>	20092	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium hapali</i>	100202	-	-	5,2
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	20434	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium indicum</i>	20214	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium lemorum</i>	28807	*	-	7,0

<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	17930	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	20088	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	4990	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	20090	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	20219	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium longum subsp. suillum</i>	28597	+	+	7,7
<i>Bifidobacterium longum subsp. suis</i>	20211	+	+	7,7
<i>Bifidobacterium magnum</i>	20222	+	+	8,5
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	6492	*	-	7,0
<i>Bifidobacterium minimum</i>	20102	-	-	6,3
<i>Bifidobacterium moukalabense</i>	27321	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium myosotis</i>	100196	-	-	5,7
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	20438	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium pseudolongum subsp. pseudolongum</i>	20099	+	+	7,7
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	20433	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	6531	-	-	6,3
<i>Bifidobacterium ramosum</i>	100688	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	6489	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium saguini</i>	23967	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	13734	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	23968	-	-	6,0

<i>Bifidobacterium stercoris</i>	24849	-	-	6,0
<i>Bifidobacterium subtile</i>	20096	+	+	7,3
<i>Bifidobacterium thermacidophilum subsp. porcinum</i>	17755	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium thermacidophilum subsp. thermacidophilum</i>	15837	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	20210	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	20212	-	-	5,4
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	100201	+	+	8
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>	17777	-	-	5,7

Vysvětlivky:

(+) - pozitivní reakce, (-) - negativní reakce, (*) – reakce slabě pozitivní

Příloha 5: Ureázové geny u vybraných testovaných kmenů (NCBI genome, 2019)

Kmen	Urt A	Urt B	Urt C	Urt D	Urt E	Tra nsp.	β/γ sub.	α sub.	Ure E	Ure F	Ure G	Ure D
BINF 20088	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BSUIS 20211	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BSUIS 11-5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BSUIL 1461*	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BADO 20083	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLON 20219	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BBIF 20456	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
BBRE BR03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BKAS 21854	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BKAS PV20-2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

BPSE 20092	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPSE 20099	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BCAL 23973	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BSCA R 13734	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BRU M 6489	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BANG 20098	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BMIN 20102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGAL L 20093	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BDEN 20436	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BMA G 20222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLEM 28807	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BMER 6492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BSUB 20096	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Vysvětlivky:

(+) - pozitivní reakce, (-) - negativní reakce

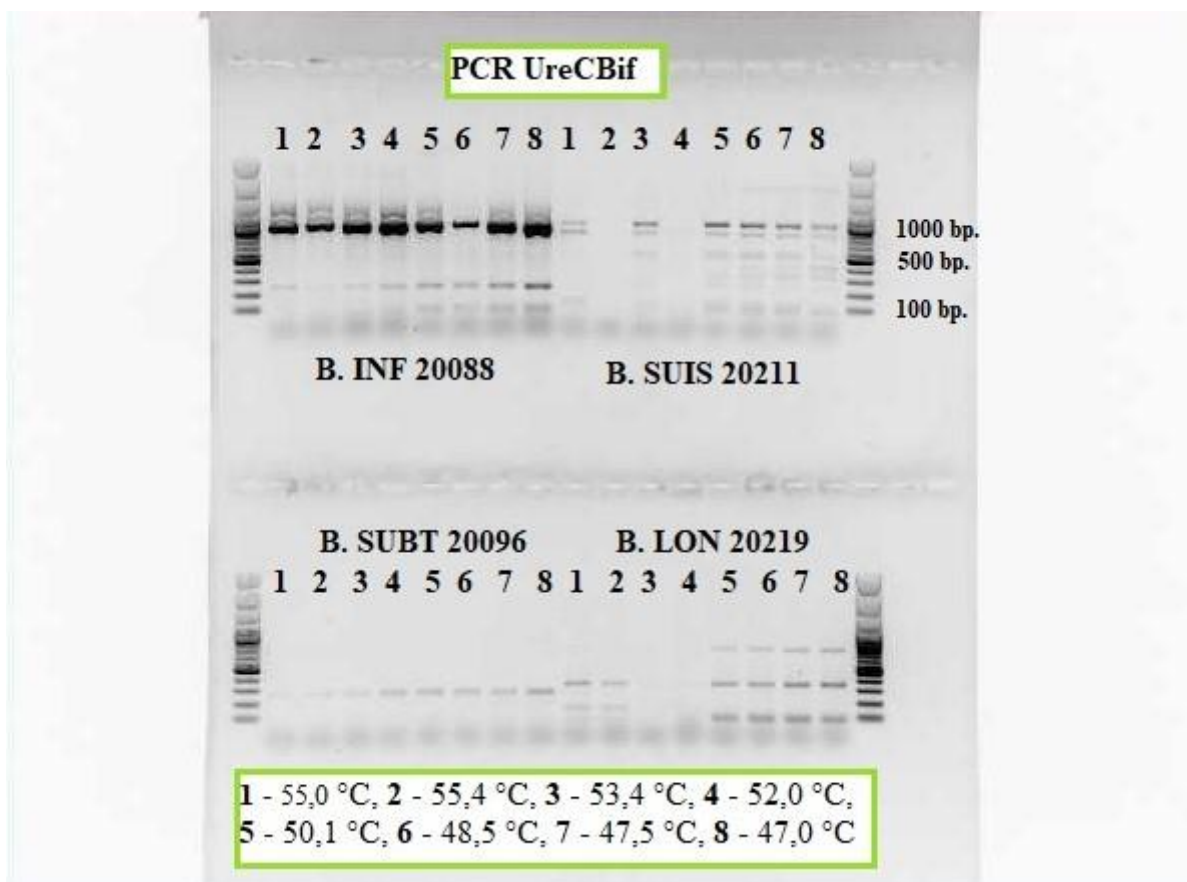
* - pro typový kmen není dostupný genom

Příloha 6: Ureázové geny a jejich funkce (NCBI genome, 2019)

Gen	Funkce
<i>UrtA</i>	Rozklad močoviny
<i>UrtB</i>	Rozklad močoviny
<i>UrtC</i>	Rozklad močoviny
<i>UrtD</i>	Rozklad močoviny
<i>UrtE</i>	Rozklad močoviny
<i>Transp. β/γ sub.</i>	Transport niklu a kobaltu
<i>a sub.</i>	Biosyntéza metalocentra, rozklad močoviny, ureázové podjednotky
<i>UreE</i>	Ureázové podjednotky
<i>UreF</i>	Biosyntéza metalocentra, rozklad močoviny, ureázové podjednotky

<i>UreG</i>	Biosyntéza metalocentra, rozklad močoviny, ureázové podjednotky
<i>UreD</i>	Biosyntéza metalocentra, rozklad močoviny, ureázové podjednotky

Příloha 7: Výsledek PCR s primery UreCBif dle pokynů navrhovatele



Příloha 8: Výsledek PCR s primery UreCBif po úpravě programu

