

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Identifikace bifidobakterií pomocí MALDI-TOF
hmotnostní spektrometrie**

Bakalářská práce

Autor práce Kateřina Hepnarová

Obor studia Výživa a potraviny

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

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Identifikace bifidobakterií pomocí MALDI TOF hmotnostní spektrometrie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, PhD. za její odborné rady, ochotu, trpělivost, čas a profesionální přístup. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí pracovního prostoru a vhodných podmínek.

Identifikace bifidobakterií pomocí MALDI TOF hmotnostní spektrometrie

Souhrn

Rod *Bifidobacterium* patří mezi bakterie dominantně zastoupené ve střevní mikrobiotě lidí a zvířat, především v období mléčné výživy. Jedná se o sacharolytické bakterie, které pro své příznivé účinky na zdraví hostitele našly uplatnění jako probiotika. Bifidobakterie byly objeveny již roku 1899, ale až roku 1924 byly identifikovány jako samostatný rod. V současné době je známo více než 80 druhů bifidobakterií od různých hostitelů. Vzhledem k narůstajícímu počtu a hostitelské variabilitě druhů náležejících do *Bifidobacterium* spp. je třeba pracovat na rychlých a spolehlivých metodách jejich identifikace.

Cílem práce bylo ověřit funkčnost nově rozšířené databáze pro hmotnostní spektrometrii. Původní databáze od Bruker obsahovala 25 kmenů bifidobakterií. Tuto databázi se za spolupráce s BOKU v Vídni povedlo rozšířit o dalších 50 kmenů na celkem 75 kmenů. Dále bylo cílem identifikovat u zvířecích vzorků multihostitelské druhy.

V této práci byly použity izoláty rodu *Bifidobacterium* ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky. Jednalo se o vzorky divokých kmenů od novosvětských opic lvíčka zlatého ze ZOO Olomouc. Dále pak byly použity i lidské vzorky.

Celkem 144 testovaných vzorků bylo čersvě vykultivováno ze zramžených kultur. Pro kultivaci bylo využito tekuté modifikované Wilkins-Chalgren médium. Čistota narostlých kultur byla kontrolována pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem. Pro následnou identifikaci na MALDI-TOF MS byla použita metoda extrakce pomocí 70% mravenčí kyseliny a acetonitrilu. Vzorky byly vždy analyzovány ve dvou kopiích. Do výsledků práce byla zahrnuta kopie s vyšším identifikačním skóre.

Z celkových 144 vzorků se podařilo identifikovat 115 z nich, tedy 79,8 %. Nejčastěji vyskytujícími se druhy byly *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. parmae*, *B. animalis* a *B. breve*. U lvíčka zlatého se nepodařilo identifikovat všechny vzorky. Z 81 vzorků bylo identifikováno 52, což tvoří 64 %. Celkem bylo rozpoznáno 13 druhů bifidobakterií, z nichž byl nejčastějším druhem *B. parmae*. Lidských vzorků bylo celkem 63, z toho 32 od dospělých a 31 od kojenců. Tyto vzorky se podařilo identifikovat všechny, vykazovaly také vyšší skóre identifikace než vzorky od lvíčků. Celkem bylo identifikováno 9 druhů. Počet detekovaných druhů poukazuje na vyšší variabilitu zástupců rodu *Bifidobacterium* a čeledi *Bifidobacteriaceae* u lvíčka zlatého než u lidí.

Z výsledků je patrné, že se cíle práce podařilo splnit. Díky rozšíření databáze se podařilo identifikovat celkem 19 druhů. Pokud by databáze nebyla rozšířena, podařilo by se pomocí základní databáze od Bruker identifikovat pouze 47 % z identifikovaných druhů, což je 9. Podařilo se nám také identifikovat multihostitelské druhy, které se vyskytovaly jak ve vzorcích lvíčka zlatého, tak i ve vzorcích od lidí. Jednalo se o 3 druhy – *B. adolescentis*, *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum*.

Klíčová slova: Bifidobaterie; typový kmen; spektrum; databáze; identifikace

Identification of bifidobacteria by MALDI TOF mass spectrometry

Summary

Genus *Bifidobacterium* represents one of the main bacterial group in the intestinal microbiota of humans and animals, especially in the period of milk nutrition. Bifidobacteria are type of saccharolytic bacteria that are generally beneficial for host health due to their probiotic effect. Although bifidobacteria were discovered in 1899, they were not treated as separate genus before 1924. Currently, there are more than 80 species of bifidobacteria from various hosts that are known. As the number of species, as well as its host variability, has continuously been increasing, it is necessary to develop reliable methods for their identification.

The main goal of the thesis was to verify the functionality of the newly extended database for mass spectrometry. The original database created by Bruker contained 25 strains of bifidobacteria. This database was extended by 50 strains to the total number of 75 strains, in cooperation with the University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna. The additional goal was to identify multi-host species in animal samples.

In the thesis, the verification was conducted using isolates of genus *Bifidobacterium* from a collection of the Department of Microbiology, Nutrition, and Dietetics. The collection contains samples of wild tribes of new world monkey, golden marmoset from the Olomouc ZOO as well as samples of human.

In total, 144 tested samples were cultivated from frozen cultures. For the cultivation, the liquid modified Wilkins-Chalgren medium was used. The purity of the grown cultures was checked using a light microscope with phases contrast. The following identification conducted on MALDI-TOF MS used the extraction employing formic acid and acetonitrile. To achieve precise identification, the samples were analyzed twice. The outcome of the analysis with a higher identification score was included in the final results.

Overall, 115 out of 144 samples were identified correctly, i.e. 79,8 %. The most common species were *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. parvae*, *B. animalis* and *B. breve*. In the case of golden marmoset, 51 out of 81 samples were identified, corresponding to 64 %. Besides, 13 species of bifidobacteria species were determined correctly, mainly *B. parvae*. Regarding the identification of human samples, 32 were adult samples and 31 samples were from infants. All of 63 human samples were identified and indicated higher identification scores than samples from golden marmoset. Furthermore, 9 human species were identified. The number of detected species indicates higher variability of the genus *Bifidobacterium* and family *Bifidobacteriaceae* in the case of golden marmoset than in the case of humans.

The results indicate that goal of the thesis was achieved. The newly extended database was valuable for identifying 19 species. In the case of using the database created by Bruker, only 47 % of the species would have been determined correctly. Furthermore, it was possible to identify multi-host species that occurred in both golden marmoset and human samples. Such multi-host species were *B. adolescentis*, *B. catenulatum* and *B. pseudocatenulatum*.

Keywords: Bifidobacteria; type strain; spectrum; database; identification

Obsah

1 Úvod	9
2 Cíl práce.....	10
2.1 Hypotéza.....	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Rod Bifidobacterium.....	11
3.1.1 Historie.....	11
3.1.2 Taxonomie	11
3.1.2.1 Seznam druhů.....	12
3.1.3 Morfologie	16
3.1.4 Fyziologie	17
3.1.5 Metabolismus.....	17
3.1.5.1 Cross feeding.....	18
3.2 Význam a využití bifidobakterií	19
3.2.1 Význam bifidobakterií v GIT	19
3.2.2 Využití bifidobakterií v potravinách a doplňcích stravy	19
3.2.3 Probiotika.....	20
3.2.4 Bifidobakterie jako probiotika	21
3.2.5 Prebiotika.....	21
3.2.6 Synbiotika	22
3.3 Výskyt bifidobakterií	22
3.4 Možnosti identifikace a charakterizace.....	23
3.4.1 Rodová a druhová PCR pro bifidobakterie.....	23
3.4.2 MLST (Multilocus sequence typing).....	24
3.4.3 FISH.....	24
3.4.4 Kultivační metody a selektivní média	25
3.4.5 Biochemické a chemotaxonomické metody	25
3.4.5.1 Detekce enzymu F6PPK.....	25
3.4.5.2 Využití určitého substrátu jako jediného zdroje uhlíku v rámci stanovení fermentačního profilu.....	25
3.4.5.3 Analýza mastných kyselin.....	26
3.4.5.4 Proteinová analýza	26
3.5 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS.....	26
3.5.1 MALDI-TOF MS.....	26
3.5.2 Princip MALDI-TOF MS	27
3.5.4 Dostupná databáze pro identifikaci bifidobakterií – Bruker 2019.....	28
4 Metodika.....	29

4.1	Příprava vzorků	29
4.1.1	Původ vzorků	29
4.1.2	Kultivace	29
4.1.3	Příprava média	29
4.1.4	Kontrola čistoty kultury	30
4.2	Identifikace vzorků pomocí MALDI-TOF MS	30
4.2.1	Materiál	31
4.2.1.1	Postup přípravy vzorku	31
4.2.3	Čistění MALDI destičky	32
4.2.3.1	Postup čištění	32
5	Výsledky	33
6	Diskuze	36
7	Závěr	38
8	Literatura	39
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	43
10	Samostatné přílohy	I
	Příloha 1 – Rozšíření databáze	I
10.1	Příloha 2 - Identifikace a identifikační skóre pro Lvička zlatého	III
10.2	Příloha 3 – Identifikace a identifikační skóre pro dospělé	V
10.3	Příloha 4 – Identifikace a identifikační skóre pro kojence	VI
10.4	Příloha 5 – neidentifikované vzorky	VIII
10.5	Příloha 6 – Rozmezí pro identifikované skóre	IX

1 Úvod

Střevní mikrobiota je v současnosti velmi aktuálním tématem. Lze ji popsat jako společenství mikroorganismů sídlící v různých částech trávicího traktu, které příznivě působí na zdraví a stav hostitele. Zastoupení mikroorganismů je ovlivňováno věkem, složením stravy, ale i stresem. V průběhu života se mění a je specifické pro každého jedince.

Významnou komezální skupinou vyskytující se jak u lidí, tak i u zvířat je, zejména v období mléčné výživy, rod *Bifidobacterium*. Jedná se o grampozitivní, anaerobní, nepohyblivé tyčinky. Krom trávicího traktu lze bifidobakterie najít v mléce a mléčných produktech, dutině ústní i v odpadních vodách – jejich výskyt je tedy velmi rozmanitý. Bifidobakterie jsou sacharolytické, energii získávají z nestravitelných sacharidů rostlinného a živočišného původu, jako jsou oligosacharidy nebo glykany. Pro své příznivé účinky jsou často používána jako probiotika.

V současnosti je popsáno okolo devadesáti druhů tohoto rodu. K jejich identifikaci a charakterizaci se používá celá řada metod. Mezi analytické metody patří MALDI TOF hmotnostní spektrometrie, která začala být využívána k identifikaci bakterií na začátku 80. let minulého století. Principem metody je ionizace chemických sloučenin, tvorba nabitých molekul a následné měření jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/Z). Hmotnostní spektrometrie je široce využívána díky své rychlosti, efektivnosti a hlavně přesnosti. Tato metoda je schopna rozlišit mikroorganismy na rodové, druhové i kmenové úrovni. Nevýhodou této metody je, že dostupné oficiální databáze obsahují pouze omezený počet druhů a kmenů tohoto rodu s nízkou rozmanitostí původu.

2 Cíl práce

Cílem této práce bude podílet se na vytvoření robustní MALDI TOF databázi bakterií rodu *Bifidobacterium* a analýza vzorků pocházejících z různých zvířecích hostitelů se snahou u nich identifikovat druhy typické pro člověka.

2.1 Hypotéza

Předpokládáme tedy, že pokud vytvoříme z dostupných typových a identifikovaných divokých kmenů bifidobakterií rozšířenou robustní databázi, budeme tuto metodu moci používat pro rychlou, kvalitní a přesnou identifikaci izolátů bifidobakterií z nejrůznějších hostitelů a prostředí.

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Bifidobacterium*

Všichni zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou sacharolytické, obligátně anaerobní (se schopností tolerovat kyslík u *Bifidobacterium indicum* či *Bifidobacterium asteroides*), mezofilní, nemotilní, nesporotvorné, katalázově a oxidázově negativní, grampozitivní pleomorfní tyčinky (Killer et al. 2018). Bifidobakterie představují jednu z dominantních mikrobiálních skupin, které jsou přítomny ve střevech, zejména v období mléčné výživy, a to jak u lidí, tak i u ostatních savců (Milani et al. 2014).

3.1.1 Historie

Bifidobakterie byly poprvé izolovány ze stolice kojenců roku 1899. Objevitel Henry Tissier z Pasteurova institutu jim dal název *Bacillus bifidus*. Z důvodu podobnosti morfologických a fyziologických vlastností s laktobacily, byly na začátku 20. století mylně zařazovány do rodu *Lactobacillus* (Turroni et al. 2011). Až roku 1924 Orla-Jensen rozpoznal, že se jedná o samostatný rod *Bifidobacterium* (Lugli et al. 2017). Zásluhy na rapidním nárůstu studií bifidobakterií v 60. letech dvacátého století mají Reuter v Německu, Mitsuoka v Japonsku a Scardovi v Itálii. Reuter (1963) nejprve uspořádal již dříve popsáné „biotopy“ či „skupiny“ do druhů, z nichž popsal 8 vyskytujících se v lidských výkalech (Biavati et al. 2018). Dle publikace Bunešová et al. (2014) rod *Bifidobacterium* v danou dobu zahrnoval 48 druhů a poddruhů, z nichž 32 bylo původně izolováno z výkalů nebo gastrointestinálního traktu živočichů. V současné době rod dle bacterio.net zahrnuje více než 90 druhů.

3.1.2 Taxonomie

Tabulka 1 Taxonomické zařazení

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

Základními fenotypovými znaky, které jsou využívány při identifikaci a taxonomickém rozčlenění bakterií jsou morfologie buněk, fermentace sacharidů či elektroforetická mobilita enzymů. Nicméně využití těchto metod někdy vedlo k nejednoznačným výsledkům. Dříve se druhy rodu *Bifidobacterium* identifikovaly na základě lokace nebo dle hostitele, ze kterého byly izolovány (např. *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium dentium*), dále za pomoci morfologie buněk, analýzy produktů fermentace a související enzymatické aktivity a schopnosti využívat různé sacharidové substráty (Ventura et al. 2004). Enzym fruktosa-6-fosfát fosfoketoláza je taxonomickým markerem čeledi *Bifidobacteriaceae*

využívaným k její identifikaci (Russell et al. 2011). Další metody identifikace byly dle typu peptidoglykanu, obsahu DNA G + C nebo příbuznosti DNA-DNA (Killer et al. 2018b). Významným zlomem bylo objevení molekulárně biologických metod, které vedly k přesnějším a spolehlivějším výsledkům. Pro identifikaci lze využít rRNA genových sekvencí, zejména pak 16S rRNA sekvence (Ventura et al. 2004).

Pan-genomová analýza čeledi *Bifidobacteriaceae* umožnila identifikaci 353 COG sdílených 67 (sub) druhů, což představuje jádro genomu aktuálně sekvenovaných zástupců *Bifidobacteriaceae* (jádro Bae-COG). Zkoumání ukazuje, že nejkonzervovanější jádrové geny specifikují funkce, jako je replikace, transkripce a translace, nebo funkce související s adaptací, jako je metabolismus sacharidů, nukleotidů a aminokyselin. Pan-genomová analýza také umožnila identifikaci skutečně jedinečných genů (TUG) čeledi *Bifidobacteriaceae*, tj. těch genů, které jsou přítomny v jednom konkrétním kmeni, ale chybí v kterémkoli z dalších zkoumaných představitelů čeledi *Bifidobacteriaceae* (Lugli et al. 2017).

3.1.2.1 Seznam druhů

Výše uvedený počet druhů bifidobakterií není konečný, stále probíhají nové objevy a počty zástupců se nadále rozrůstají. V tabulce č. 2 jsou uvedené známé druhy k 30.1. 2020 z databáze bacterio.net.

Tabulka 2 Seznam druhů

Druh	Objevitel, rok	Izolováno z	DSMZ
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	Killer et al. 2011	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	22766
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Reuter 1963	Střevo dospělého člověka	20083
<i>Bifidobacterium aerophilum</i>	Michelini et al. 2017	Výkaly dospělé tamarína pinčiho (<i>Saguinus oedipus</i>)	100689
<i>Bifidobacterium aesculapii</i>	Modesto et al. 2014	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	26737
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Scardovi and Crociani 1974	Lidské výkaly	20098
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Masco et al. 2004	Krysí výkaly	20104
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Masco et al. 2004	Krysí výkaly	20104
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Masco et al. 2004	Jogurt	20140
<i>Bifidobacterium anseris</i>	Lugli et al. 2018	Výkaly husy domácí	LMG 30189

Druh	Objevitel, rok	Izolováno z	DSMZ
<i>Bifidobacterium apri</i>	Pechar et al. 2017	Tlusté střevo divkoého prasete (<i>Sus scrofa</i>)	100238
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>	Laureys et al. 2016	Vodní kefir	CCUG 67145
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Scardovi and Trovattelli 1969	Zažívací trakt včely medonosné	20089
<i>Bifidobacterium avesanii</i>	Michelini et al. 2019	Výkaly tamarína (<i>Saguinus oedipus</i>)	100685
<i>Bifidobacterium biavatii</i>	Endo et al. 2012	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	23969
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Orla-Jensen 1924	Lidské výkaly	20456
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	Killer et al. 2011	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	22767
<i>Bifidobacterium bombi</i>	Killer et al. 2009	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	19703
<i>Bifidobacterium boum</i>	Scardovi et al. 1979	Bachor skotu	20432
<i>Bifidobacterium breve</i>	Reuter 1963	Střevo kojence	20213
<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	Modesto et al. 2018	Výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	103152
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	Endo et al. 201	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	23973
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Scardovi and Crociani 1974	Lidské výkaly	16992
<i>Bifidobacterium catulorum</i>	Modesto et al. 2018	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	103154
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Scardovi et al. 1979	Výkaly selete	20434
<i>Bifidobacterium commune</i>	Praet et al. 2015	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	28792
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	Biavati et al. 1982	Zažívací trakt včely medonosné	20216
<i>Bifidobacterium criceti</i>	Lugli et al. 2018	Výkaly křečka polního	CCUG 70962
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	Delcenserie et al. 2013	Čerstvé kravské mléko	LMG 23609
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	Scardovi et al. 1979	Králičí výkaly	20435

Druh	Objevitel, rok	Izolováno z	DSMZ
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Scardovi and Crociani 1974	Zubní kaz	20436
<i>Bifidobacterium eulemuris</i>	Michelini et al. 2016	Výkaly lemura (<i>Eulemur macaco</i>)	100216
<i>Bifidobacterium faecale</i>	Choi et al. 2014	Lidské výkaly	19856
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Lauer 1990	Střevo dospělého člověka	20093
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	Watabe et al. 1983	Slepé střevo kuřete	20670
<i>Bifidobacterium hapali</i>	Michelini et al. 2016	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i>)	100202
<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	Lugli et al. 2018	Výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	CCUG 70961
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Scardovi and Trovatelli 1969	Zažívací trakt včely medonosné	20214
<i>Bifidobacterium italicum</i>	Lugli et al. 2018	Výkaly králíka divokého	CCUG 70963
<i>B. cateulatum</i> subsp. <i>kashiwanohense</i>	Nouioui et al. 2018	Výkaly kojence	21854
<i>Bifidobacterium lemorum</i>	Modesto et al. 2015	Výkaly lemura (<i>Lemur catta</i>)	28807
<i>Bifidobacterium longum</i>	Reuter 1963	Střevo dospělého člověka	20219
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Mattarelli et al. 2008	Střevo kojence	20088
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i>	Yanokura et al. 2015	Výkaly selete	28597
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	Mattarelli et al. 2008	Výkaly prasete	20211
<i>Bifidobacterium margollesii</i>	Lugli et al. 2018	Výkaly kosmana zakrslého	CCUG 70959
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	Biavati and Mattarelli 1991	Bachor skotu	6492
<i>Bifidobacterium minimum</i>	Biavati et al. 1982	Odpadní vody	20102

Druh	Objevitel, rok	Izolováno z	DSMZ
<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	Watanabe et al. 2009	Kumys	21395
<i>Bifidobacterium moukalabense</i>	Tsuchida et al. 2014	Výkaly gorily nížinné (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	27321
<i>Bifidobacterium myosotis</i>	Michelini et al. 2016	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i>)	100196
<i>Bifidobacterium parmae</i>	Lugli et al. 2018	Výkaly kosmana zakrslého	CCUG 70964
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Scardovi et al. 1979	Výkaly kojence	20438
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Mitsuoka 1969	Výkaly prasete	20099
<i>Bifidobacterium globosum</i>	Nouioui et al. 2018	Bachor skotu	20092
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	Simpson et al. 2004	Slepé střevo prasete	22366
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	Trovatelli et al. 1974	Střevo kuřete	20433
<i>Bifidobacterium ramosum</i>	Michelini et al. 2017	Výkaly tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i>)	100688
<i>Bifidobacterium reuteri</i>	Endo et al. 201	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	23975
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	Biavati and Mattarelli 1991	Bachor skotu	6489
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	Biavati et al. 1992	Králičí výkaly	6531
<i>Bifidobacterium saguini</i>	Endo et al. 2012	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	23967
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Hoyles et al. 2002	Lidská krev	13734
<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	Endo et al. 2012	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	23968
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> subsp. <i>stercoris</i>	Nouioui et al. 2018	Střevo dospělého člověka	20083
<i>Bifidobacterium subtile</i>	Biavati et al. 1982	Odpadní vody	20096

Druh	Objevitel, rok	Izolováno z	DSMZ
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	Dong et al. 2000	Odpadní vody z výroby tofu	15837
<i>Bifidobacterium porcinum</i>	Nouioui et al. 2018	Výkaly prasete	17755
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	Mitsuoka 1969	Výkaly prasete	20210
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	Michelini et al. 2016	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i>)	100201
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>	Okamoto et al. 2008	Zubní plak křečka	17777
<i>Bifidobacterium vansindereni</i>	Duranti et al. 2017	Výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	CCUG 70655

DSMZ – German Collection of Microorganisms / Německá sbírka mikroorganismů

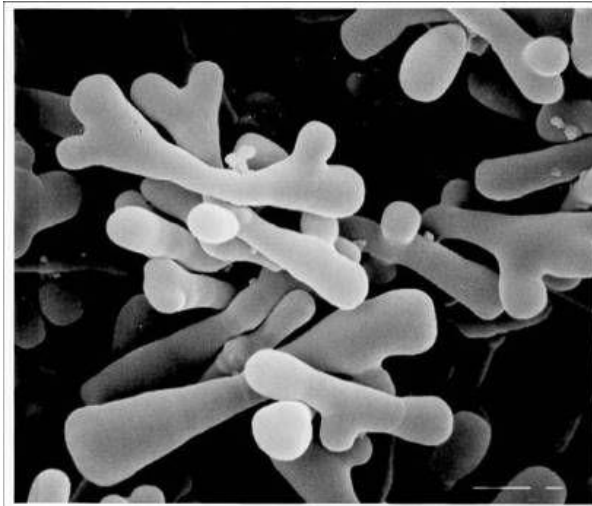
LMG – Belgian co-ordinated collection of microorganisms / Belgická koordinovaná sbírka mikroorganismů

CCUG – Culture collection of university Gothenburg / Sbíрка kultur univerzity Gothenburg

3.1.3 Morfologie

Bifidobakterie jsou grampozitivní pleomorfní tyčinky. Tvarově se vyskytují od stejnoměrných (uniformních) až po typické rozvětvené tyčinky ve tvaru Y nebo V. Jsou anaerobní, nemotylní a nesporeující. Větvící povaha není závislá pouze na druhu, ale také na kultivačním médiu (Tannock 1999).

Buněčná stěna bifidobakterií má typickou grampozitivní strukturu tvořenou silným peptidoglykanovým obalem obsahujícím polysacharidy, proteiny a kyselinu teichoovou. Zastoupení aminokyselin v tetrapeptidu se liší mezi druhy, což umožňuje jejich lepší identifikaci. Obvykle tetrapeptidy obsahují L-alanin, kyselinu D-glutamovou, L-ornitin a D-alanin, ale v některých kmenech může být ornithin nahrazen lysinem. Základní polysacharidy obsažené v buněčné stěně bifidobakterií jsou glukóza, galaktóza či rhamnóza. Teichoové kyseliny ve spojení s polysacharidovým řetězcem zodpovídají za přilnutí bakterií k povrchu střeva. Lipoteichoové kyseliny následně zajišťují hydrofobní charakter bakterií (Biavati et al. 2000).



Obrázek 1 Morfologie - *Bifidobacterium longum*, dostupné z <https://www.dbi360.com/bifidobacterium-longum-probiotics-freeze-dried.html>

3.1.4 Fyziologie

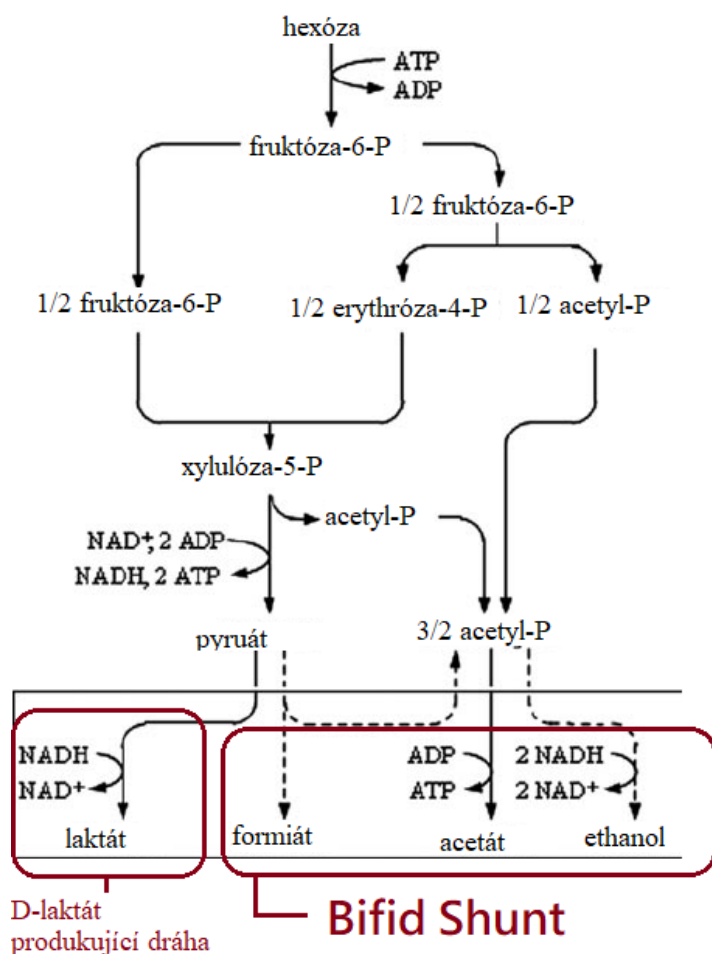
Jak bylo již zmíněno výše, zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou anaerobními organizmy. Některé druhy však v přítomnosti oxidu uhličitého dokážou kyslík do jisté míry tolerovat. Teplotní minimum pro jejich růst je v rozmezí 25-28 °C. Teplotní maximum se pro bakterie pohybuje v rozmezí 43-45 °C. Bifidobakterie se ovšem dokázaly částečně teplotně přizpůsobit na prostředí, ve kterém se vyskytují, proto druhy žijící v lidském organismu mají teplotní optimum mezi 36 až 38 °C, zatímco pro druhy žijící v trávicím traktu zvířat je optimální teplota pro růst vyšší, kolem 41 až 43 °C (Mattarelli & Biavati 2018). Jsou zde i výjimky, například *Bifidobacterium thermacidophilum*, jehož růstové optimum může být až 49,5 °C a po omezený čas dokáže přežít i teplotu 60 °C (Biavati et al. 2018). Další výjimkou je pak *Bifidobacterium psychraerophilum*, u kterého je prokázán jeho růst i při teplotách nižších, než jsou 4 °C (Leahy et al. 2005). Optimální pH pro růst se pohybuje v rozmezí 6,5 až 7,0. Hraníčními hodnotami pH, při kterých růst ustává je 4,5 a nižší, poté pak 8,0 a vyšší (Biavati et al. 2000).

3.1.5 Metabolismus

Bifidobakterie jsou sacharolytické bakterie a většinu energie získávají z nestravitelných sacharidů, jako jsou oligosacharidy živočišného i rostlinného původu. Jejich metabolismus obsahuje unikátní dráhu pro štěpení hexóz za vzniku ATP známou jako „bifid shunt“. Všechny hexózy uvolněné hydrolýzou z komplexu sacharidů podléhají tomuto typu metabolismu (Pokusaeva, Fitzgerald, & Van Sinderen 2011). Hlavním enzymem metabolické dráhy je fruktosa-6-fosfát fosfoketoláza (F6PPK), která je klíčovým enzymem pro teoretický výtěžek 1,5 molu acetátu, 1 mol laktátu a 2,5 ATP z 1 mol glukózy. Poměry vytvořeného laktátu a acetátu se mohou lišit v závislosti na zdroji a druhu sacharidů a v závislosti na tom, zda se meziproduct pyruvát štěpí na acetylfosfát a formuje se nebo se redukuje na laktát (Palframan, Gibson, & Rastall, 2003). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a *Bifidobacterium breve* mohou metabolizovat L-fukózu na acetát, formiát, laktát a 1,2-propandiol (1,2-PD) s využitím cesty s nefosforylovanými meziproducty, čímž se získá 1 mol L-fukózy a 1 mol 1,2-PD. 1,2-PD je prekurzorem pro tvorbu bakteriálních propionátů (Bunešová et al. 2017). Enzym

F6PPK je hlavním taxonomickým znakem pro identifikaci čeledi *Bifidobacteriaceae* (Biavati et al. 2018). Bifidobakterie mají také extracelulární enzymy, které katalyzují hydrolýzu polysacharidů, jako je amylopektin, amyulóza a xylan (Ventura et al. 2004).

Acetát řadíme mezi mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs = short chain fatty acids), které mají výhody především pro hostitelské organismy (Musilová et al. 2015). SCFAs, které mají vysoký kalorický obsah, jsou vstřebány enterocyty v tlustém střevě, kde jsou metabolizovány a použity jako zdroj energie. Kromě toho SCFAs stimulují absorpci sodíku a vody v tlustém střevě a jsou známy svou schopností indukovat enzymy, které podporují obnovu sliznic (D'Argenio & Mazzacca 2000; Pokusaeva et al. 2011).



Obrázek 2 Schéma štěpení sacharidů pomocí „bifid shunt“ (Pokusaeva 2011).

3.1.5.1 Cross feeding

Cross feeding je důležitou součástí dynamického a funkčního komplexu mikrobiálního ekosystému v lidském tlustém střevě. Tlusté střevo je kolonizováno především kmeny *Bacteroidetes*, *Firmicutes* a *Actinobacteria*. Hlavní funkcí těchto převážně anaerobních bakterií je fermentace zbytků stravy, které neprošly trávením hostitelskými enzymy. Jedná se především o rezistentní škroby, neškrobové polysacharidy a oligosacharidy včetně fruktooligosacharidů. Produkty a meziproducty rozkladu sacharidů slouží jako zdroj uhlíku a energie pro křížové interakce (cross feeding) bakterií (Rios-Covian, Gueimonde & Flint 2015).

Zvýšený růst bifidobakterií na fruktanech inulinového typu způsobuje zvýšenou produkci butyrátu a bifidogenní účinek je tak doprovázen i butyrogenním účinkem. Kromě toho je to důkaz o přímé degradaci fruktanů inulinového typu bakteriemi tlustého střeva produkujícími butyrát. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je proto výskyt křížové interakce, tj. poskytování produktů rozkladu polysacharidů jako sekundárních substrátů po částečné hydrolyze primárními rozkladači. Produkty rozkladu sacharidů mohou skutečně sloužit jako meziprodukty v metabolických křížových interakcích mezi bakteriemi tlustého střeva, a tím se metabolizovat na SCFAs (De Vuyst & Leroy 2011).

Dalším specifickým substrátem pro růst mikroorganismů je mucin. Mucin je produkován mukózními a pohárkovými buňkami gastrointestinálního traktu. Produkce je zahájena před porodem a kompletní hlenová vrstva je vyvinuta již několik dní po narození. Lidské muciny jsou glykoproteiny složené z polypeptidové kostry bohaté na tandemové repetice prolinových, serinových, threoninových a O-glykosylovaných postranních řetězců. Muciny jsou neustále vylučovány z epitelu tlustého střeva, a proto jsou potenciálním zdrojem glykanů pro střevní mikrobiotu. Degradace mucinu však vyžaduje několik degradačních enzymů specifických pro vazbu; proto se jen malé množství mikroorganismů specializuje na degradaci mucinových glykanů. Zástupcem z rodu *Bifidobacterium*, který může mucin degradovat a zároveň v jeho přítomnosti růst je *Bifidobacterium bifidum*. *B. bifidum* degraduje mucin extracelulárně prostřednictvím aktivity membránově vázaných enzymů umožňujících křížové zpřístupňování živin jiným druhům. Již dříve bylo prokázáno, že *B. breve* roste za použití mono- a oligosacharidů uvolňovaných *B. bifidum* z mucinových glykanů (Bunešová et al. 2017).

3.2 Význam a využití bifidobakterií

3.2.1 Význam bifidobakterií v GIT

Bifidobakterie se přirozeně vyskytují v lidské střevní mikrobiotě v dominantním zastoupení (Russell et al. 2011). Představují až 25 % střevních bakterií u dospělých a 80 % u kojenců (Picard et al. 2005).

Fermentací se stimuluje bakteriální růst a vznikají organické kyseliny (kyselina mléčná a mastné kyseliny s krátkým řetězcem – SCFAs) společně s plyny (vodík, oxid uhličitý a metan). Kyselina mléčná je produkována mnoha střevními bakteriálními druhy, zejména bifidobakteriemi a laktobacily. SCFAs (acetát, propionát a butyrát) jsou hlavními konečnými produkty bakteriálních fermentačních reakcí v tlustém střevě (Oliveira & González-Molero, 2016). Všechny SCFAs se rychle vstřebávají a stimulují absorpci solí a vody. Následně jsou metabolizovány převážně střevním epitelem, dále pak játry a svaly. Butyrát je navíc důležitým zdrojem energie pro epitel tlustého střeva a reguluje růst a diferenciaci buněk. I když bifidobakterie neprodukují butyrát přímo, produkují laktát, který může být transformován v butyrát (Picard et al. 2005).

3.2.2 Využití bifidobakterií v potravinách a doplňcích stravy

Bifidobakterie jsou probiotické mikroorganismy, které se v potravinářském průmyslu běžně používají. Probiotické mikroorganismy jsou obvykle dostupné jako kultivační

koncentráty v sušené nebo zmrazené formě, které se přidávají do potravin pro průmyslové nebo domácí použití (Tripathi & Giri 2014). Kromě potravinových probiotik jsou na trhu různé zdravotní výrobky a farmaceutické přípravky obsahující probiotika (Saad et al. 2013). Nejčastěji používaným druhem probiotických bakterií v lyofilizované formě a mléčných výrobcích jsou *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. Množství probiotických bakterií potřebných pro terapeutický účinek se považuje za rozmezí 10^9 buněk živých mikroorganismů za den. Aby se dosáhlo příznivého účinku, musí bakterie zůstat v produktu životaschopné až do doby spotřeby. Komerčně dostupná probiotika jsou obvykle ve formě zmrazených, práškových bakterií nebo ve formě kapslí, což může ovlivnit jejich perzistenci a životaschopnost (Bunešová et al. 2015).

Tradičně se bifidobakterií používá ve fermentovaných mléčných výrobcích. Bezpečné používání bifidobakterií je podporováno dlouhou historickou spotřebou fermentovaných mléčných výrobků a rostoucími poznatky o taxonomii a fyziologii bifidobakterií. Bakterie produkující kyselinu mléčnou se v potravinách považují za komenzální mikroorganismy s malým nebo žádným patogenním potenciálem (Picard et al. 2005).

3.2.3 Probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které v adekvátním množství přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele. K nejpoužívanějším druhům pro výrobu probiotik patří rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Ve studiích na zvířatech a na lidech byly široce testovány na jejich prospěšné účinky při prevenci širokého spektra gastrointestinálních poruch (Picard et al. 2005).

Význam slova probiotika má původ z řeckého výrazu „pro život“ a v průběhu let měl několik různých výkladů. Slovo probiotikum poprvé použili Lilley a Stillwell roku 1965 pro pojmenování substance vylučované jedním organismem, jež stimulovala růst jiného mikroorganismu. Až roku 1989 Fuller představil přesnější definici (Fuller 1992). Současná definice dle Bunešové (2018) zní: Probiotika jsou mono- nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které po aplikaci prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikroflóry.

Hlavní probiotické účinky:

1. Prevence a/nebo snížení doby trvání průjmu, způsobeného rotaviry nebo spojeného s užíváním antibiotik, jakož i zmírnění potíží vyvolaných v důsledku nesnášenlivosti laktózy.
2. Snížení koncentrace enzymů stimulujících rozvoj nádorových onemocnění a/nebo vznik hnilobných (bakteriálních) metabolitů ve střevě.
3. Prevence a zmírnění nespecifických a nepravidelně se vyskytujících onemocnění gastrointestinálního traktu u zdravých lidí.

4. Příznivé účinky na mikrobiální odchylky, záněty a další potíže v souvislosti se zánětlivými onemocněními trávicího traktu, infekce způsobené *Helicobacter pylori* nebo bakteriální přerůstání.
5. Normalizace procházející stolice a její konzistence u osob trpících zácpou nebo dráždivostí tračníku.
6. Prevence nebo zmírnění alergií a atopických chorob u kojenců.
7. Prevence infekcí dýchacích cest (rýma, chřipka) a jiných infekčních onemocnění a pomoc při podpoře léčby infekcí urogenitálních cest (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

3.2.4 Bifidobakterie jako probiotika

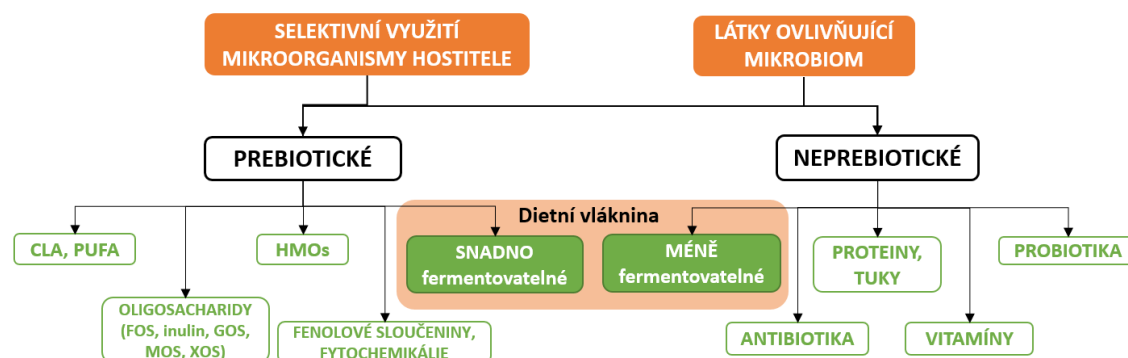
Bifidobakterie, jakožto probiotika, prokázaly účinnost při prevenci širokého spektra zvířecích a/nebo lidských gastrointestinálních poruch, jako jsou poruchy průchodu tlustého střeva, střevní infekce, adenomy tlustého střeva a nádorová onemocnění (Picard et al. 2005).

Bifidobakterie jsou hlavní bakteriální skupinou ve stolici přirozeně porozených a kojených dětí. Druhy vyskytující se u kojenců, jako je *B. longum* subsp. *infantis* a *B. bifidum*, jsou uzpůsobeny k využití oligosacharidů lidského mléka (HMOs), jako jednoho z hlavních zdrojů glykanu v mateřském mléce (Bunešová et al. 2017). Přenos bifidobakterií na bázi mateřského mléka může být podpořen jejich schopností využívat složky, jako jsou HMOs. Proto se tvrdilo, že první mikrobiota savců zahrnuje střevní komenzály, kteří jsou schopni metabolizovat mléčné glykany, jako jsou bifidobakteriální kmeny patřící k *B. longum* subsp. *infantis* a *B. bifidum*. Tyto bifidobakteriální druhy mohou být rozhodující pro podporu vytvoření následných bifidobakteriálních kolonizátorů, kteří sami o sobě nemohou přímo získat přístup k takovým komplexním sacharidům získaným z mléka. Tito kolonizátoři mohou díky chování při cross-feedingu využívat produkty degradace HMOs, včetně kyseliny sialové a fukózy (Milani et al. 2017).

3.2.5 Prebiotika

Slovo prebiotikum představili Gibson a Robertfroid a definovali jej jako „nestravitelnou složku potravin, která příznivě ovlivňuje hostitele tím, že selektivně stimuluje růst a/nebo aktivitu jedné bakterie nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě“ (Manning & Gibson 2004). Nejnovější definice z roku 2017 definuje prebiotikum jako substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy, které poskytují zdravotní přínos (Gibson et al. 2017). Optimální střevní mikrobiota může zvýšit odolnost vůči patogenním bakteriím, snížit amoniak v krvi, zvýšit stimulaci imunitní odpovědi a snížit riziko rakoviny (Manning & Gibson 2004). Aby se daná látka mohla řadit mezi prebiotika, musí splňovat 2 základní požadavky – průchod horní částí trávicího traktu příjemce v nezměněné formě a musí sloužit selektivně jako substrát pro fermentaci určitými bakteriemi tlustého střeva, které mají příznivý efekt na zdravotní stav hostitele (Bunešová 2018). Hlavními prebiotickými sloučeninami jsou inulin a oligofruktóza (fruktooligosacharidy), galaktooligosacharidy a laktulóza (Jirillo, Jirillo & Magrone 2013). Definice prebiotik se více či méně překrývá s definicí vlákniny, s výjimkou selektivity prebiotik pro určité druhy. Tato selektivita byla objevena i pro bifidobakterie, které mohou být podporovány požitím látek, jako jsou fruktooligosacharidy a inulin, transgalaktosylované

oligosacharidy a sójové oligosacharidy (de Vrese & Schrezenmeir 2008). Prebiotika se přirozeně vyskytují v semenech a kořenech některých rostlin jako je čekanka, cibule, česnek, artyčoky, chřest, ječmen, žito, sójové boby, cizrna a lupina. Mohou být také extrahována vařením, enzymatickým působením nebo alkoholem. Existují také syntetické oligosacharidy získané přímou polymerizací disacharidů či fermentací a probiotické jsou i některé polysacharidy z buněčné stěny kvasinek (Flesch, Poziomyck & Damin 2014).



Obrázek 3 Schéma prebioticky účinných substrátů dle Gibson et al. 2017

CLA (Conjugated Linolic Acid) – Konjugovaná kyselina linolová

PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acids) - Polynenasycené mastné kyseliny

HMOs (Human Milk Oligosaccharides) – Oligosacharidy mateřského mléka

3.2.6 Synbiotika

Termín synbiotikum se používá, pokud produkt obsahuje probiotika i prebiotika. Protože slovo zmiňuje synergismus, měl by být tento termín vyhrazen pro produkty, ve kterých prebiotická sloučenina selektivně zvýhodňuje probiotickou sloučeninu. Například produkt obsahující prebiotickou oligofruktózu a probiotické bifidobakterie (de Vrese & Schrezenmeir 2008). Bylo prokázáno, že pravidelný dlouhodobý příjem synbiotik zlepšuje zdraví dospělých snížením výskytu a závažnosti onemocnění dýchacích cest v chladném období. Synbiotika také mění složení mikrobioty tlustého střeva, snižují zánětlivé procesy ve střevní sliznici a mají potenciál vyvolat remisi onemocnění při zánětlivém onemocnění střev (Jirillo, Jirillo & Magrone 2013).

3.3 Výskyt bifidobakterií

Bifidobakterie se vyskytují v různých ekologických nikách, mezi které můžeme zařadit gastrointestinální trakt, dutinu ústní, odpadní vody, krev či potraviny (Ventura et al. 2007; Biavati et al. 2018). Bifidobakterie byly nalezeny ve zvířecím trusu (králík, skot, myši, aj.), také i ve vzorcích ze zvířecího a hmyzího GIT (slepíci slepé střevo, hovězí bachor či hmyzí střevo). Analýza genomové diverzity izolátů rodu *Bifidobacterium* získaných z různých frakcí vepřového slepého střeva identifikovala dva nové druhy (*Bifidobacterium aerophilum* a *Bifidobacterium psychroaerophilum*) (Simpson et al. 2003). Mnoho druhů bifidobakterií bylo detekováno v odpadních vodách v důsledku fekální kontaminace, zatímco *Bifidobacterium*

subtile a *Bifidobacterium minimum* byly izolovány pouze z odpadních vod (Lievin et al. 2000; Ventura et al. 2004).

Zástupci tohoto rodu představují významnou část střevní mikrobioty u dospělých jedinců. U kojenců jsou díky mléčné stravě převažujícím rodem. Druhové zastoupení a množství střevních bifidobakterií se s věkem jedince mění (Arbolea et al. 2016). Tissier pozoroval, že u kojenců s gastrointestinálními poruchami se ve stolici vyskytuje nízký počet bakterií charakteristických neobvyklou morfologií do tvaru Y. Navrhl tedy, podávat tyto bakterie pacientům s průjmy pro obnovu zdravé střevní mikrobioty (Biavati et al. 2018). Tento čin byl prvním krokem k současnému pojetí bifidobakterií jakožto zdravých podporujících (probiotikum, imunomodulace, ochrana před patogeny) bakterií vyskytujících se ve střevním mikrobiomu (Savignac et al. 2015).

3.4 Možnosti identifikace a charakterizace

3.4.1 Rodová a druhová PCR pro bifidobakterie

Polymerázová řetězová reakce je velmi rozšířenou molekulární metodou. Jedná se o enzymatické zmožení (amplifikaci) specifické sekvence DNA nebo komplementární DNA sekvence zprostředkované primerem (Farrell 2005). Využití PCR v *in vitro* podmínkách umožňuje prakticky neomezený počet zmnožení – více než 10^9 kopií po třiceti cyklech DNA syntézy (Hirsch, Mauchline, & Clark, 2010). Oblast DNA, která má být amplifikována je určena sekvencí bazí dvojice oligonukleotidových primerů, které jsou komplementární k vazebným místům umístěných na obou stranách cílové sekvence. Výběrem typu primeru je možné detekovat buď funkční geny nebo sekvence specifické pro určitou skupinu bakterií (Salmonová & Bunešová 2017). Tato metoda má méně přísné požadavky na vstupní hmotnost a čistotu RNA ve srovnání s tradičními klonovacími metodami. To je částečně z toho důvodu, že PCR primery „ohraničují“ oblast, která bude zmnožena, díky čemuž je PCR tolerantnější vůči částečně degradované RNA než tradiční syntéza komplementární DNA (Farrell 2005).

V níže uvedené tabulce č. 3 lze nalézt příklady některých specifických primerů pro vybrané druhy bifidobakterií používaných v probiotických doplňcích stravy.

Tabulka 3 vybrané typy primerů dle Bunešová 2015

Druhy	Primery
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Bif162 Bif662
<i>B. bifidum</i>	BiBIF-1 BiBIF-2
<i>B. breve</i>	BiBRE-1 BiBRE-2
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	BiLON-1 BiLON-2
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	BiINF-1 BiINF-2
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Bflac2 Bflac5

3.4.2 MLST (Multilocus sequence typing)

Multilocus sekvenční typování (MLST) může cílit na více genomických lokusů a výsledky lze snadno archivovat, sdílet a porovnávat mezi laboratořemi. Je považována za jednu z nejspolehlivějších a nejinformativnějších metod molekulárního genotypování, a to i ve věku sekvenování celého genomu. Použitím této metody bylo genotypováno mnoho mikroorganismů a vzrůstá zájem o zjištění rozdílů mezi izoláty uvnitř mikrobiálních populací, zejména ve studiích mikrobiální evoluce, patogeneze, ekologie a mikrobiomů. Genotypizace MLST je výkonným přístupem k vymezení druhů a kmenů, ale současná metodologie je nákladná, časově náročná a pracná (Chen & Perfect 2017). Ventura roku 2006 navrhl multigenní metodu založenou na fragmentech 7 molekulárních markerů (*clpC*, *dnaB*, *dnaG*, *dnaJ*, *purF*, *rpoC* a *xfp* geny), jako alternativu k 16S rRNA genu, aby poskytla rozsáhlejší fylogenetickou analýzu bifidobakterií (Killer et al. 2018a).

V posledních letech se rozšířila identifikace a taxonomická charakterizace bifidobakterií pomocí sekvenování dalších genů, jako například gen kódující CTP (cytidin trifosfát) syntázu (katalyzující ATP-závislou aminaci UTP na CTP buď l-glutaminem nebo amoniakem), který hraje nezastupitelnou roli v syntéze RNA v procesu transkripce. Vyskytuje se u bakterií, existuje v jediné kopii v genomu, je předmětem stabilizačního výběru, je stabilní s ohledem na rychlou genetickou modifikaci a základě sekvenace tohoto genu lze sestavit fylogenetický strom, který co nejvíce odráží vývoj druhu (Killer et al. 2018b).

Molekulární genetické techniky jsou klíčové jak v ekologických studiích, tak při klasifikaci, typizaci a fylogenetické analýze prokaryot. Tyto techniky jsou zaměřeny hlavně na porovnání celého genomu a experimenty odvozené z PCR, včetně amplifikace 16S rRNA a dalších různých genů používaných v taxonomii, jakož i MLST (multilocus sekvenční typizace) a MLSA (multilocus sekvenční analýza) různých taxonomických bakteriálních skupin. Gen kódující threonin-tRNA ligázu (*thrS*) je potenciálně použitelný jako identifikační a fylogenetický marker u bakterií. Threonin-tRNA syntáza (ligáza) katalyzuje připojení threoninu k Thr-tRNA. L-threonin je aktivován ATP za vzniku Thr-AMP a přesunut do akceptoru Thr-tRNA. Tento enzym má nezastupitelnou roli v translačním procesu a tím i v syntéze proteinů (Killer et al. 2018b). V současné době nabízí metoda stanovení ANI (průměrná nukleotidová identita) a fylogenetické analýzy založené na COG (klastry ortologických skupin proteinů) pomocí úplné genomické charakterizace nejvhodnější nástroje pro klasifikaci a fylogenetickou analýzu bifidobakterií (Killer et al. 2018a).

3.4.3 FISH

Mezi mnoha molekulárně ekologickými metodami pro analýzu mikrobioty je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) široce používanou metodou pro sledování mikroorganismů v komplexních ekosystémech. (Dinoto et al. 2006). Metodou FISH lze kvantitativně identifikovat různé mikroorganismy jedinou hybridizační reakcí za použití různých kombinací fluorescenčních barviv s různými fluorescenčními spektry (vícebarevná FISH). Tato technika se kromě účinné detekce více mikroorganismů jeví jako užitečná technika pro vizualizaci bakteriálního složení (Takada, Matsumoto, & Nomoto 2004). Dostupná je i sonda pro rod *Bifidobacterium* (Bunešová et al. 2015).

3.4.4 Kultivační metody a selektivní média

Kultivační metody jsou využívány pro detekci mikroorganismů již více než 100 let. Jsou založeny na principu očkování a inkubace na pěstebném médiu, jehož složení závisí na cíli studia a typu sledovaných mikroorganismů. K získání co nejširšího spektra bakterií ze vzorků získaných z přírody se využívají volitelná pěstební média s bohatými zdroji živin (Mandal et al. 2011). Naopak pro izolaci určité skupiny mikroorganismů jsou vyžadována média skládající se ze specifického složení živin, zdrojů energie a selektivních antimikrobiálních látek (Vlková et al. 2015). Výhodou kultivačních metod je jejich citlivost, finanční nenáročnost, amplifikace mikrobiálního materiálu a zjištění jak kvalitativních, tak i kvantitativních informací ze vzorku. Nicméně jsou zde i limitující vlastnosti, a to sice nemožnost detekovat ještě nenarostlé bakterie, bakterie tvořící kolonie nebo uvolněné bakterie ze vzorku. Dále pak selektivita pěstebného média, různá rychlost růstu bakterií a s tím spojená časová náročnost metody (Salmonová & Bunešová 2017).

Pro selektivní kultivaci členů rodu *Bifidobacterium* bylo navrženo několik pevných médií. Antibiotika nebo kyselé přísady jsou vhodnou volbou při udělování selektivních vlastností médiu. Jen málo z těchto médií je zcela selektivních pro bifidobakterie. Selektivním médiem jsou Beerensův agar či Rogosa SL agar (Seng et al. 2009). Dalším příkladem je mupirocinové médium, které je selektivní a všechny izoláty na něm testované byly identifikovány jako bifidobakterie. Mupirocinové antibiotikum potlačuje růst laktobacilů, laktokoků, leukonostoků a streptokoků, ovšem bez jakéhokoliv inhibičního účinku na bifidobakterie (Bunešová et al. 2015). Avšak u komplexních vzorků obsahujících rozmanitější mikrobiotu je selektivita mupirocinového média omezená. Rezistence na mupirocin byla prokázána mnoha anaerobními bakteriemi, zejména klostridii (Vlková et al. 2015).

3.4.5 Biochemické a chemotaxonomické metody

3.4.5.1 Detekce enzymu F6PPK

Bifidobakterie fermentují hexózy pomocí fruktosy-6-fosfát fosfoketolasy (F6PPK). Fruktosa-6-fosfát fosfoketoláza katalyzuje štěpení fruktosy-6-fosfátu na erytrózu-4-fosfát a acetyl-fosfát. Acetyl-fosfát následně reaguje s FeCl_3 za vzniku fialového zbarvení, čímž je možné bifidobakterie mikroskopicky odlišit od podobných druhů (Tannock 1999).

3.4.5.2 Využití určitého substrátu jako jediného zdroje uhlíku v rámci stanovení fermentačního profilu

Principem této techniky je schopnost bakterií využívat různých substrátů za různých podmínek. Mikroorganismy se kultivují v mikrotitračních destičkách obsahující různé zdroje uhlíku spolu s indikátorem v jamkách. V případě, že je substrát metabolizován, je degradace doprovázena změnou barvy. Metody se využívají pro charakterizaci – detekci metabolických drah a enzymů, či identifikaci kmene čisté kultury (Salmonová & Bunešová 2017).

Watson a kolektiv (2013) prokázali, že galaktooligosacharidy a laktulóza podporují nejpříznivější růstové charakteristiky u bifidobakterií, zatímco u inulinu, maltodextrinu a polydextrózy byl pozorován relativně slabý růst.

3.4.5.3 Analýza mastných kyselin

Mastné kyseliny, jakožto nedílná složka membránových struktur, jsou nezbytnou součástí všech živých buněk. Díky své vysoké biodiverzitě se využívají jako biomarkery při identifikaci mikroorganismů. Analýza mikrobiálních mastných kyselin slouží jak k identifikaci, tak i k taxonomické klasifikaci čistých kultur při studiu mikroorganismů ve vzrocích z životního prostředí či laboratorních bakteriálních směsí. Široce využívanou metodou pro identifikaci bakterií je analýza methylesterů mastných kyselin. Jelikož jsou buněčné lipidy přítomny v životaschopných i životaneschopných buňkách, není tato extrakční metoda omezena pouze na živé organismy (Salmonová & Bunešová 2017).

3.4.5.4 Proteinová analýza

Pro identifikaci a studium bakterií se využívá i stanovení obsahu proteinů. Bílkoviny vyskytující se v mikroorganismech poskytují nepřímou genetickou informaci. Typ proteinů přítomných v bakteriálních buňkách je obrovský a jejich zastoupené množství se velmi liší. Některé z nich jsou unikátní pro určitý druh bakterií, mohou tedy sloužit jako biomarkery. Vhodnými biomarkery pro chemotaxonomickou charakterizaci bakterií jsou ribozomální proteiny, jelikož se vyskytují ve všech buňkách (Teramoto et al. 2007).

3.5 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spektrometry = MS) je analytická metoda, ve které jsou chemické sloučeniny převedeny ionizací na molekuly s nábojem (ionty). Vzniklé ionty následně separujeme podle poměru jejich hmoty (m) ku náboji (z). Přestože byla hmotnostní spektrometrie objevena již na začátku 20. století, možnosti jejího využití byly limitovány znalostmi v oblasti chemie (Singhal et al. 2015).

3.5.1 MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie, především pak MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight/hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) začala být využívána pro identifikaci bakterií na začátku 80. let minulého století. Hlavními důvody byla rychlost, přesnost a efektivnost nákladů této metody identifikace v porovnání s konvenčními fenotypovými technikami nebo molekulární biologii (Carbonnelle et al. 2011). Dosavadní znalosti a výsledky pokusů provedených pomocí MALDI-TOF MS dokazují schopnost rozlišit pomocí této metody bakterie či jiné mikroorganismy na rodové, druhové a často i na kmenové úrovni (Huong et al. 2014). Díky své přesnosti je metoda široce využívána pro monitoring životního prostředí, ale také pro rutinní identifikaci a klasifikaci bakterií v potravinářství, průmyslu, veřejné ochraně zdraví a především ve zdravotnictví (Teramoto et al. 2007). První použití MALDI-TOF MS v rutinní klinické mikrobiologii popisuje Seng a kol. roku 2009. Bylo studováno 1660 kmenů

(45 rodů, 109 různých druhů s 1 až 347 izoláty na druh). Toto hodnocení bylo zaměřeno na výkonnost MALDI-TOF MS z hlediska identifikace. Jedna kolonie je přímo nanášena na cílovou destičku MALDI-TOF MS a pro každý izolát byly vytvořeny 4 vzorky. Identifikace se považuje za platnou, pokud dva nebo více vzorků poskytují stejnou identifikaci se skóre přijatelnými pro ověření (Carbonelle 2011). Z 1660 analyzovaných bakteriálních izolátů bylo 95,4 % správně identifikováno hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF MS; Na úrovni druhu bylo identifikováno 84,1 % a na úrovni rodu 11,3 %. Ve většině případů byla absence identifikace (2,8 % izolátů) a chybná identifikace (1,7 % izolátů) způsobena chybějícími položkami databáze (Seng et al. 2009).

3.5.2 Princip MALDI-TOF MS

Vzorek pro analýzu pomocí MALDI MS se připraví překrytím vzorku pomocí roztoku organické látky absorbující energii, nazývané matrice. Když matrice krystalizuje při sušení, vzorek zachycený uvnitř matrice také krystalizuje. Vzorek v matrici je ionizován v automatizovaném režimu laserovým paprskem. Desorpce a ionizace s laserovým paprskem generuje jednotlivě nabitě molekuly z analytů ve vzorku (Singhal et al. 2015). Mezi MALDI destičkou a vstupní štěrbinou průletového analyzátoru dojde k extrakci nabitých molekul podle zvolené polarizace napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátoru. V závislosti na době letu molekul analyzátozem k detektoru se vypočítá poměr m/z (Huong et al. 2014).

Identifikace pomocí MALDI-TOF je založena na následujícím zjištění: spektra se mezi jednotlivými mikroorganismy liší, určité píky sloučenin detekovaných ve spektru jsou specifické pro rod, druh a někdy i pro poddruh. Vybrané píky z naměřeného spektra analyzovaného vzorku se porovnávají s databázemi. Pro reprodukovatelnost získaných spekter je důležitá kultivace bakterií za stejných podmínek. Stejný druh může dát různá hmotnostní spektra díky použití různých růstových podmínek nebo různých metod chemické extrakce (Carbonelle et al. 2011).

Dobře kontrolované podmínky růstu a standardizované postupy přípravy vzorků jsou proto zásadní pro reprodukovatelnost. Kompozice roztoku použitá pro pěstování bakterií může modifikovat spektra daného kmene. Například použití kyseliny trifluoroctové nebo kyseliny mravenčí vytváří různá spektra s významnými rozdíly v relativních intenzitách píku. Metody proteinové extrakce, koncentrace NaCl a kapkovací metody mohou ovlivnit kvalitu spektra modifikací krystalizace vzorku s matricí. Povaha matice je jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňujících kvalitu spektra. Předpokládá se, že matrice má dvě hlavní funkce: absorpci energie z laseru a izolaci biopolymerních molekul od ostatních (Carbonelle et al. 2011).

3.5.4 Dostupná databáze pro identifikaci bifidobakterií – Bruker 2019

Tabulka 4 Seznam dostupných druhů v databázi Bruker (2019)

Číslo	BRUKER	Rod	Druh
1	436	<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>
2	437	<i>Bifidobacterium</i>	<i>angulatum</i>
3	438	<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i>
4	439	<i>Bifidobacterium</i>	<i>asteroides</i>
5	440	<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i>
6	441	<i>Bifidobacterium</i>	<i>boum</i>
7	442	<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>
8	443	<i>Bifidobacterium</i>	<i>catenulatum</i>
9	444	<i>Bifidobacterium</i>	<i>choerinum</i>
10	445	<i>Bifidobacterium</i>	<i>coryneforme</i>
11	446	<i>Bifidobacterium</i>	<i>dentium</i>
12	447	<i>Bifidobacterium</i>	<i>gallicum</i>
13	448	<i>Bifidobacterium</i>	<i>gallinarum</i>
14	449	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>
15	450	<i>Bifidobacterium</i>	<i>magnum</i>
16	451	<i>Bifidobacterium</i>	<i>merycicum</i>
17	452	<i>Bifidobacterium</i>	<i>minimum</i>
18	453	<i>Bifidobacterium</i>	<i>pseudocatenulatum</i>
19	454	<i>Bifidobacterium</i>	<i>pseudolongum</i>
20	455	<i>Bifidobacterium</i>	<i>pullorum</i>
21	456	<i>Bifidobacterium</i>	<i>ruminantium</i>
22	457	<i>Bifidobacterium</i>	<i>saeculare</i>
23	458	<i>Bifidobacterium</i>	<i>scardovii</i>
24	459	<i>Bifidobacterium</i>	<i>thermoacidophilum</i>
25	460	<i>Bifidobacterium</i>	<i>thermophilum</i>

4 Metodika

4.1 Příprava vzorků

Úkolem praktické části této bakalářské práce byla identifikace bifidobakterií pocházejících ze zvířecích a lidských hostitelů, a tím se podílet na verifikaci nově připravené databáze pracovníky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky. Níže je uveden seznam bakterií (příloha 1), o které byla rozšířena základní databáze Bruker (tab. č. 4). Dále bylo cílem identifikovat u testovaných zvířecích vzorků druhy typické také pro člověka, tzv. multihostitelské druhy.

4.1.1 Původ vzorků

Pro práci byly využity 2 skupiny vzorků. První skupina čítající 81 vzorků byla z výkalů primátů. Konkrétně pocházely od druhu lvíček zlatý ze ZOO Olomouc. Jednalo se o samce, samice a jejich mládě. Druhou skupinu tvořily fekální vzorky od kojenců a dospělých jedinců. Tato skupina zahrnuje 63 vzorků.

4.1.2 Kultivace

K identifikaci byly použity čerstvě vykultivované vzorky ze zamražených kultur sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky. Vzorky jsou uchovávány v zásobních zkumavkách při teplotě -20°C , kde tvoří 60 % podílu narostlé kultury a 30 % podílu Bifipufu s glycerolem. Nejprve došlo k rozmrazení vzorků při pokojové teplotě a následně se 0,5 ml kultury přeočkovalo do penicilinových lahviček nebo zkumavek s předem připraveným WSP médiem (10 ml, Wilkins-Chalgren broth s přísadkou sojového peptonu, cysteinu a tweenu).

4.1.3 Příprava média

Modifikovaný Wilkins-Chalgren broth je tekuté pěstební médium pro anaerobní bakterie. Na přípravu 1 litru média bylo zapotřebí komponent uvedených níže v tabulce č. 5.

Tabulka 5 Složení pěstebního média

Komponenty média
1 l demineralizované vody
21,5 g Wilkins-Chalgren bujón (broth; Oxoid, UK)
2,5 g GMO sojového peptonu (Oxoid, UK)
0,25 g L-cysteinu (Sigma-Aldrich, Germany)
0,5 ml tween (Sigma-Aldrich, Germany)

Jednotlivé komponenty byly naváženy a postupně převedeny do 1 litru demineralizované vody do kónické Erlenmeyerovy baňky. Po řádném promíchání a rozpuštění všech složek byl výsledný roztok dán na 10 minut vařit do vodní lázně. Po převaření bylo médium dávkováno po 10 ml do penicilinových lahviček, které byly následně dány do vodní

lázně. Po vyndání z vodní lázně byly všechny lahvičky probublány oxidem uhličitým a uzavřeny pryžovými zátkami pro dosažení anaerobního prostředí. Na závěr byly lahvičky utěsněny hliníkovými víčky pro zachování vhodných podmínek. Lahvičky byly následně dány do autoklávu a vysterilovány.



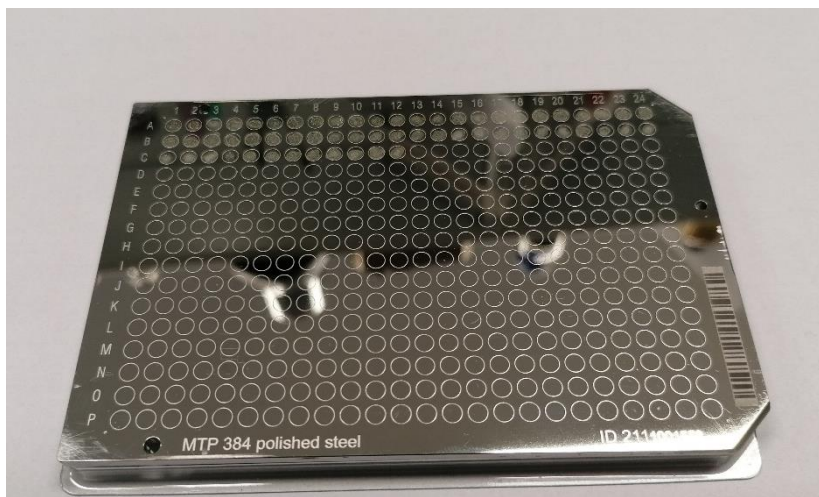
Obrázek 4 Penicilinové lahvičky

4.1.4 Kontrola čistoty kultury

Kontrola čistoty kultury probíhala pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem. Pomocí injekční stříkačky bylo z narostlé kultury odebráno malé množství vzorku a dáno na podložní sklíčko. Kapka vzorku kultury musela být co nejrychleji překryta krycím sklíčkem. Kontrola byla důležitá pro vyloučení případně kontaminovaných vzorků.

4.2 Identifikace vzorků pomocí MALDI-TOF MS

MALDI TOF MS funguje zejména na principu identifikace ribozomálních spekter a jejich určování dle identifikačního skóre. Pro identifikaci byla použita metoda extrakce pomocí



Obrázek 5 MALDI destička - Bruker

mravenčí kyseliny a acetonitrilu. Vlastní extrakci ribosomálních proteinů předcházela fixace pomocí etanolu. Přesný postup je uveden níže.

4.2.1 Materiál

V tabulce č. 6 jsou uvedené chemikálie, které byly nutné pro přípravu vzorků k identifikaci. Redestilovaná voda byla využita k naředění mravenčí kyseliny na požadovanou 70% koncentraci. Trifluoroctová kyselina se využívá na čištění MALDI (Bruker) destičky. Ethanol má funkci jak při přípravě samotného vzorku, tak i při čištění destičky. Organické rozpouštědlo se připravuje z 500 μ l 100% Acetonitrilu, 475 μ l vody, 25 μ l 100% TFA.

Tabulka 6 Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	Koncentrace	Výrobce
ddH ₂ O		
Ethanol	70%	PENTA
Acetonitril	99,80%	Sigma-Aldrich
Mravenčí kyselina	98%	Acros organics
Trifluoroctová kyselina (TFA)	80%	Sigma-Aldrich
MATRIX		Bruker
Organické rozpouštědlo		

4.2.1.1 Postup přípravy vzorku

1. Do označených Eppendorf zkumavek o objemu 1,5 ml byl převeden 1 ml mikroskopicky zkontrolované kultury.
2. Zkumavny byly dány na 3 minuty do centrifugy na maximální otáčky 14 500 otáček za minutu. Tím bylo dosaženo usazení sedimentu na dně zkumavek. Zbylý supernatan byl odstraněn.
3. K sedimentu bylo napipetováno 0,5 ml 70% ethanolu pro fixaci vzorku. Sediment byl v ethanolu důkladně promíchán a následně zvortexován. Vzniklý roztok byl znovu dán na 2 minuty do centrifugy.
4. Od znovu vzniklého sedimentu byl odlit a odpipetován ethanol a vzorek se nechal 10 minut odstát.
5. Pro extrakci proteinů bylo k sedimentu přidáno 20 μ l 70% mravenčí kyseliny, důkladně promícháno a zvortexováno.
6. K roztoku mravenčí kyseliny bylo přidáno 20 μ l acetonitrilu, následně byl vzorek zvortexán a dán na 2 minuty do centrifugy.
7. Z výsledného roztoku bylo odebráno 1 μ l tekuté složky, který byl převeden na speciální destičku (Bruker) ve dvou provedeních.
8. Po zaschnutí na každý vzorek bylo pipetováno 1 μ l matrice (Bruker). Vzorky byly analyzovány.

4.2.3 Čištění MALDI destičky

Rozpouštědla potřebná k čištění MALDI destičky jsou uvedena v tabulce č. 6. Dále bylo zapotřebí horké vody, ubrousků Kimwipe (Kimberly-Clark, USA) a krystalizační misky.

4.2.3.1 Postup čištění

1. MALDI destička byla umístěna do dostatečně velké krystalizační misky a celý povrch byl překryt 70% ethanolem, který se nechal 5 minut působit.
2. Destička byla intenzivně oplachována pod tekoucí horkou vodou. Následně byla několikrát intenzivně otřena ubrouskem namočeným do 70% ethanolu.
3. Destička byla opět oplachována pod tekoucí horkou vodou a čištěna ubrouskem.
4. Destička byla překryta vrstvou 80% TFA a byly důkladně otřeny všechny pozice ubrouskem.
5. Následně byla destička opláchnuta destilovanou vodou a vysušena ubrouskem. Takto byla ponechána 15 minut uschnout při laboratorní teplotě.
6. Byla provedena kontrola čistoty. Destička je připravena na další použití.

5 Výsledky

Cílem této bakalářské práce bylo verifikovat nově rozšířenou databázi MALDI TOF MS (Bruker, Německo). Databáze byla rozšiřována v roce 2019 na katedře Mikrobiologie, výživy a dietetiky ve spolupráci s univerzitou BOKU ve Vídni z původních 25 druhů na 75 druhů bifidobakterií. Celkem bylo přidáno 50 bifidobakteriálních druhů. Pro můj úkol verifikace databáze byly využity divoké kmeny ze dvou skupin hostitelů, u kterých byla vysoká pravděpodobnost výskytu rodu *Bifidobacterium*. První skupinou byla rodina novosvětských primátů lvíčka zlatého (samec, samice a jejich mládě) ze ZOO Olomouc. Druhou skupinou pak byly lidské vzorky, které se dále dělily na vzorky od dospělých a od kojenců. Z celkových 144 vzorků se podařilo identifikovat 115, tedy 79,8 %. Vzorky byly zpracovávány ve dvou kopiích, v práci jsou prezentovány výsledky kopie s vyšším výsledným skóre identifikace. V tabulce č. 7 je uveden seznam 19 bifidobakteriálních druhů které se podařilo u testovaných skupin identifikovat. V tabulce č. 7 jsou označeny druhy přidané a ty, které byly původně v databázi MALDI TOF MS (Bruker). Z čehož je patrné, že pokud by databáze nebyla rozšířena, tak by byl počet identifikovaných izolátů pouze 74 z celkových 115 identifikovaných vzorků.

Tabulka 7 Počet identifikovaných druhů

Druh (19)	Identifikováno vzorků (115)	Hostitel	Nejvyšší skóre
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ^{Bruker}	22	Dospělý/Kojenec/Lvíček	2.390
<i>Bifidobacterium animalis</i> ^{Bruker}	7	Dospělý/Kojenec	2.341
<i>Bifidobacterium avesanii</i> ^{KMVD}	5	Lvíček	2.158
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^{Bruker}	6	Dospělý/Kojenec	2.337
<i>Bifidobacterium breve</i> ^{Bruker}	8	Dospělý/Kojenec	2.188
<i>Bifidobacterium callimiconis</i> ^{KMVD}	1	Lvíček	2.037
<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i> ^{KMVD}	5	Lvíček	2.096
<i>Bifidobacterium callitrichos</i> ^{KMVD}	2	Lvíček	1.727
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> ^{Bruker}	6	Dospělý/Kojenec/Lvíček	2.253
<i>Bifidobacterium dentium</i> ^{Bruker}	1	Dospělý	2.182
<i>Bifidobacterium goeldii</i> ^{KMVD}	3	Lvíček	2.102
<i>Bifidobacterium imperatoris</i> ^{KMVD}	1	Lvíček	1.942
<i>Bifidobacterium indicum</i> ^{KMVD}	3	Kojenec	2.137
<i>Bifidobacterium longum</i> ^{Bruker}	19	Dospělý/Kojenec	2.230
<i>Bifidobacterium parvae</i> ^{KMVD}	13	Lvíček	2.096
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> ^{Bruker}	6	Dospělý/Lvíček	2.276
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ^{Bruker}	1	Lvíček	2.096
<i>Bifidobacterium ramosum</i> ^{KMVD}	2	Lvíček	1.898
<i>Bifidobacterium saguini</i> ^{KMVD}	4	Lvíček	2.125

Bruker – druhy v oficiální databázi MALDI TOF MS (Bruker, Německo)

KMVD – druhy nově přidané

Nejčastěji vyskytujícími se druhy byly *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. parvae*, *B. animalis* a *B. breve*. Shodné druhy pro obě skupiny byly druhy *B. adolescentis*, *B. catenulatum*

a *B. pseudocatenulatum*. Nejvyšší identifikační skóre měl druh *B. adolescentis*. Druh *B. breve* měl často ve druhém skóre identifikace nejbližší shodu s *B. indicum* a naopak, zřejmě jsou si tyto druhy z pohledu spektra podobné. Stejný jev se projevil i mezi *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum* (identifikační skóre pro všechny testované kmeny je uvedeno v příloze č. 2-5). Za detekované multihostitelské druhy můžeme označit *B. adolescentis* a *B. catenulatum*, které byly identifikovány jak u lvíčků, tak i u dospělých a kojenců. Dále pak *B. pseudocatenulatum*, který se ale vyskytoval pouze u lvíčků a dospělých.

U lvíčka zlatého se nepodařilo identifikovat všechny vzorky, i přestože se dle morfologie a testu na přítomnost enzymu F6PPK jedná pravděpodobně o zástupce rodu *Bifidobacterium* či čeledi *Bifidobacteriaceae*. Vzorky mohly být špatně připraveny, kontaminovány, anebo se může jednat o nově popsáné či ještě nepopsané druhy, které zatím v databázi nejsou. Z 81 vzorků bylo identifikováno 52, což tvoří 64 %. Počet detekovaných druhů poukazuje na vyšší variabilitu zástupců rodu *Bifidobacterium* a čeledi *Bifidobacteriaceae* u lvíčka zlatého než u lidí. Celkem bylo rozpoznáno 13 druhů bifidobakterií, z nichž byl nejčastějším druhem *B. parvae*, který v druhém skóre možné shody nebyl identifikován, nebo vykazoval podobnost s *B. stellenboschense*. Druhým nejčastěji se vyskytujícím druhem byl *B. adolescentis*, který měl 100% shodu v obou identifikačních skóre. Podrobný přehled o identifikaci a identifikačních skóre je v příloze č. 1-4. Na skóre identifikace mělo vliv, zda byl identifikovaný druh stávající, anebo nově přidaný. Pro stávající druhy je v databázi více kmenů, což má vliv na výslednou identifikaci. Tudiž bylo dobré skóre detekováno u druhů jako je *B. adolescentis*, *B. pseudolongum*, *B. catenulatum*/*B. pseudocatenulatum*. Seznam kmenů, které se nepodařilo identifikovat je uveden v příloze č. 6. V příloze jsou uvedeny i kmeny s nejbližším možným podobným spektrem. Identifikaci však nelze považovat za relevantní, nicméně ve více jak polovině testovaných vzorků se jednalo o rod *Bifidobacterium*.

Tabulka 8 Identifikované druhy u Lvíčka zlatého

Lvíček zlatý			
Druh (13)	Identifikovaných vzorků (52)	Nejvyšší skóre	Průměrné skóre
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	11	2.332	2.154
<i>Bifidobacterium avesanii</i>	5	2.158	2.095
<i>Bifidobacterium callimiconis</i>	1	2.037	2.037
<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	5	2.096	1.885
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	2	1.727	1.719
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1	2.080	2.080
<i>Bifidobacterium goeldii</i>	3	2.102	2.018
<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	1	1.942	1.942
<i>Bifidobacterium parvae</i>	13	2.096	1.868
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	3	2.276	2.126
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	1	2.096	2.096
<i>Bifidobacterium ramosum</i>	2	1.898	1.884
<i>Bifidobacterium saguini</i>	4	2.125	1.979

Tabulka 9 Rozmezí pro identifikované skóre

Skóre	Popis	Barva
2.300 ... 3.000	Vysoce pravděpodobná identifikace druhu	Zelená
2.000 ... 2.299	Zaručená identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu	Zelená
1.700 ... 1.999	Pravděpodobná identifikace rodu	Žlutá
0.000 ... 1.699	Není spolehlivá identifikace	Červená

Lidských vzorků bylo celkem 63, z toho 32 od dospělých a 31 od kojenců. Tyto vzorky se podařily identifikovat všechny, vykazovaly také vyšší skóre identifikace než vzorky od lvičků. Celkem bylo identifikováno 9 druhů. U dospělých byl nejčastějším druhem *B. adolescentis* jako u lvičků, ovšem u kojenců se vyskytoval pouze ojedinele. U kojenců byl nejvíce zastoupený druh *B. longum*, který byl identifikován u poloviny testovaných vzorků. Vzorky od dospělých jedinců vykazovaly vyšší druhovou variabilitu, vyskytly se zde i druhy *B. dentium* a *B. pseudocatenulatum*, které ve vzorcích od kojenců nemají ani jednoho zástupce. Druhem vyskytujícím se pouze u kojenců byl *B. indicum*, který není pro lidi typický, takže lze předpokládat, že se jedná o *B. breve*, kdy použitá metoda nedokázala druhy řádně odlišit a identifikovat.

Tabulka 10 Identifikované druhy u dospělých jedinců

Lidé - dospělí			
Druh (8)	Identifikovaných vzorů (32)	Nejvyšší skóre	Průměrné skóre
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	7	2.390	2.226
<i>Bifidobacterium animalis</i>	5	2.341	2.204
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4	2.317	2.260
<i>Bifidobacterium breve</i>	4	2.078	2.029
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2	2.253	2.243
<i>Bifidobacterium dentium</i>	1	2.182	2.182
<i>Bifidobacterium longum</i>	6	2.205	2.159
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	3	2.191	2.179

Tabulka 11 Identifikované druhy u kojenců

Lidé - kojenci			
Druh (7)	Identifikovaných vzorků (31)	Nejvyšší skóre	Průměrné skóre
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	4	2.299	2.091
<i>Bifidobacterium animalis</i>	2	2.275	2.214
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2	2.337	2.216
<i>Bifidobacterium breve</i>	4	2.188	2.019
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	3	2.167	2.127
<i>Bifidobacterium indicum</i>	3	2.137	2.005
<i>Bifidobacterium longum</i>	13	2.230	2.139

6 Diskuze

Rod *Bifidobacterium* patří mezi významné komenzální bakterie střevní mikrobioty (Milani et al. 2014). Jedná se o sacharolytické bakterie, které pro své příznivé účinky na zdraví hostitele našly uplatnění jako probiotika (Bunešová et al. 2015; Picard et al. 2005). Vzhledem k narůstajícímu počtu a hostitelské variabilitě druhů náležejících do rodu *Bifidobacterium* je třeba pracovat na rychlých a spolehlivých metodách identifikace (Carbonnelle et al. 2011). Jednou z možností identifikace bifidobakterií je metoda MALDI TOF MS.

V průběhu posledního desetiletí se pro rychlou a spolehlivou identifikaci bakterií a kvasinek stále více používá hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) (Honnaivar et al. 2018). Spolehlivost metody identifikace založené na MALDI-TOF MS závisí hlavně na přesnosti a robustnosti referenčních databází, které vyžadují neustálé rozšiřování a zlepšování. O rozšíření databáze Bruker se snaží více laboratoří. Roku 2006 se Mazzeo et al. podařilo rozšíření o 26 druhů potravinářských patogenů. Böhme et al. v roce 2012 rozšířil MALDI-TOF MS databázi o více než 70 bakteriálních druhů a zveřejnil je na volně dostupné webové aplikaci SPECLUST (Rahi, Prakash & Shouche 2016).

Pro identifikaci bifidobakterií pocházejících ze vzorků od lvíčků zlatých byla použita právě nově rozšířená databáze. Databáze od Bruker byla rozšířena o 50 bifidobakteriálních druhů ke stávajícím 25 druhům bifidobakterií. Díky tomu se podařilo identifikovat z celkových 144 vzorků 115, tedy 79,8 %. Díky rozšíření databáze se podařilo identifikovat 10 z celkově 19 identifikovaných druhů. Pokud by databáze nebyla rozšířena, podařilo by se pomocí základní databáze od Bruker identifikovat pouze 47 % z identifikovaných druhů.

Lidská střevní mikrobiota se účastní celé řady interakcí ovlivňujících zdraví hostitele po celou dobu jeho života. Mikroorganismy kolonizují novorozenecké střevo ihned po narození. Bifidobakterie jsou přenášeny mezi matkou a novorozencem. Konkrétně byly pozorovány přenosy druhů *B. breve* a *B. bifidum* (Milani et al. 2017). Tyto druhy byly nalezeny jak ve vzorcích od dospělých lidí, tak i u kojenců. Naopak u lvíčků se tyto druhy nevyskytovaly vůbec. Arboleya et al. (2016) uvádí, že druhy *B. longum*, *B. breve* a *B. bifidum* jsou nejhodněji zastoupeny u kojenců. Je tedy zajímavé, že vzorky použité v této práci tomu neodpovídají. *B. breve* a *B. bifidum* jsou u kojenců sice zastoupeny, ovšem méně než u dospělých a druh *B. longum* se ve vzorcích kojenců nebyly detekovány vůbec. Druh bifidobakterií, který je spojován s mikrobiotou dospělých je *B. adolescentis* (Milani et al. 2017). Tuto informaci výsledky potvrzují. *B. adolescentis* byl nalezen u dospělých jedinců, ale také u lvíčků, lze ho tedy považovat za multihostitelský.

Mnoho druhů bifidobakterií není hostitelsky specifická (typické pouze pro jeden živočišný druh) a mohou se vyskytovat u více druhově rozdílných živočichů včetně člověka. Tyto druhy můžeme označit právě za multihostitelské (Bunešová et al. 2014) či kosmopolitní (Killer et al. 2018). Podařilo se identifikovat celkem 3 multihostitelské druhy. Prvním z nich a také nejvíce zastoupeným druhem u obou sledovaných skupin byl *B. adolescentis*, jehož nejčastějším hostitelem jsou dospělí lidé. Dále se podařilo identifikovat *B. catenulatum*, který byl zastoupen u lidí a pouze v jednom vzorku u lvíčků. Posledním identifikovaným multihostitelským druhem je *B. pseudocatenulatum*. Tento druh byl přítomen u lvíčků a u dospělých, u kojenců se ovšem

nepodařil identifikovat. Druhy *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum* jsou si geneticky velmi blízké a v případě MALDI TOF MS identifikace je obtížné je odlišit.

U lvíčků zlatých se nácházelo několik druhů, které ve vzorcích od lidí nalezeny nebyly. Jednalo se převážně o druhy prvně izolované od novosvětských opic, mezi které se řadí i lvíček zlatý, zejména pak od kosmanů a tamarinů. Identifikované druhy *B. callitrichidarum*, *B. callitrichos* a *B. parmae* pochází od kosmanů. Druhy *B. callimiconis*, *B. imperatoris*, *B. ramosum*, *B. avesanii* a *B. saguini* pak pochází od tamarinů (Mattarelli & Biavati 2018). Výsledek tedy naznačuje, že dané druhy nejsou striktně přítomny v družících opic, ve kterých byly popsány, ale jsou typické/specifické pro novosvětské primáty. Což potvrzuje fakt, že ze vzorků lvíčka zlatého se podařilo identifikovat 13 druhů bifidobakterií a stále zde je několik izolátů neidentifikovaných s předpokladem, že se jedná o bakterie rodu *Bifidobacterium*.

Neúspěšně identifikovaných vzorků bylo celkem 29. Všechny tyto vzorky pocházely od lvíčků. Je zde možnost, že vzorky mohly být špatně připraveny, kontaminovány, nebo se může jednat o nové druhy, které do databáze zatím nebyly vloženy. V příloze 6 jsou uvedené nejbližší možné shody u vzorků, které nebyly průkazně identifikovány. Pro úspěšnou identifikaci alespoň na rodové úrovni je nutné minimální identifikační skóre 1.700 a vyšší. U více než poloviny neidentifikovaných případů byl jako nejbližší shoda určen rod *Bifidobacterium*. Nejčastěji zastoupenými druhy byly *B. callitrichos* a *B. parmae*. Oba tyto zástupci jsou dle Mattarelli & Biavati (2018) původem od kosmana bělovousého a kosmana zakrslého. Výsledky ovšem s ohledem na velmi nízké identifikační skóre nelze považovat za relevantní.

Pro jednoznačnou identifikaci by bylo potřeba výsledky ověřit i jinou metodou, například sekvenováním 16S rRNA genu, které se u bifidobakterií běžně používá (Killer et al. 2018; Lugli et al. 2017). Sekvenování 16S rRNA nebo celogenomové sekvenování může pomoci k identifikaci kmenů, které se ani po rozšíření databáze nepodařilo identifikovat. Těmito metodami by navíc bylo možné potvrdit, zda se skutečně jedná o nové, dosud neidentifikované druhy bifidobakterií.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo verifikovat nově rozšířenou databázi pro MALDI-TOF MS. Databázi se podařilo rozšířit o 50 nových druhů bifidobakterií. Pro ověření funkčnosti bylo použito celkem 144 vzorků od zvířecích i lidských hostitelů. Celkem se podařilo identifikovat 19 různých druhů bifidobakterií. Díky rozšíření databáze bylo možné identifikovat 10 druhů z celkově identifikovaných, které by bez rozšíření nebylo možné detekovat.

Dalším cílem bylo identifikovat u vzorků od zvířecích hostitelů druhy bifidobakterií typické pro lidi. U vzorků od lvíčků zlatých se podařilo nalézt celkem 3 multihostitelské druhy typické spíše pro člověka. Jednalo se o *B. adolescentis*, *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum*.

Oba cíle se podařilo splnit. Hypotéza byla potvrzena. Rozšíření databáze pomůže k rychlejší a přesnější identifikaci vzorků.

8 Literatura

- Arboleya, S., Watkins, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2016). Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01204>
- BIAVATI, B., HOLZAPFEL, W. H., A, B. J. B. W., & MATTARELLI, P. (2018). The bifidobacteria and related organisms: biology, taxonomy, applications. In *The bifidobacteria and related organisms*.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., & Bottazzi, V. (2000). Bifidobacteria: History, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50(2), 117–131.
- Bunešová, V. (2018). *MODULACE STŘEVNÍ MIKROBIOTY - probiotika, prebiotika, synbiotika*.
- Bunešová, V., Joch, M., Musilová, S., & Rada, V. (2017). Bifidobacteria, Lactobacilli, and Short Chain Fatty Acids of Vegetarians and Omnivores. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48(1), 47–54. <https://doi.org/10.1515/sab-2017-0007>
- Bunesova, V., Musilova, S., Geigerova, M., Pechar, R., & Rada, V. (2015). Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *Journal of Microbiological Methods*, 109, 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.016>
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Hovorková, P., Musilová, Š., & Kmet, V. (2014). Direct identification of bifidobacteria from probiotic supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(2), 132–136. <https://doi.org/10.17221/291/2013-cjfs>
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., ... Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>
- D'Argenio, G., & Mazzacca, G. (2000). Short-chain fatty acid in the human colon: Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- de Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Adv Biochem Engin*, (May, 07), 1–66. <https://doi.org/10.1201/b15561-2>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2011). Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.003>
- Dinoto, A., Marques, T. M., Sakamoto, K., Fukiya, S., Watanabe, J., Ito, S., & Yokota, A. (2006). Population dynamics of Bifidobacterium species in human feces during raffinose administration monitored by fluorescence in situ hybridization-flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7739–7747. <https://doi.org/10.1128/AEM.01777-06>
- Flesch, A. G. amarr. T., Poziomyck, A. K. irjne., & Damin, D. C. arvalh. (2014). The therapeutic use of symbiotics. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva: ABCD = Brazilian archives of digestive surgery*, 27(3), 206–209. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202014000300012>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., & Clark, I. M. (2010). Culture-independent molecular

- techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(6), 878–887. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.019>
- Honnar, P., Ghosh, A. K., Paul, S., Shankarnarayan, S. A., Singh, P., Dogra, S., ... Rudramurthy, S. M. (2018). Identification of *Malassezia* species by MALDI-TOF MS after expansion of database. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 92(2), 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.015>
- Huong, T. T., Kopel, P., Komínková, M., Guráň, R., Ruttkay-Nedecký, B., Trnková, L., ... Kizek, R. (2014). Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 1, 64–66.
- Jirillo, E., Jirillo, F., & Magrone, T. (2013). Healthy Effects Exerted by Prebiotics, Probiotics, and Symbiotics with Special Reference to their Impact on the Immune System. <http://dx.doi.org/10.1024/0300-9831/a000112>. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/A000112>
- Jr Robert E Farrell. (2005). RNA Methodologies. In *RNA Methodologies : A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (s. 439–535). Získáno z <https://ebookcentral-proquest-com.infozdroje.czu.cz/lib/czup/detail.action?docID=269534&query=PCR>
- Killer, J., Mekadim, C., Pechar, R., Bunešová, V., Mrázek, J., & Vlková, E. (2018). Gene encoding the CTP synthetase as an appropriate molecular tool for identification and phylogenetic study of the family Bifidobacteriaceae. *MicrobiologyOpen*, 7(4), 1–11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.579>
- Killer, J., Mekadim, C., Pechar, R., Bunešová, V., & Vlková, E. (2018). The threonine-tRNA ligase gene region is applicable in classification, typing, and phylogenetic analysis of bifidobacteria. *Journal of Microbiology*, 56(10), 713–721. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8167-3>
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1303–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02600.x>
- Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. (2000). Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gut.47.5.646>
- Lugli, G. A., Milani, C., Turrioni, F., Duranti, S., Mancabelli, L., Mangifesta, M., ... Ventura, M. (2017). Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. *BMC Genomics*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3955-4>
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., & Pal, U. K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *American Journal of Food Technology*, Roč. 6, s. 87–102. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.87.102>
- Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). *Prebiotics*. 18(2), 287–298. <https://doi.org/10.1053/ybega.2004.445>
- Mattarelli, P., & Biavati, B. (2018). *Species in the Genus*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6/00002-8>
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrioni, F., Mahony, J., ... Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4), 1–67. <https://doi.org/10.1128/mubr.00036-17>
- Milani, C., Lugli, G. A., Duranti, S., Turrioni, F., Bottacini, F., Mangifesta, M., ... Ventura, M. (2014). Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(20), 6290–6302. <https://doi.org/10.1128/AEM.02308-14>
- Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 63(9), 482–494.

- <https://doi.org/10.1016/j.endoen.2016.10.011>
- Palframan, R. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology*.
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Obinson, T. R., Eant, F. N., Tucha, C. M. A., ... Carasso, D. (2005). Review article : bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. 495–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition*, 6(3), 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Rahi, P., Prakash, O., & Shouche, Y. S. (2016). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: Challenges and scopes for microbial ecologists. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01359>
- REUTER, G. (1963). VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN UEBER DIE BIFIDUS-FLORA IM SAEUGLINGS- UND ERWACHSENENSTUHL. ZUGLEICH EIN BEITRAG ZUR SYSTEMATISIERUNG UND NOMENKLATUR DER BIFIDUS-KEIME. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale*.
- Rios-Covian, D., Gueimonde, M., & Flint, H. J. (2015). Enhanced butyrate formation by cross-feeding between. *FEMS Microbiology Letters Advance*.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 88–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.003>
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
- Salmonová, H., & Bunešová, V. (2017). Methods of Studying Diversity of Bacterial Communities: A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48(3), 154–165. <https://doi.org/10.1515/sab-2017-0022>
- Savignac, H. M., Tramullas, M., Kiely, B., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural Brain Research*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.044>
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2003). Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.185.8.2571-2581.2003>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Takada, T., Matsumoto, K., & Nomoto, K. (2004). Development of multi-color FISH method for analysis of seven Bifidobacterium species in human feces. *Journal of Microbiological Methods*, 58(3), 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.05.006>
- Tannock, G. W. (1999). Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in molecular biology*, 1(1–2), 53–64. <https://doi.org/10.21775/cimb.001.053>
- Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M., & Tao, H. (2007). A simple intact protein

- analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences. *Journal of Proteome Research*, 6(10), 3899–3907. <https://doi.org/10.1021/pr070218l>
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Turroni, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2011). Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.010>
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., Ventura, M., ... Sinderen, D. Van. (2007). *Genomics of Actinobacteria : Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum* *Genomics of Actinobacteria : Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum* †. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- Ventura, M., van Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., & Zink, R. (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 86(3), 205–223. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000047930.11029.ec>
- Vlková, E., Salmonová, H., Bunešová, V., Geigerová, M., Rada, V., & Musilová, Š. (2015). A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe*, 34, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.001>
- Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M. H. C., van Neerven, R. J. J., Nauta, A., & Van Sinderen, D. (2013). Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1132–1146. <https://doi.org/10.1111/jam.12105>
- Yuan Chen, & John R. Perfect. (2017). *Efficient, Cost-Effective, High-Throughput, Multilocus Sequencing Typing (MLST) Method, NGMLST, and the Analytical Software Program MLSTEZ*. 1492(November), 185–196. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6442-0>

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ATP – Adenosin-trifosfát

CCUG – Culture collection of university Gothenburg / Sběrka kultur univerzity Gothenburg

CLA – Conjugated Linolic Acid / Konjugovaná kyselina linolová

COG – Klastry ortologických skupin proteinů

CTP – Citidin trifosfát

DSMZ – German Collection of Microorganism / Německá sbírka mikroorganismů

F6PPK – Fruktosa-6-fosfát fosfoketoláza

FeCl₃ – Chlorid železitý

FISH – Fluorescenční in situ hybridizace

GIT – Gastrointestinální trakt

HMOs – Human Milk Oligosaccharides / Oligosacharidy mateřského mléka

LMG – Belgian co-ordinated collection of microorganism / Belgická koordinovaná sbírka mikroorganismů

MALDI-TOF MS – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight / Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

MLST – Multilocus sekvenční typování / Multilokus sekvenční analýza

Mup – Mupirocin

NaCl – Chlorid sodný

Norf – Norfloxacin

NRI – Not reliable identification / Není spolehlivá identifikace

PCR – Polymerázová řetězová reakce

PUFA – Poly Unsaturated Fatty Acids / Polynenasycené mastné kyseliny

SCFAs – Short chain fatty acids / Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

TFA – Trifluoroctová kyselina

UTP – Uridin trifosfát

10 Samostatné přílohy

10.1 Příloha 1 – Rozšíření databáze

Číslo	KÓD	ROD	DRUH	PODDRUH	PŘIJATO OD	ZDROJ
1	BIF 1	<i>Bifidobacterium</i>	<i>actinocoloniforme</i>		DSMZ 22766	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)
2	BIF 5	<i>Bifidobacterium</i>	<i>aesculapii</i>		DSMZ 26737	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)
3	BIF 11	<i>Bifidobacterium</i>	<i>apri</i>		DSMZ100238	Obsah střev divokého prasete (<i>Sus scrofa scrofa</i>)
4	BIF 13	<i>Bifidobacterium</i>	<i>avesanii</i>		DSMZ100685	Výkaly tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i> L.)
5	BIF 14	<i>Bifidobacterium</i>	<i>biavatii</i>		DSMZ 23969	Výkaly tamarína žltorukého
6	BIF 21	<i>Bifidobacterium</i>	<i>bohemicum</i>		DSMZ 22767	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)
7	BIF 22	<i>Bifidobacterium</i>	<i>bombi</i>		DSMZ 19703	Obsah trávicího traktu čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)
8	BIF 25	<i>Bifidobacterium</i>	<i>callitrichos</i>		DSMZ 23973	Výkaly kosmana
9	BIF 26	<i>Bifidobacterium</i>	<i>canis</i>		DSMZ105923	Výkaly německého ovčáka
10	BIF 30	<i>Bifidobacterium</i>	<i>crudilactis</i>		LMG 23609	Syrové kravské mléko
11	BIF 31	<i>Bifidobacterium</i>	<i>cuniculi</i>		DSMZ 20435	Králičí výkaly
12	BIF 33	<i>Bifidobacterium</i>	<i>eulemuris</i>		DSMZ100216	Čerstvé výkaly černých lemurů (<i>Makak Eulemur</i>) umístěných v polopřírodních podmínkách
13	BIF 36	<i>Bifidobacterium</i>	<i>hapali</i>		DSMZ100202	Výkaly mláděte kosmana (<i>Callithrix jacchus</i> L.)
14	BIF 38	<i>Bifidobacterium</i>	<i>indicum</i>		DSMZ 20214	Trávicí trakt včely medonosné
15	BIF 39	<i>Bifidobacterium</i>	<i>catenulatum</i>	<i>kashiwanohense</i>	DSMZ 21854	Výkaly zdravého batolete (muž; 1.5 roku)
16	BIF 40	<i>Bifidobacterium</i>	<i>lemurum</i>		DSMZ 28807	Výkaly 5 let starého lemura kata (<i>Lemur catta</i>)
17	BIF 52	<i>Bifidobacterium</i>	<i>mongoliense</i>		DSMZ 21395	Kumys, mongolský tradiční nápoj vyrobený z fermentovaného kobyliho mléka
18	BIF 53	<i>Bifidobacterium</i>	<i>moukalabense</i>		DSMZ 27321	Výkaly divoké západní nížinné gorily (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)

19	BIF 54	<i>Bifidobacterium</i>	<i>myosotis</i>		DSMZ100196	Výkaly mláděte kosmana (<i>Callithrix jacchus</i> L.)
20	BIF 56	<i>Bifidobacterium</i>	<i>globosum</i>		DSMZ 20092	Bachor
21	BIF 57	<i>Bifidobacterium</i>	<i>pseudolongum</i>		DSMZ 20099	Výkaly prasete
22	BIF 58	<i>Bifidobacterium</i>	<i>psychraerophilum</i>		DSMZ 22366	Prasečí slepé střevo
23	BIF 60	<i>Bifidobacterium</i>	<i>ramosum</i>		DSMZ100688	Výkaly tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i> L.)
24	BIF 61	<i>Bifidobacterium</i>	<i>reuteri</i>		DSMZ 23975	Výkaly kosmanů
25	BIF 64	<i>Bifidobacterium</i>	<i>saguini</i>		DSMZ 23967	Výkaly tamarína žltorukého
26	BIF 66	<i>Bifidobacterium</i>	<i>stellenboschense</i>		DSMZ 23968	Výkaly tamarína žltorukého
27	BIF 67	<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>		DSMZ 24849	Stolice zdravého muže, 27 let
28	BIF 68	<i>Bifidobacterium</i>	<i>subtile</i>		DSMZ 20096	Kanalizace
29	BIF 69	<i>Bifidobacterium</i>	<i>porcinum</i>		DSMZ 17755	Výkaly selat
30	BIF 70	<i>Bifidobacterium</i>	<i>thermacidophilum</i>		DSMZ 15837	Odpadní voda z farmy fazolí
31	BIF 73	<i>Bifidobacterium</i>	<i>tissieri</i>		DSMZ100201	Výkaly mláděte kosmana (<i>Callithrix jacchus</i> L.)
32	BIF 74	<i>Bifidobacterium</i>	<i>tsurumiense</i>		DSMZ 17777	Křeček, zubní plak
33	BIF 47	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	<i>suillum</i>	DSMZ 28597	Výkaly selat
34	BIF 75	<i>Bifidobacterium</i>	<i>aemilianum</i>		LMG 30143	Tesařská včela (<i>Xylocopa violacea</i>)
35	BIF 77	<i>Bifidobacterium</i>	<i>anseris</i>		LMG 30189	Výkaly husy domácí
36	BIF 83	<i>Bifidobacterium</i>	<i>aquikefiri</i>		LMG 28769	Vodní kefir
37	BIF 91	<i>Bifidobacterium</i>	<i>callitrichidarum</i>		DSMZ103152	Výkaly tamarína vousatého
38	BIF 90	<i>Bifidobacterium</i>	<i>catulorum</i>		DSMZ103154	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)
39	BIF 78	<i>Bifidobacterium</i>	<i>criceti</i>		LMG 30188	Křeček polní
40	BIF 79	<i>Bifidobacterium</i>	<i>imperatoris</i>		LMG 30297	Tamarín vousatý
41	BIF 80	<i>Bifidobacterium</i>	<i>italicum</i>		LMG 30187	Výkaly tamarína vousatého
42	BIF 81	<i>Bifidobacterium</i>	<i>margollesii</i>		LMG 30296	Kosman zakrslý
43	BIF 82	<i>Bifidobacterium</i>	<i>parmae</i>		LMG 30295	Kosman zakrslý
44	BIF 84	<i>Bifidobacterium</i>	<i>vansinderenii</i>		LMG 30126	Tamarín vousatý (<i>Saguinus imperator</i>)
45	BIF 76	<i>Bifidobacterium</i>	<i>xylocopae</i>		LMG 30142	Tesařská včela (<i>Xylocopa violacea</i>)
46	BIF 85	<i>Bifidobacterium</i>	<i>castoris</i>		LMG 30937	Bobr (<i>Castor fiber</i>)
47	BIF 86	<i>Bifidobacterium</i>	<i>callimiconis</i>		LMG 30938	Tamarín skákavý (<i>Callimico goeldii</i>)

48	BIF 87	<i>Bifidobacterium</i>	<i>goeldii</i>		LMG 30939	Tamarín skákavý (<i>Callimico goeldii</i>)
49	BIF 88	<i>Bifidobacterium</i>	<i>samirii</i>		LMG 30940	Kotul amazonský (<i>Saimiri boliviensis peruviansis</i>)
50	BIF 89	<i>Bifidobacterium</i>	<i>dolichotidis</i>		LMG 30941	Mara stepní (<i>Dolichotis patagonum</i>)

DSMZ – German Collection of Microorganism / Německá sbírka mikroorganismů

LMG – Belgian co-ordinated collection of microorganism / Belgická koordinovaná sbírka mikroorganismů

10.2 Příloha 2 - Identifikace a identifikační skóre pro Lvíčka zlatého

Číslo vzorku	Medium	Identifikace MALDI TOF MS	Skóre	Identifikace MALDI TOF MS 2	Skóre 2
61L-8B	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.187	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.162
61N-7B	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.968	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.886
61O-8A	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.196	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.108
62-7B	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.090	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.064
62-7D	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.234	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.209
61H-6A	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.061	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.060
61M-7A	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.163	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.043
61N-6A	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.164	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.162
61F/6NA	Norf	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.284	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.241
61A/9A	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.332	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.268
61A/8D	Mup	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.014	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.996
61G-7B	Norf	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	2.064	NRI	1.544
61J-7B	Mup	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	2.158	NRI	1.434
61K-8A	Norf	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	2.151	NRI	1.414
61M-7A	Norf	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	2.055	NRI	1.558
61N-5A	Norf	<i>Bifidobacterium avesanii</i>	2.051	NRI	1.431
61J-8B	Mup	<i>Bifidobacterium callimiconis</i>	2.037	<i>Bifidobacterium vasiderenii</i>	1.783

1/6NF	Norf	<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	1.804	NRI	1.539
3/6NA	Norf	<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	1.779	NRI	1.560
61J-7B	Mup	<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	1.833	NRI	1.559
61B/9NB	Norf	<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	2.096	NRI	1.640
61D/7NB	Norf	<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	1.916	NRI	1.437
3/7NA	Norf	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.727	NRI	1.507
61K-8B	Norf	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.712	NRI	1.550
62-7A	Mup	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.080	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.013
61G-8D	Mup	<i>Bifidobacterium goeldii</i>	2.003	NRI	1.512
61G-8A	Mup	<i>Bifidobacterium goeldii</i>	2.102	NRI	1.410
61G-8C	Mup	<i>Bifidobacterium goeldii</i>	1.950	<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	1.756
61K-7	Norf	<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	1.942	<i>Bifidobacterium saguini</i>	1.870
1/8D	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.864	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	1.707
1/7B	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.767	NRI	1.456
1/7C	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.862	NRI	1.580
2/7A	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.824	NRI	1.625
3/7A	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.862	NRI	1.501
3/7C	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.945	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	1.752
61O-7B	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.777	NRI	1.520
61G-8B	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.837	NRI	1.616
61L-9	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	2.080	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	1.750
61L-8A	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	2.096	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	1.815
61C/6NA	Norf	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.830	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	1.799
61F/7A	Mup	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.753	NRI	1.456
61E/6ND	Norf	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.790	NRI	1.542
61I-7C	Mup	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.144	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.043
61D/7A	Mup	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.276	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.240

61A/8A	Mup	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1.958	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1.834
61I-8A	Mup	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	2.096	<i>Bifidobacterium globosum</i>	1.984
61L-8	Mup	<i>Bifidobacterium ramosum</i>	1.898	NRI	1.430
61-6A	Mup	<i>Bifidobacterium ramosum</i>	1.870	NRI	1.453
61J-7A	Mup	<i>Bifidobacterium saguini</i>	1.959	<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	1.929
61J-6C	Norf	<i>Bifidobacterium saguini</i>	1.912	<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	1.768
61K-6A	Norf	<i>Bifidobacterium saguini</i>	1.920	<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	1.916
61M-9A	Mup	<i>Bifidobacterium saguini</i>	2.125	<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	2.122

Mup – Mupirocin (antibiotikum)

Norf – Norfloxacin (antibiotikum)

10.3 Příloha 3 – Identifikace a identifikační skóre pro dospělé

MALDI číslo	Pozice	Číslo vzorku	Identifikace MALDI TOF MS	Skóre 1	Identifikace MALDI TOF MS 2	Skóre 2
30	L5	JEG	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.300	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.252
9	J11	EvaV1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.390	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.323
2	I21	IvaT	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.211	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.170
39	N22	JK10	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.158	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.153
36	N16	JK17	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.239	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.185
56	P7	BL11	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.178	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.144
038	M10	PEG038	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.107	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.080
005	M1	PEG005	<i>Bifidobacterium animalis</i>	1.876	NRI	1.620
042	M12	PEG042	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.240	<i>Bifidobacterium animalis</i>	1.983
043	M13	PEG043	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.247	<i>Bifidobacterium animalis</i>	1.963
052	M16	PEG052	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.316	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.084
084	N8	PEG084	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.341	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.097
10	J13	EvaV2	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.317	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.294

29	L4	Daš	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.174	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.159
40	N23	JK15	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.247	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.153
55	P6	BL10	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.305	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.251
010	M4	PEG010	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.992	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.892
064	M22	PEG064	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.987	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.976
071	M24	PEG071	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.078	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.932
074	N2	PEG074	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.062	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.977
51	O21	BL1	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.234	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.180
53	P2	BL5	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.253	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.201
020	M5	PEG020	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.182	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.054
26	K22	Vor1	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.140	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.955
1	I19	Ra94	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.092	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.069
057	M17	PEG057	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.205	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.126
059	M19	PEG059	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.154	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.146
080	N5	PEG080	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.193	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.159
104	N9	PEG104	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.172	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.040
23	K16	Ren	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.185	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.178
32	L10	Lur	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.162	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.156
52	O23	BL2	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.191	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.149

10.4 Příloha 4 – Identifikace a identifikační skóre pro kojení

MALDI číslo	Pozice	Číslo vzorku	Identifikace MALDI TOF MS	Skóre 1	Identifikace MALDI TOF MS 2	Skóre 2
36	N16	P5	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.249	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.220
34	N12	H1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.299	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.188
35	N14	EC1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.072	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.998
38	N20	JK6	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.746	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.724

25	K19	JB1	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.275	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.021
22	K13	JOV1	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.154	<i>Bifidobacterium animalis</i>	1.994
33	L12	Ja8	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.055	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.032
6	L13	MG4	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.377	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.289
13	J19	MK1	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.188	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.097
42	O4	TA1	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.994	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.754
43	O5	TA5	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.965	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.924
50	O19	TA11	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.929	<i>Bifidobacterium indicum</i>	1.856
12	J17	Á1	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.167	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.147
46	O12	MA3	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.048	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1.982
48	O16	MA6	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.166	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.098
14	J22	Klára	<i>Bifidobacterium indicum</i>	2.137	<i>Bifidobacterium indicum</i>	2.075
37	N17	OL12	<i>Bifidobacterium indicum</i>	1.794	<i>Bifidobacterium breve</i>	1.726
57	P9	OL2	<i>Bifidobacterium indicum</i>	2.086	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.058
11	J16	F9 (Fa)	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.187	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.174
20	K9	Ja1	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.148	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.036
16	K1	Š10	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.143	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.104
8	J10	Tomáš	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.101	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.082
3	I23	JV6	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.211	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.125
17	K4	DS2	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.121	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.987
19	K7	MV4	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.191	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.059
27	K24	KŘ1	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.942	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.893
7	J7	ŠP1	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.188	<i>Bifidoobacterium longum</i>	2.131
4	J1	DK2	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.230	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.098
15	J23	TD1	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.060	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.039
44	O8	TA2	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.148	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.053
49	O17	TA10	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.141	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.070

10.5 Příloha 5 – neidentifikované vzorky

Pozice	Číslo vzorku	Medium	Identifikace MALDI TOF MS	Skóre	Nejbližší možný kmen z MALDI DATABÁZE	Skóre
D18	2/7NA	Norf	<i>NRI</i>	1.627	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.627
D21	1/7NC	Norf	<i>NRI</i>	1.573	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.573
D23	1/7ND	Norf	<i>NRI</i>	1.516	<i>Mallasezia furfur</i>	1.516
E4	1/6NB	Norf	<i>NRI</i>	1.580	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.580
E8	1/8B	Mup	<i>NRI</i>	1.632	<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	1.662
E13	3/7NA	Norf	<i>NRI</i>	1.520	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.520
E16	3/7NB	Norf	<i>NRI</i>	1.651	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.651
E20	3/6NC	Norf	<i>NRI</i>	1.654	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.694
E22	2/7C	Mup	<i>NRI</i>	1.525	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.525
E23	2/6B	Mup	<i>NRI</i>	1.624	<i>Bifidobacterium callitrichidarium</i>	1.624
F2	2/6NB	Norf	<i>NRI</i>	1.524	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.524
F3	3/8NA	Norf	<i>NRI</i>	1.656	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.662
F7	3/8B	Mup	<i>NRI</i>	1.670	<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	1.670
F9	2/8A	Mup	<i>NRI</i>	1.469	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.469
C8	61O-7A	Mup	<i>NRI</i>	1.579	<i>Sphingomonas sp.</i>	1.579
D2	61K-9A	Mup	<i>NRI</i>	1.662	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.662
D3	61M-8B	Mup	<i>NRI</i>	1.480	<i>Staphylococcus felis</i>	1.480
G2	61G-9A	Mup	<i>NRI</i>	1.497	<i>Clostridium septicum</i>	1.497
G4	61H-7C	Mup	<i>NRI</i>	1.549	<i>Streptomyces griseus</i>	1.549
G24	61K-6B	Norf	<i>NRI</i>	1.616	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.616
H2	61L-6A	Norf	<i>NRI</i>	1.508	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.508
H11	61M-7B	Mup	<i>NRI</i>	1.484	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.484

H19	61P-5A	Norf	<i>NRI</i>	1.633	<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	1.633
I15	61D/6A	Mup	<i>NRI</i>	1.636	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.636
I18	61B/8NB	Norf	<i>NRI</i>	1.580	<i>Neisseria meningitidis</i>	1.580
I19	61D/NB	Norf	<i>NRI</i>	1.651	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.651
I22	61C/7NA	Norf	<i>NRI</i>	1.531	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.531
J1	61B/9A	Mup	<i>NRI</i>	1.591	<i>Sphingomonas sp.</i>	1.591
J7	61C/8B	Mup	<i>NRI</i>	1.340	<i>Propionibacterium australiense</i>	1.340
J9	61C/7NC	Norf	<i>NRI</i>	1.638	<i>Bifidobacterium catulorum</i>	1.638
J13	61A/7NA	Norf	<i>NRI</i>	1.602	<i>Bifidobacterium parmae</i>	1.602

10.6 Příloha 6 – Rozmezí pro identifikované skóre

Skóre	Popis	Barva
2.300 ... 3.000	Vysoce pravděpodobná identifikace druhu	Zelená
2.000 ... 2.299	Zaručená identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu	Zelená
1.700 ... 1.999	Pravděpodobná identifikace rodu	Žlutá
0.000 ... 1.699	Není spolehlivá identifikace (NRI)	Červená