

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fenotypová a genotypová charakterizace
multi-hostitelských druhů bifidobakterií**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Štivarová

Výživa a potraviny

doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Fenotypová a genotypová charakterizace multi-hostitelských druhů bifidobakterií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a také za pomoc a čas, který mi při zpracování této diplomové práce věnovala. Dále bych ráda vyjádřila poděkování Ing. Nikol Modráčkové a ostatním pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině a nejbližším za podporu a pomoc v průběhu celého studia.

Fenotypová a genotypová charakterizace multi-hostitelských druhů bifidobakterií

Souhrn

Bifidobakterie představují významnou komenzální skupinu bakterií, která v hojném počtu osidluje trávicí trakt člověka i zvířat. Většinou bifidobakteriálních zástupců jsou připisovány příznivé účinky na zdraví hostitele skrze jejich probiotické vlastnosti. Druh *Bifidobacterium dentium* je naopak označován jako oportunní patogen v souvislosti s tvorbou zubního kazu. Kromě výskytu v ústní dutině, je také členem mikrobioty trávicího traktu. Je patrné, že bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou schopny adaptace na podmínky, kterým jsou vystaveny v daném hostitelském prostředí. Tato diplomová práce se zabývala výše uvedeným multihostitelským druhem *B. dentium*, jehož výskyt je typický jak pro člověka, tak pro primáty. Cílem práce bylo charakterizovat vybrané kmeny druhu *B. dentium* pomocí fenotypových a genotypových metod. Na základě dosažených výsledků pak zhodnotit variabilitu mezi jednotlivými kmeny pocházející z lidských hostitelů (stolice dospělých jedinců a kojenců) a primátů (šimpanz, makak lví, pavián pláštík).

Fenotypová charakterizace byla založena na zhodnocení morfologie buněk a provedení biochemických testů (F6PPK test – průkaz fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy, katalázový test, hemolytický test, test utilizace mucinu a dalších substrátů – ANAEROTest 23). Z celkového počtu 20 kmenů dříve identifikovaných jako *B. dentium* bylo 19 kmenů – F6PPK pozitivních, kataláza negativních, negativních v hemolytickém testu a rovněž nedokázaly využít mucin. Na druhou stranu dokázaly využít celou řadu substrátů zahrnutých v ANAEROTestu 23, od glukózy, laktózy až po glykosid salicin. Díky fermentačním profilům byly zaznamenány mírné odlišnosti mezi hostiteli. Kmenově se odlišovaly zejména izoláty pocházející z kojenců a izoláty z šimpanzů, a to v případě utilizace trehalózy nebo celobiózy. Identita k druhu *B. dentium* byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS). Získaná spektra těchto kmenů byla téměř identická. Nicméně, F6PPK negativní, kataláza a mucin pozitivní, v biochemických testech se odlišující kmen 028 (hostitel dítě) byl danou metodou shledán jako nemožný identifikovat. Bylo tedy patrné, že kmen patří nejen k jinému druhu, ale zároveň se nejednalo o rod *Bifidobacterium*. Analýza genotypu testovaných bifidobakterií byla provedena pomocí fingerprintových metod, a to metodou náhodně amplifikované polymorfni DNA (RAPD-PCR) a repetitivních PCR sekvencí (REP-PCR). Na základě získaných profilů bylo možné kmeny rozdělit do několika skupin. Podařilo se detekovat variabilitu nejen v závislosti na hostitelích, ale i mezi jednotlivými kmeny.

Finální taxonomické zařazení bylo provedeno sekvenováním genu 16S rRNA. Z výsledků metody vyplývá, že na rozdíl od kmenů lidského původu, by kmeny izolované z šimpanze a paviána pláštík mohly tvořit potenciální nový poddruh *B. dentium*.

Klíčová slova: Bifidobakterie, člověk, opice, dieta, genotyp, fenotyp

Phenotypic and genotypic characterization of multi-host species of bifidobacteria

Summary

Bifidobacteria represent an important commensal group of bacteria which abundantly inhabit the digestive tract of humans and animals. The majority of bifidobacteria are known to have beneficial effects on host's health through their probiotic properties. On the other hand, *Bifidobacterium dentium* is considered to be an opportunistic pathogen associated with the development of dental caries. Apart from occurring in the oral cavity, it is also a member of the gut microbiota. It is apparent that bacteria of the genus *Bifidobacterium* are capable of adapting to conditions to which they are exposed in a given host environment. This diploma thesis deals with multihost species *B. dentium*, whose occurrence is typical for humans and primates. The aim of this diploma thesis was to characterize selected *B. dentium* strains by phenotypic and genotypic methods. Based on the obtained results, the variability among individual strains derived from human hosts (faeces of adults and infants) and primates (chimpanzee, lion-tailed macaque, hamadryas baboon) was evaluated.

The phenotypic characterization was tested based on the evaluation of cell morphology and biochemical tests (F6PPK test – detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase, catalase test, haemolytic test, mucin and other substrates utilization tests – ANAEROTest 23). 19 out of 20 previously identified *B. dentium* strains were F6PPK positive, catalase negative, negative in the haemolytic test and also failed to utilize mucin. On the other hand, strains were able to utilize a variety of substrates included in ANAEROTest 23, ranging from glucose, lactose to glycoside salicin. The fermentation profiles showed slight differences between the hosts. The differences between strains were especially apparent in isolates from infants and isolates from chimpanzees. They differed mainly in trehalose and cellobiose. The identification of *B. dentium* species was confirmed and ribosomal spectra were characterized using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). However, it was impossible to identify the F6PPK negative, catalase and mucin positive, in biochemical tests differing strain 028 (infant host) by this method. It was evident that the strain belongs to another species and even to a different genus than *Bifidobacterium*. The genotype analysis of the tested bifidobacteria was performed using fingerprint methods, namely Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) and Repetitive sequence-based PCR (REP-PCR). Based on the profiles obtained, it was possible to divide the strains into several groups. In addition, the variability was detected among hosts and also among individual strains.

The final taxonomic classification was performed by 16S rRNA gene sequencing. The results of this method showed that, unlike strains of human origin, strains isolated from chimpanzees and hamadryas baboons could form a potential subspecies of *B. dentium*.

Keywords: Bifidobacteria, human, monkey, diet, genotype, phenotype

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Rod <i>Bifidobacterium</i>	10
3.1.1	Taxonomie a morfologie	10
3.1.2	Fyziologie a metabolismus	10
3.1.3	Výskyt a druhová rozmanitost.....	11
3.1.3.1	<i>Bifidobacterium dentium</i>	16
3.1.4	Zdravotní přínos bifidobakterií	16
3.1.4.1	Bifidobakterie jako probiotika.....	16
3.1.4.2	Prebiotika pro bifidobakterie.....	17
3.2	Identifikace a charakterizace bifidobakterií	19
3.2.1	Fenotypové metody charakterizace bifidobakterií	19
3.2.1.1	Hemolytický test	20
3.2.1.2	Degradace mucinu.....	20
3.2.2	MALDI-TOF MS	21
3.2.2.1	Výhody a nevýhody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	21
3.2.2.2	Princip hmotnostní spektrometrie	21
3.2.2.3	Vyhodnocení výsledků, ID skóre	22
3.2.3	Genotypové metody charakterizace bifidobakterií.....	23
3.2.3.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
3.2.3.2	Rodově a druhově specifická PCR.....	25
3.2.3.3	16S rRNA.....	27
3.2.3.4	Multilokusová sekvenční typizace (MLST)	27
3.2.3.5	Fingerprintové metody	28
3.2.3.6	Sekvenování DNA.....	29
3.2.3.7	Celogenomová sekvenace	30
4	Metodická část	31
4.1	Příprava kultur pro testování	31
4.2	F6PPK test	32
4.3	Katalázový test	33
4.4	Utilizace mucinu	33
4.5	Hemolytický test	34
4.6	ANAEROTest 23	34
4.7	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	35

4.8	PCR – fingerprintové metody	35
4.8.1	Izolace DNA	35
4.8.2	Příprava PCR směsi	35
4.8.3	Agarosová gelová elektroforéza	36
4.8.4	Vyhodnocení	37
4.9	16S rRNA identifikace vybraných kmenů	37
5	Výsledky	38
5.1	Fenotypová charakterizace	39
5.1.1	ANAEROTest 23	41
5.2	MALDI-TOF MS	43
5.3	RAPD-PCR, REP-PCR	43
5.4	Identifikace – sekvenování genu 16S rRNA	45
6	Diskuze	46
7	Závěr	49
8	Literatura	50
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	58
10	Samostatné přílohy	59

1 Úvod

Gastrointestinální trakt představuje životní prostředí pro široké spektrum mikroorganismů, které tvoří střevní mikrobiom. Toto společenství mikroorganismů má nezastupitelnou roli při trávení potravy a vyznačuje se mnoha metabolickými a imunitními funkcemi. Zastoupení těchto mikroorganismů do vysoké míry ovlivňuje zdravotní stav hostitele.

Dle novějších výzkumů dochází ke kolonizaci již v prenatálním stádiu vývoje, k největšímu formování mikrobioty gastrointestinálního traktu novorozence však dochází při porodu a v průběhu kojení. Klíčovými komenzály lidského gastrointestinálního traktu jsou bakterie rodu *Bifidobacterium*. Kromě člověka jsou bifidobakterie přirozenou součástí trávicího traktu nejen zvířat (např. primátů, psi, skot), ale také včel.

Předmětem této diplomové práce je identifikace a charakterizace bakterií rodu *Bifidobacterium* izolovaných z různých hostitelů, především primátů a člověka. Je známo, že bifidobakterie se dokáží do jisté míry adaptovat na podmínky, které představuje hostitelské prostředí. Pro charakterizaci na fenotypové a genotypové úrovni byl zvolen multihostitelský druh a do jisté míry negativní zástupce většinou probiotických bifidobakterií, což je druh *Bifidobacterium dentium*.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Předpokládáme, že multi-hostitelské druhy bifidobakterií izolované z trávicího traktu člověka a primátů budou vykazovat fenotypovou a genotypovou variabilitu. Výskyt společných druhů bifidobakterií pro člověka a primáty bude typický spíše pro starosvětské opice, poloopice a lidoopy.

Cílem této práce bylo nalézt fenotypovou a genotypovou variabilitu mezi bifidobakteriemi stejného druhu pocházejícími z různých hostitelů, především opic a člověka.

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Bifidobacterium*

3.1.1 Taxonomie a morfologie

Bifidobakterie byly poprvé izolovány Henri Tissierem v roce 1899 z trávicího traktu kojenců (Biavati et al. 2000). Těmto bakteriím s charakteristickým tvarem „Y“ bylo přiděleno pojmenování *Bacillus bifidus*. Později byly na základě shodných morfologických a fyziologických charakteristik po dlouhou dobu řazeny do rodu *Lactobacillus* (Bottacini et al. 2014). V současnosti jsou příslušníci rodu *Bifidobacterium* řazeni do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteridae*, řádu *Bifidobacteriales* (Felis & Dellaglio 2007). Společně s rody *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Gardnerella*, *Parascardovia* a *Scardovia* tvoří čeleď *Bifidobacteriaceae* (Milani et al. 2016).

Bifidobakterie jsou řazeny mezi grampozitivní bakterie, jejichž buněčná stěna je tvořena velkým množstvím peptidoglykanu. Bifidobakterie netvoří spory a jsou nepohyblivé. Jedná se o tvarově rozmanitou skupinu, mohou se vyskytovat jako nepravidelné, zakřivené a větvcí se tyčinky samostatně, v řetízcích, nebo ve shlucích (Gomes & Malcata 1999).

3.1.2 Fyziologie a metabolismus

Bifidobakterie jsou heterofermentativní bakterie, produkují kyselinu mléčnou a octovou bez tvorby plynu. Jsou často spojovány s bakteriemi mléčného kvašení. Ačkoli s touto skupinou bakterií sdílí některé typické vlastnosti, z fylogenetického hlediska se neshodují a bifidobakterie využívají unikátní způsob fermentace cukrů (Salminen et al. 2004). Jedná se o fosfoketolázovou dráhu s klíčovým enzymem fruktózo-6-fosfát fosfoketolázou (F6PPK). Bifidobakterie nemají v cytoplazmě aldolázu ani glukózo-6-P-dehydrogenázu, mají však dvě aktivní fosfoketolázy. První katalyzuje rozklad fruktózo-6-P na erytrózo-4-P a pomocí druhé vzniká acetyl-P z xylulózo-5-P. Glycerinaldehyd je v rámci glykolýzy transformován přes kyselinu pyrohroznovou na kyselinu mléčnou, kdežto acetyl-P na kyselinu octovou (Gomes & Malcata 1999). Postupným štěpením je tak získána kyselina octová a kyselina mléčná v teoretickém konečném poměru 3:2 (Sánchez et al. 2007). Energeticky je tato metabolická dráha výhodnější než homofermentativní mléčné kvašení, neboť ze dvou molekul hexózy vznikne 5 molekul ATP (Rosypal 1981). Kromě glukózy mohou všechny bifidobakterie lidského původu využívat jako zdroje uhlíku také galaktózu, laktózu a obvykle fruktózu (Gomes & Malcata 1999).

Příslušníci rodu *Bifidobacterium* jsou popisováni jako anaerobové (Gomes & Malcata 1999). Byly však popsány i druhy, které dokáží kyslík snášet, Andriantsoanirina et al. (2013) testovali schopnost tolerovat kyslík u vybraných kmenů bifidobakterií, a bylo zjištěno, že druhy *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium breve* jsou vysoce tolerantní ke kyslíku po 24 i 48hodinové inkubaci. Navíc pomocí celogenomového sekvenování bylo rozpoznáno, že některé druhy bifidobakterií mají homologní geny kódující enzymy, které jsou schopné odstraňovat reaktivní formy kyslíku (Andriantsoanirina et al. 2013). Optimální teplota pro růst bifidobakterií je 37–41 °C, inhibice

růstu nastává při teplotách nižších než 25 °C. Výjimkou je *Bifidobacterium psychroaerophilum*, u kterého byl zaznamenán růst i při teplotách 8 °C (Cronin et al. 2011). Optimální pH se pohybuje od 6 do 7, přičemž k zástavě růstu bifidobakterií dochází při pH 4,5 a níže, nebo naopak při pH vyšším než 8,5 (Gomes & Malcata 1999; Rakická et al. 2015). Andriantsoanirina et al. (2013) studovali toleranci ke sníženému pH (2,7) u bifidobakterií. Bylo zjištěno že mírnou toleranci ke sníženému pH po dobu 60 minut vykazují druhy *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium dentium*, nicméně žádná z kultur nevykazovala toleranci k dlouhodobé expozici nízkému pH. Druhem, který je schopen růstu při teplotě až 49,5 °C a relativně nízkém pH 4 je *Bifidobacterium thermacidophilum* (Dong et al. 2000).

Většina zástupců je kataláza negativní, některé druhy (*Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium asteroides*) však mohou při růstu v přítomnosti vzduchu vykazovat katalázovou aktivitu (Felis & Dellaglio 2007).

3.1.3 Výskyt a druhová rozmanitost

Na základě sekvenace genu pro 16S rRNA a multilokusové sekvenční analýzy jsou bifidobakteriální druhy řazeny do 7 hlavních fylogenetických skupin, a to *B. adolescentis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. pullorum*, *B. longum* a *B. pseudolongum*. Počet nově objevených druhů stále roste (Lugli et al. 2018). Aktuálně je popsáno 87 druhů a 15 poddruhů rodu *Bifidobacterium*. Aktuální seznam uznaných druhů a poddruhů je dostupný na <https://www.bacterio.net/genus/bifidobacterium>, tento seznam stále narůstá. V **Tabulce 1** je uveden aktuální seznam druhů a poddruhů rodu *Bifidobacterium* ke konci roku 2019.

Několik druhů tohoto rodu bylo izolováno nedávno, jedná se například o *Bifidobacterium imperatoris* (Lugli et al. 2018) nebo *Bifidobacterium callitrichidarum*, které byly izolovány z výkalů tamarína vousatého (Modesto et al. 2018). *Bifidobacterium catulorum* bylo nově popsáno u mláděte kosmana bělovousého (Modesto et al. 2018). Mezi další relativně nově objevené bifidobakterie patří *Bifidobacterium margollesii* a *Bifidobacterium parmae*, které byly izolovány z výkalů kosmana zakrslého (Lugli et al. 2018). V roce 2019 byly popsány druhy *Bifidobacterium callimiconis*, *Bifidobacterium goeldii*, *Bifidobacterium samirii* u tamarína skákavého a kotula amazonského (Duranti et al. 2019).

Tabulka 1 Seznam zástupců rodu *Bifidobacterium*

Druh/ poddruh	Izoloval a popsal
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	Killer et al., 2011
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium aemilianum</i>	Alberoni et al., 2019
<i>Bifidobacterium aerophilum</i>	Michelini et al., 2017
<i>Bifidobacterium aesculapii</i>	Modesto et al., 1974
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Scardovi et Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Scardovi et Trovatelli, 1974
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Masco et al., 2004

<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Masco et al., 2004
<i>Bifidobacterium anseris</i>	Lugli et al., 2018
<i>Bifidobacterium apri</i>	Pechar et al., 2017
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>	Laureys et al., 2016
<i>Bifidobacterium avesanii</i>	Michelini et al., 2019
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Scardovi et Trovatelli, 1969
<i>Bifidobacterium biavatii</i>	Endo et al., 2012
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Orla-Jensen, 1924
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	Killer et al., 2011
<i>Bifidobacterium bombi</i>	Killer et al., 2009
<i>Bifidobacterium boum</i>	Scardovi et al., 1979
<i>Bifidobacterium breve</i>	Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium callimiconis</i>	Duranti et al., 2019
<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	Modesto et al., 2018
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	Endo et al., 2012
<i>Bifidobacterium castoris</i>	Duranti et al., 2019
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Scardovi et Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium catulorum</i>	Modesto et al., 2018
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Scardovi et al., 1979
<i>Bifidobacterium commune</i>	Praet et al., 2015
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	Biavati et al., 1982
<i>Bifidobacterium criceti</i>	Lugli et al., 2018
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	Delcenserie et al., 2013
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	Scardovi et al., 1979
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Scardovi et Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium dolichotidis</i>	Duranti et al., 2019
<i>Bifidobacterium eulemuris</i>	Michelini et al., 2016
<i>Bifidobacterium faecale</i>	Choi et al., 2014
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Lauer, 1990
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	Watabe et al., 1983
<i>Bifidobacterium goeldii</i>	Duranti et al., 2019
<i>Bifidobacterium hapali</i>	Michelini et al., 2016

<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	Lugli et al., 2018
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Scardovi et Trovatelli, 1969
<i>Bifidobacterium italicum</i>	Lugli et al., 2018
<i>Bifidobacterium jacchi</i>	Modesto et al., 2019
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	Mortia et al., 2011
<i>Bifidobacterium lemurum</i>	Modesto et al., 2015
<i>Bifidobacterium longum</i>	Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Mattarelli et al., 2018
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	Mattarelli et al., 2018
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i>	Yanokura et al., 2015
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	Matterli et al., 2008
<i>Bifidobacterium magnum</i>	Scardovi et Zani, 1974
<i>Bifidobacterium margollesii</i>	Lugli et al., 2018
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	Biavati et Mattarelli, 1991
<i>Bifidobacterium minimum</i>	Biavati, 1982
<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	Watanabe et al., 2009
<i>Bifidobacterium moukalabense</i>	Tsuchida et al., 2014
<i>Bifidobacterium myosotis</i>	Michelini et al., 2016
<i>Bifidobacterium parmae</i>	Lugli et al., 2018
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Scardovi et al., 1979
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Mitsuoka, 1969
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Yaeshima et al., 1992
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Yaeshima et al., 1992
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	Simpson et al., 2004
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	Trovatelli et al., 1974
<i>Bifidobacterium ramosum</i>	Michelini et al., 2017
<i>Bifidobacterium reuteri</i>	Endo et al., 2012
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	Biavati et Mattarelli, 1991
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	Biavati et al., 1992
<i>Bifidobacterium saguini</i>	Endo et al., 2012
<i>Bifidobacterium samirii</i>	Duranti et al., 2019
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Hoyles et al., 2002

<i>Bifidobacterium stollenboschense</i>	Endo et al., 2012
<i>Bifidobacterium subtile</i>	Biavati et al., 1982
<i>Bifidobacterium suis</i>	Matteuzzi et al., 1971
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	Dong et al., 2000
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Zhu et al., 2003
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Zhu et al., 2003
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	Mitsuoka, 1969
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	Michelini et al., 2016
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>	Okamoto et al., 2008
<i>Bifidobacterium vansinderenii</i>	Duranti et al., 2017
<i>Bifidobacterium xylocopae</i>	Alberoni et al., 2019

Převzato a upraveno z: www.bacterio.net

Bifidobakterie jsou běžnými komenzály střevního mikrobiomu, bývají izolovány z trávicího traktu savců, ptáků a hmyzu (Turrone et al. 2018). Izoláty ze zvířat jsou bifidobakterie s nižší úrovní diverzity než bifidobakterie asociované s trávicím traktem člověka. Značná fylogenetická diverzita bifidobakterií izolovaných z lidského gastrointestinálního traktu může souviset s adaptací bakterií na širokou škálu konzumovaných sacharidů ve stravě člověka (Segawa et al. 2019). Je známo, že druhová rozmanitost mikrobiomu člověka podléhá výrazným změnám, ke kterým dochází s přibývajícím věkem (Chaplin et al. 2015). Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou jedny z prvních kolonizátorů gastrointestinálního traktu novorozenců (Turrone et al. 2018). U kojenců bifidobakterie zaujímají až 80 % střevního mikrobiomu. Významnou část střevní mikroflóry kojenců představují druhy *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* subsp. *infantis* (Bunešová et al. 2017). V minulosti se předpokládalo, že kolonizace bifidobakteriálními druhy probíhá při porodu a následuje pomocí vertikálního přenosu z matky na potomky v rámci kojení (Turrone et al. 2018). Nagpal et al. (2017) studovali vývoj bifidobakteriálního zastoupení u zdravých dětí v prvních třech letech života a uvádějí, že bifidobakterie se nacházejí již v mekoniu novorozence. Lze tak předpokládat, že ke kolonizaci dochází již v prenatálním období (Nagpal et al. 2017).

Bifidobakteriální zastoupení v mikrobiotě trávicího traktu dospělých je 25%. *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* a *B. pseudocatenulatum* jsou běžně vyskytující se druhy u dospělých osob (Bunešová et al. 2017). Některé druhy se mohou vyskytovat současně u více různých hostitelů jako například: *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. dentium* a *B. catenulatum*, jedná se o takzvané kosmopolitní taxony bifidobakterií (Turrone et al. 2014). Multihostitelské druhy bifidobakterií jsou umístěny v **Tabulce 2**.

Tabulka 2 Multihostitelské druhy bifidobakterií

Multihostitelské druhy a poddruhy	Místo výskytu
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	stolice člověka, bachor skotu, výkaly slona a orangutana
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	stolice člověka, výkaly kočkodana a šimpanze
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	stolice člověka, výkaly psa, muflona, ovce, kočkodana
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	stolice člověka a kojence, výkaly šimpanze
<i>Bifidobacterium dentium</i>	zubní kaz člověka, stolice člověka a kojence, výkaly šimpanze a makaka
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	stolice člověka a kojence, výkaly telete
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	stolice člověka a kojence, výkaly telete, ovce, kočkodana, paviána, šimpanze a lemura
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	stolice kojence, výkaly psa, telete, prasete, kuřete, křesy a morčete
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	stolice kojence, bachor skotu, výkaly telete a ovce

Převzato a upraveno z: Biavati et al. (2000), Bottacini et al. (2014), Modrackova et al. (2019)

Bifidobakterie mají hojně zastoupení u novosvětských opic, jak již bylo popsáno výše v případě nejnověji popsaných druhů. Narozdíl od člověka, je v gastrointestinální traktu kosmanů vysoký podíl bifidobakterií i v dospělém věku (Brown et al. 2019). *Bifidobacterium reuteri* a *Bifidobacterium callitrichos* byly izolovány z výkalu kosmana bělovousého. U tamarína žltorukého byly popsány druhy *Bifidobacterium saguini*, *Bifidobacterium stellenboschense* nebo *Bifidobacterium biavati* (Endo et al. 2012). Rozdíly v početním zastoupení bifidobakterií u dospělého člověka a například u kosmana jsou předmětem mnoha výzkumů. Mezi důvody pro perzistenci bifidobakterií u dospělých kosmanů je uváděn zejména typ stravy, odlišná fyziologie hostitele, expozice různým mikrobům a rozdíly na genetické úrovni (Brown et al. 2019).

Bifidobacterium moukalabense bylo poprvé izolováno ze starosvětské opice – gorily nížinné z divokého západu. Na základě analýz sekvencí 16S rRNA patří *Bifidobacterium moukalabense* do fylogenetické skupiny *Bifidobacterium adolescentis* a úzce tak souvisí s *Bifidobacterium catenulatum* a *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Segawa et al. 2019). Byl popsán draft sekvence genomu *Bifidobacterium moukalabense* a bylo zjištěno, že má velice příbuznou strukturu genomu s druhem *Bifidobacterium dentium* (Lugli et al. 2014). Porovnávání genomů *Bifidobacterium moukalabense* a bifidobakterií izolovaných z člověka vedou k otázkám, z jakého důvodu nebyl tento druh izolován z lidského gastrointestinálního traktu, ale pouze z určitých primátů podčeledi Hominae, a to goril a šimpanzů (Segawa et al. 2019).

V posledních letech jsou často zkoumány bifidobakterie izolované z trávicího traktu šimpanzů, kteří jsou nejbližšími příbuznými člověka a mají rovněž podobnou skladbu stravy. Mezi druhy, které byly popsány u šimpanzů řadíme *B. pseudolongum* (Nomoto et al. 2017), *B. angulatum* (Ushida et al. 2010), *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* (Uenishi et al. 2007), *B. dentium* (D'Aimmo et al. 2014), které bývají rovněž izolovány z člověka. D'Aimmo et al. (2014) vyizolovali *Bifidobacterium adolescentis* z výkalů orangutanů, bakterii typickou pro lidský gastrointestinální trakt.

Dále se mohou bifidobakterie vyskytovat jako součást vaginální mikrobioty, byly též izolovány z lidské krve. Dalším místem jejich výskytu jsou odpadní vody (Rodriguez & Martiny 2020).

3.1.3.1 *Bifidobacterium dentium*

Druh *Bifidobacterium dentium* je označován jako oportunní patogen v souvislosti s tvorbou zubního kazu. V mnoha průzkumech zabývajících se mikrobiomem dutiny ústní u dospělých, byl *B. dentium* nejčastěji izolovaným druhem z karézničních lézí. Tento druh je schopen procesu acidogeneze, který vyústí ve snížení pH pod hodnotu 4,2. Tímto poklesem pH může docházet k demineralizaci zubní tkáně a rozvoji zubních kazů. Patogenita tohoto druhu však dosud nebyla zcela potvrzena (Ventura et al. 2009).

Kromě výskytu v ústní dutině, je *B. dentium* také členem mikrobioty trávicího traktu. *B. dentium* má schopnost adherovat na mukózu střeva, vylučovat metabolity regulující tvorbu mucinu a modulovat funkce pohárkových buněk. Zároveň nemá schopnost degradace mucinových glykanů a využívání mucinu jako primární zdroj uhlíku (Engevik et al. 2019).

3.1.4 Zdravotní přínos bifidobakterií

V gastrointestinálním traktu savců se nachází rozmanité a početné společenství mikroorganismů, známé jako intestinální mikrobiota (Sánchez et al. 2017). Jedná se o komplexní ekosystém zahrnující zejména bakterie, houby a viry, který sehraává klíčovou roli v ovlivňování zdravotního stavu člověka (O'Neill et al. 2017). Tlusté střevo může obsahovat až 10^{12} bakteriálních buněk na gram lumenálního obsahu (O'Callaghan & Sinderen 2016). Co se týče bakterií, ve střevním mikrobiomu dominují kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, následně pak *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Fusobacteria* a *Verrucomicrobia*. Houby a archea představují až 1 % celého lidského mikrobiomu. Bifidobakterie jsou převládajícím druhem gastrointestinálního traktu kojenců a v nižším zastoupení se nachází u dospělého člověka po celou dobu života. Někteří zástupci tohoto rodu se vyznačují probiotickými účinky (Sánchez et al. 2017). Bifidobakteriím jsou připisovány příznivé účinky na lidské zdraví. Snížené zastoupení tohoto rodu v gastrointestinálním traktu je spojováno s mnoha chorobami, včetně zánětlivých střevních onemocnění (O'Neill et al. 2017).

3.1.4.1 Bifidobakterie jako probiotika

Probiotika jsou preparáty obsahující živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav člověka (Sánchez et al. 2017). Jejich aplikace vede k pozitivním změnám ve složení mikrobioty trávicího traktu (redukce hnilobných

mikroorganismů, nastolení fyziologické rovnováhy střevní mikroflóry). Probiotické mikroorganismy musí splňovat několik kritérií, mezi které patří např. nepatogenita daného druhu probiotických bakterií. Rovněž musí být odolné vůči nepříznivým podmínkám při průchodu trávicím traktem a překonat tak působení kyseliny chlorovodíkové, trávicích enzymů a žlučových kyselin. Dalším kritériem je technická využitelnost probiotik a pozitivní ovlivňování hostitele (Bortlík 2009). Mezi mikroorganismy, které jsou začleňovány do probiotických preparátů patří např. příslušníci rodu *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*), *Enterococcus*, *Leuconostoc* nebo *Pediococcus*. Co se týče bifidobakterií, jako probiotikum jsou využívány např. druhy *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* (Ayichew et al. 2017).

Mechanismus působení probiotik spočívá v antimikrobiální aktivitě probiotických bakterií pomocí produkce kyselin a bakteriocinů (Bortlík 2009). Zejména kyselina octová a kyselina mléčná mají silný inhibiční účinek proti gramnegativním bakteriím. Specifické antibakteriální sloučeniny byly popsány pro několik kmenů rodu *Bifidobacterium*. Jednalo se o unikátní bakteriocin, bifidocin B, který je produkován bakterií *Bifidobacterium bifidum* a je aktivní vůči širokému spektru patogenních bakterií včetně *Salmonella enterica* ser. Typhimurium nebo *Escherichia coli* (Bermudez-Brito et al. 2012). Dalším mechanismem účinku probiotik je kompetice s patogenními kmeny o živiny (Sánchez et al. 2017).

Schopnost posílit epiteliální bariérovou funkci střev prostřednictvím probiotik je důležité pro ochranu organismu před patogeny z prostředí. Bariérová funkce je zajištěna pomocí slizniční vrstvy, antimikrobiálních peptidů, sekrečních IgA a především díky soudržnosti epiteliálních buněk a jejich tzv. těsným spojením (Bermudez-Brito et al. 2012). Při narušení těchto vzájemně se ovlivňujících funkcí mohou bakteriální antigeny dosahovat až submukózy střev a vyvolávat zánětlivé reakce (Bortlík 2009). Probiotické mikroorganismy jsou schopné blokování adhezních míst pro potenciální patogeny (Sánchez et al. 2017).

Probiotické mikroorganismy se vyznačují imunomodulačními účinky. Mají schopnost interagovat s epitelovými a dendritickými buňkami nebo makrofágy (Bermudez-Brito et al. 2012).

Díky velkému terapeutickému potenciálu probiotických preparátů jsou v současné době využívány ke zmírňování infekčních průjmů (u dětí často způsobeny rotaviry), tzv. cestovatelských průjmů (častým původcem *Escherichia coli*) nebo postantibiotických průjmů. Vzhledem k tomu, že probiotika mohou ovlivňovat jak mikrobiotu gastrointestinálního traktu, tak imunitní systém, jsou užívány pacienty se zánětlivými střevními onemocněními (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, pouchitida) a syndromem dráždivého tračníku (Sánchez et al. 2017).

3.1.4.2 Prebiotika pro bifidobakterie

Gibson et al. (2017) definují prebiotikum jako substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy, čímž je dosaženo zdravotních benefitů. Předchozí definice prebiotik byly limitovány pouze na spodní části gastrointestinálního traktu. Nová definice se záměrně vyhýbá upřesnění místa působení, lze zde tak zahrnout i další místa obsahující smíšený mikrobiom, tzn. urogenitální trakt nebo kůži.

Prebiotika určená pro gastrointestinální trakt musí být rezistentní vůči žaludečním kyselinám a zároveň nesmí podléhat hydrolyze prostřednictvím trávicích enzymů. Dalším kritériem je fermentace prebiotika intestinální mikrobiotou. Klíčová je však selektivní stimulace růstu a aktivity intestinálních bakterií poskytujících zdravotní benefity pro hostitele (Scott et al. 2019).

Užívání prebiotik může vést ke snížení prevalence a doby trvání průjmů, zlepšení integrity střevní stěny a uplatňují se rovněž v prevenci karcinomu tlustého střeva. Zlepšují biodostupnost minerálů, redukuje zvýšenou hladinu cholesterolu v krvi (Gibson et al. 2004) a mohou být přínosné i co se týče duševního zdraví prostřednictvím tvorby metabolitů ovlivňujících mozek a kognitivní funkce (Gibson et al. 2017).

Fermentací tohoto substrátu vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem, kyselina máselná, kyselina propionová, acetát, metan, růstové faktory a antioxidačně účinné látky. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou hlavním zdrojem energie kolonocytů, sehrávají tedy důležitou roli ve fyziologii a metabolismu trávicího traktu (Solař 2010). Ovlivňují tak proliferaci, diferenciaci a apoptózu střevních buněk, dále také tvorbu mucinu a metabolismus lipidů (Montalban-Arques et al. 2015).

V současné době v prebiotických preparátech dominují fruktany a galaktooligosacharidy (GOS). Do skupiny fruktanů řadíme inulin a fruktooligosacharidy (FOS), lineární polymery fruktózy spojené β (2 \rightarrow 1) vazbami (Davani-Davari et al. 2019). Co se týče galaktooligosacharidů, komerčně vyráběným produktem jsou β -galaktooligosacharidy, které vznikají transgalaktosylací účinkem enzymu β -galaktosidázy (Wilson & Whelan 2017). GOS vysoce podporují růst rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. V menší míře mohou stimulovat také růst bakterií *Enterobacteria* nebo *Firmicutes* (Davani-Davari et al. 2019).

Bakterie mají odlišnou specifitu k danému prebiotiku, které mohou využít. Specifické geny v rámci bakteriálního genomu určují produkci sacharolytických enzymů, které mohou bakterie produkovat a pomocí nich následně metabolizovat prebiotický substrát. U bifidobakterií byla zjištěna specifita pro β -galaktooligosacharidy. Bifidobakterie vykazují vyšší aktivitu β -galaktosidázy, sacharolytického enzymu pro trávení β -vázané galaktózy, než jiní členové střevní mikrobioty (Davani-Davari et al. 2019).

Jako možní kandidáti na prebiotika bývají uváděny také rezistentní škroby, pektin nebo laktulóza (Davani-Davari et al. 2019). Mezi další látky studované v souvislosti s prebiotickým účinkem patří xylooligosacharidy, mannanoligosacharidy a oligosacharidy mateřského mléka (HMOs) (Gibson et al. 2017).

Oligosacharidy mateřského mléka jsou zvláště důležité pro vývoj střevní mikrobioty a metabolických a imunitních systémů novorozenců. Přísun mateřského mléka obsahujícího tyto oligosacharidy zvyšuje podíl zástupců čeledi *Bifidobacteriaceae* a *Bacteroidaceae* v mikrobiotě. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* je jediným druhem rodu *Bifidobacterium*, který má schopnost degradace celého repertoáru těchto oligosacharidů. Ostatním příslušníkům rodu *Bifidobacterium*, převládajícím u dospělých (*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis*), chybí mnoho enzymů nezbytných k přímé a efektivní utilizaci HMOs (Gibson et al. 2017).

Vysoké zastoupení bifidobakterií v kojeneckém střevním mikrobiomu, především *B. bifidum* a *B. longum*, je v souladu se schopností těchto druhů využívat hostitelské oligosacharidy, jako jsou již zmíněné HMOs a mucin. Mucin je glykoprotein tvořící hlenovou

vrstvu, která pokrývá sliznici gastrointestinálního traktu (Montalban-Arques et al. 2015). Jádro mucinu i HMOs je tvořeno stejnými stavebními bloky (glukóza, galaktóza, N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin, fukóza a kyselina sialová), které jsou spojeny glykosidickými vazbami za účelem tvorby struktur, k jejichž degradaci je využívána podobná sada enzymů (kromě jiných β -hexosaminidáza, β -galaktosidáza a alfa-sialidasa). K bifidobakteriím se schopností využít hostitelské oligosacharidy patří *Bifidobacterium bifidum* (mucin i HMOs) a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (HMOs). Produkty degradace oligosacharidů mateřského mléka mohou být využitelné pro jiné bifidobakterie bez schopnosti přímé utilizace. Tato kooperace mezi bakteriemi tedy pravděpodobně formuje konkrétní složení mikrobioty kojenců (Bottacini et al. 2014).

Spojením prebiotik s probiotickými organismy byly vyvinuty synbiotika. Jejich cílem bylo zlepšit podmínky pro probiotické kmeny při průchodu trávicím traktem a touto kombinací maximálně posílit příznivé účinky probiotik a prebiotik. Probiotické kmeny využívané v synbiotických přípravcích zahrnují *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. nebo *Saccharomyces boulardii*. Často využívanými prebiotiky v případě synbiotik jsou fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, xylooligosacharidy, inulin (Pandey et al. 2015).

3.2 Identifikace a charakterizace bifidobakterií

Identifikace a charakterizace bifidobakterií je důležitá pro jejich odlišení od ostatních bakterií, které kolonizují trávicí trakt zvířat i lidí. Pro předběžnou identifikaci je využíváno fenotypových charakteristik bakterií. Biochemické testy, které bývají většinou časově náročné, jsou postupně nahrazovány metodami např. hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF, PCR nebo sekvenací genu pro 16S rRNA (Bunesova et al. 2017).

S rozvojem molekulárně-biologických metod získáváme spolehlivou a rychlou identifikaci jednotlivých druhů bifidobakterií a je nám umožněno studium jejich diverzity (Mekadim et al. 2019).

3.2.1 Fenotypové metody charakterizace bifidobakterií

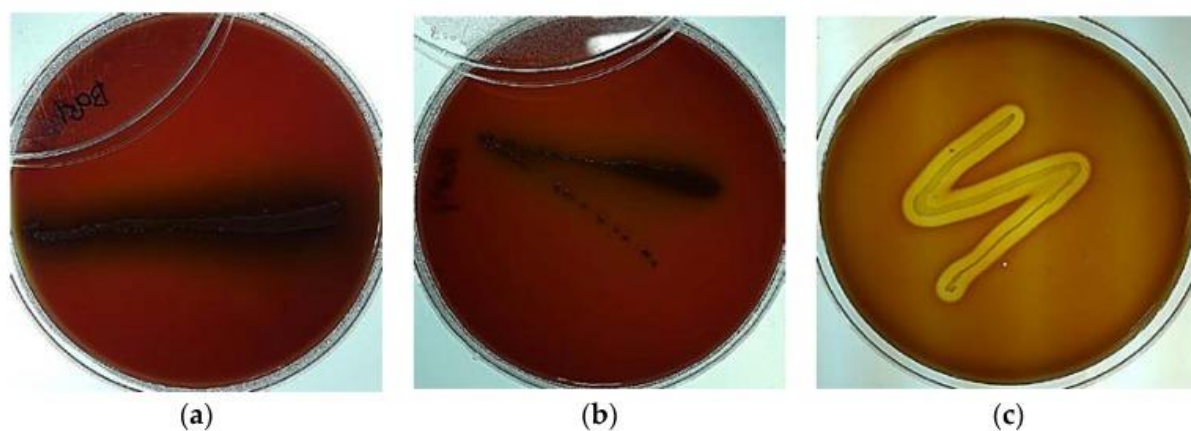
Tradičně bývá prvotní identifikace a charakterizace rodu *Bifidobacterium* založena na zhodnocení morfologie bakteriálních buněk, charakteristickém uskupení bakterií, velikosti či vzhledu kolonií. Metodou první volby identifikace na základě fenotypu bývá použití jednoduchých biochemických testů, pomocí kterých lze bakterii předběžně zařadit k příslušnému rodu. Je využíváno Gramova barvení, katalázového či hemolytického testu (Duranti et al. 2020). Dále jsou bifidobakterie charakterizovány na základě fermentačních testů a schopnosti využít sacharidové substráty. Základním biochemickým testem pro identifikaci bifidobakterií je průkaz fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy (F6PPK), enzymu uplatňujícího se při fermentaci sacharidů. Tento charakteristický enzym je využíván při rodové identifikaci bakterií, nicméně neumožňuje další mezidruhové rozlišení (Vlková & Rada 2013). Pro identifikaci/charakterizaci anaerobních bakterií je rovněž využíváno komerčně dostupných biochemických testů, např. ANAEROtest 23 (Erba Lachema, ČR) a API50 CHL (Biomériux, Francie) (Bunesova et al. 2017). Výrazným mezníkem v identifikaci je rovněž využití

hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Německo) (Modrackova et al. 2019).

3.2.1.1 Hemolytický test

Hodnocení hemolytických vlastností mikroorganismů je prováděno pomocí krevních agarů. Krevní agary kromě živné půdy obsahují 5–10% přídavek krve lidského nebo zvířecího původu (Kim et al. 2018).

Kmeny, u kterých není pozorována žádná změna krevního agaru (γ -hemolýza), jsou označovány za mikroorganismy bez hemolytické aktivity. Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou považovány za nehemolytické (Kim et al. 2018; Yasmin et al. 2020). Kmeny, které vytváří zelené až hnědé zóny kolem kolonií (α -hemolýza, viridace) mají schopnost částečné degradace, při které dochází k přeměně hemoglobinu na methemoglobin. I přes schopnost částečné hemolýzy označujeme tyto mikroorganismy stále jako nehemolytické a řadíme zde např. *Streptococcus pneumoniae*. Kmeny, u kterých jsou pozorovány zóny s lýzou červených krvinek (prosvětlené oblasti) označujeme jako mikroorganismy s hemolytickou aktivitou (β -hemolýza). Některé druhy bakterií produkují toxické vedlejší produkty se schopností lýzy červených krvinek. Typickou hemolytickou bakterií je např. *Streptococcus pyogenes*, produkující toxiny Streptolysin O a Streptolysin S (Buxton 2016). Na **Obrázku 1** je pro srovnání uvedena γ -hemolýza bifidobakterií a β -hemolytická *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii*.



Obrázek 1 Hemolytický test (a) *B. bifidum*, (b) *B. longum* (c) *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii*.

Převzato z: Kim et al. (2018)

3.2.1.2 Degradace mucinu

Důležitou součástí povrchu sliznice jsou buňky produkující mucin, které ovlivňují složení mikrobioty. U savců tuto funkci mají pohárkové a Panethovy buňky (Montalban-Arques et al. 2015).

Abe et al. (2010) uvádí, že glykoprotein mucin má nezastupitelnou funkci na povrchu střevní stěny, protože dokáže zabraňovat translokaci bakterií do extraintestinálních prostor.

B. bifidum je jediným bifidobakteriálním kmenem, který je schopný degradovat mucin a uvolňovat monosacharidy, které mohou být využity jinými střevními mikroorganismy (Bunesova et al. 2018). Schopnost degradovat mucin je také využívána v posuzování bezpečnosti probiotických kmenů (Abe et al. 2010).

3.2.2 MALDI-TOF MS

V posledním desetiletí laboratoře klinické mikrobiologie zažívají změny ve způsobu identifikace mikroorganismů. Standardní metody, kterými jsou mikroskopie, biochemická identifikace nebo stanovení fenotypových charakteristik, jsou postupně nahrazovány rychlou metodou identifikace – hmotnostní spektrometrií s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight). Metoda, která je dnes již rutinně používána, byla poprvé popsána v roce 1987 a poté oceněna Nobelovou cenou v roce 2002 (Clark et al. 2013). Původně byla hmotnostní spektrometrie využívána pro chemickou analýzu a určování molekulové hmotnosti peptidů a bílkovin, později byla přizpůsobena k identifikaci bakterií, kvasinek a hub izolovaných z různých klinických materiálů (Tran et al. 2015). Tato metoda provádí identifikaci pomocí porovnání hmotnostního spektra ribozomálních proteinů přítomných v dané buňce se spektry již umístěnými v databázi. Tato technologie tak umožňuje detekovat organismy z mikrobiálních kultur na rodové i druhové úrovni (Clark et al. 2013).

3.2.2.1 Výhody a nevýhody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

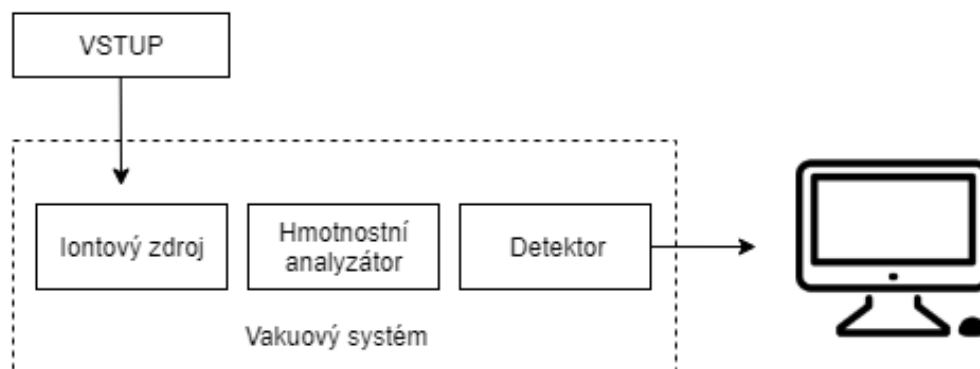
Výhodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF je vysoká rozlišovací schopnost a citlivost, kromě toho také snadné použití a vyhodnocení velkého množství vzorků během jednoho měření. Další předností metody je rychlost – během pár minut poskytuje spolehlivé výsledky. Tato technologie je aplikovatelná pro identifikaci širokého spektra mikroorganismů. Ačkoli je pořizovací cena hmotnostního spektrometru vysoká, a stejně tak i náklady na jeho údržbu, cenová náročnost testování jednotlivých izolátů je naopak velmi nízká. Přechod z tradičních metod určování mikroorganismů k MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii vede k značným úsporám v klinických laboratořích (Tran et al. 2015).

3.2.2.2 Princip hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejímž principem je rozdělení iontů a iontových fragmentů, které vznikají pomocí různých ionizačních technik v magnetickém či vysokofrekvenčním elektrickém poli. Ionizační techniky dělíme na měkké (např. ionizace elektrosprejem, laserem za účasti matrice, chemická ionizace) a tvrdé (elektronová ionizace). Vzniklé hmotnostní spektrum graficky znázorňuje četnost jednotlivých iontů na základě jejich poměru molekulové hmotnosti a počtu elementárních nábojů (m/z) (Julák 1998).

Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze čtyř základních částí (**Obrázek 2**) – místa vstupu analytu, iontového zdroje, iontového analyzátoru a detektoru. Proces analýzy probíhá

ve vakuu, aby se předešlo narušení průletu částic a vzniku sekundárních reakcí mezi ionty a molekulami. Nezbytnou součástí je počítač pro řízení přístroje a vyhodnocování dat (Julák 1998).



Obrázek 2 Schéma hmotnostního spektrometru

Hmotnostní analýza za použití měkké techniky MALDI spočívá v přidání matrice (organické kyseliny) k měřenému analytu. Analyt s matricí je poté ozařován UV laserovým paprskem obvykle o vlnové délce 337 nm. Ozařováním vzorku po krátkou dobu předcházíme poškození nebo degradaci vzorku (Clark et al. 2013). Základem je interakce mezi molekulami matrice a fotony laserového paprsku. Molekuly matrice absorbují energii z laserového paprsku, čímž dojde k přeměně matrice do plynné fáze a stává se tak zdrojem protonů pro ionizaci klinického materiálu (Julák 1998). Poté následuje rozdělení iontů v plynné fázi podle poměru m/z v hmotnostním analyzátoru. Pulzní ionizační technika MALDI spolupracuje s analyzátozem doby letu (time of flight), který vyžaduje současný vstup iontů do letové trubice a funguje na principu měření času, za který je iont schopen překonat dráhu od iontového zdroje k iontovému detektoru. Čas průletu závisí na poměru m/z , přičemž velké ionty urazí dráhu od iontového zdroje k detektoru za delší dobu, menší naopak letí rychleji. Úlohou detektoru je zachycení separovaných iontů a určení jejich intenzity (Clark et al. 2013).

3.2.2.3 Vyhodnocení výsledků, ID skóre

Informace jsou sbírány prostřednictvím speciálně vyvinutého softwaru. Základem je porovnání podobnosti naměřeného profilu neznámého mikroorganismu s profily již známých kmenů uložených v referenční knihovně spekter (Bruker Daltonik 2016).

Spektrum neznámého vzorku je nejprve převedeno na seznam píků. Za pomoci biostatistického algoritmu je tento seznam píků porovnáván s referenčními seznamy píků mikroorganismů v databázi referenční knihovny. Nakonec je vygenerována hodnota log (skóre) z intervalu 0,000 až 3,000 (**Tabulka 3**). Čím vyšší hodnota log (skóre) je, tím vyšší je míra podobnosti neznámého seznamu píků se seznamem píků uvedeným v databázi referenční knihovny. Skóre s hodnotou, která není nižší než 2,000 lze považovat za příznak přijatelné pravděpodobnosti identifikace vzorku na druhové úrovni. V případě, že je skóre analýzy nižší

než 2,000, je možné vzorky zpracovat alternativním postupem přípravy a analýzu opakovat (Bruker Daltonik 2016).

Výsledné identifikační skóre znázorňuje míru pravděpodobnosti správné identifikace daného mikroorganismu. Konečné vyhodnocení a přezkoumání výsledků provádí zkušený klinický mikrobiolog. Při pochybnostech odečítající určuje závěrečnou identifikaci mikroorganismu s ohledem na všechny dostupné údaje o vzorku nebo pacientovi.

Tabulka 3 Význam hodnot identifikačního skóre

Rozsah	Interpretace	Symboly	Barva
2,00 - 3,00	Identifikace s vysokou mírou jistoty	(+++)	Zelená
1,70 - 1,99	Identifikace s nízkou mírou jistoty	(+)	Žlutá
0,00 - 1,69	Nelze identifikovat	(-)	Červená

3.2.3 Genotypové metody charakterizace bifidobakterií

Rozvoj molekulárně-biologických metod přináší nejen spolehlivou identifikaci mikroorganismů, ale také podrobné studium evoluční příbuznosti bakterií. Mezi první molekulárně-biologické metody patří DNA-DNA hybridizace, sekvenční analýza genu pro 16S rDNA nebo hybridizace se specifickou sondou (Ward & Roy 2005).

Tyto metody se zabývají analýzou nukleových kyselin. Většina z molekulárně-genetických metod je založena na principu polymerázové řetězové reakce (PCR) a znalosti genomu detekované bakterie. Proto jsou v této analýze využívány ty části genomu, které jsou pro daný mikroorganismus charakteristické (Demnerová 2012).

V posledních letech se využívá stále častěji metoda multilokusové sekvenční typizace (Multilocus sequence typing, MLST). Tato metoda je vhodným taxonomickým nástrojem. Ale i tato metoda vychází z celogenomových dat. Kdy právě sekvenace celého genomu bifidobakterií je vrcholnou metodou samotné identifikace a charakterizace.

3.2.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction) byla vyvinuta Kary B. Mullisem v Cetus Corporation v Kalifornii roku 1983 (Mullis 1990). Zavedením této metody bylo umožněno enzymatické zmnožení DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA (Bartuňková & Paulík 2011).

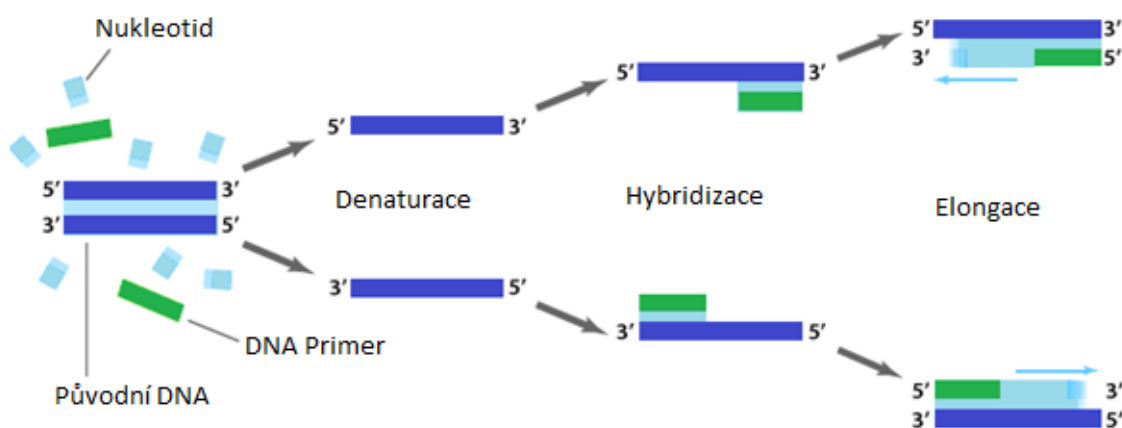
3.2.3.1.1 Princip amplifikační reakce

Polymerázová řetězová reakce spočívá ve schopnosti dvojvláknové DNA denaturovat při vysokých teplotách a následně zpět renaturovat po teplotním snížení při zachování pravidla komplementarity bází. Pomocí PCR je tak možno amplifikovat vybraný úsek DNA, u něhož jsou známy nukleotidové sekvence na koncích určité oblasti DNA (Bartuňková & Paulík 2011).

Analyzované úseky DNA, které mají být namnoženy, jsou na obou dvou koncích vymezeny připojením tzv. primerů. Podstatou reakce je tedy cyklicky se opakující syntéza nových řetězců zvolených úseků dvouřetězcové DNA pomocí enzymu DNA-polymerázy (Šmarda et al. 2005). PCR je automatizovaný proces a probíhá v zařízení zvaném termocykler. Amplifikace DNA probíhá ve třech opakujících se krocích:

3. Denaturace, při které dochází k oddělení jednotlivých vláken DNA templátu (matrice), která je důležitá pro následnou hybridizaci primerů. Probíhá při teplotě okolo 95 °C (Čikoš et al. 2001).
4. Hybridizace (annealing) primerů k již denaturovanému templátu DNA, uplatňují se zde vodíkové vazby mezi komplementárními bázemi (adenin – guanin, cytosin – thymin). Dochází tedy k nasednutí primerů na oddělené řetězce DNA. Optimální teplota pro hybridizaci se pohybuje mezi 40–72 °C a odvíjí se od délky a sekvence primerů (Čikoš et al. 2001). Primery po hybridizaci slouží jako základ pro syntézu nových vláken (Bartuňková & Paulík 2011).
5. Elongace (extenze) DNA je katalyzována termostabilním enzymem Taq DNA polymerázou a v této fázi probíhá syntéza nových vláken. Pomocí tohoto enzymu dochází k prodlužování vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od 5' konce ke 3' konci. Elongace probíhá obvykle při 72 °C, což je optimální teplota pro aktivitu Taq polymerázy (Bartuňková & Paulík 2011).

Tato cyklicky se opakující reakce vede k velmi rychlému namnožení cílové sekvence DNA. Po dokončení každého cyklu dochází ke znásobení počtu kopií úseku mezi nasedlými primery. Počet kopií požadované sekvence DNA tedy roste logaritmicky, zatímco ostatní úseky výchozí DNA se neamplifikují (Bartuňková & Paulík 2011). Průběh PCR reakce je znázorněn na **Obrázku 3**.



Obrázek 3 Průběh PCR reakce

Převzato a upraveno z: <https://www.xxpresspcr.com/all-news/polymerase-chain-reaction-the-past-present-and-future/#post/0>

3.2.3.1.2 Reakční složky PCR

- Vzorek DNA – templát, který obsahuje zkoumaný úsek DNA. Získává se pomocí izolace.
- Primery – dva syntetické oligonukleotidy, které ohraničují úsek DNA, který se má amplifikovat. Sestávají obvykle z 20-25 nukleotidů (Čikoš et al. 2001).
- Taq polymeráza – termostabilní enzym, který bývá izolován z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, žijící v horkých pramenech. Tato bakterie má schopnost odolávat teplotám, při nichž DNA denaturuje. Uchovává si tak enzymatickou aktivitu i po opakovaném zahřátí. Tato skutečnost umožňuje opakovaný průběh PCR reakce v cyklech (Čikoš et al. 2001).
- Směs nukleotidů (dNTP) – deoxynukleosidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Mg²⁺ ionty
- PCR pufr – udržuje stabilní pH a vytváří optimální prostředí pro aktivitu DNA polymerázy
- PCR voda

3.2.3.1.3 Detekce a vizualizace PCR produktu

Produkty polymerázové řetězové reakce jsou detekovány po obarvení látkou, která má schopnost fluoreskovat pod UV zářením. Využíván je například ethidium bromid, SYBR green nebo GelRed. Produkty jsou po obarvení elektroforeticky separovány v agarózovém, případně polyakrylamidovém gelu (Demnerová 2012).

Elektroforéza využívá odlišné pohyblivosti molekul, která je dána jejich rozdílnou velikostí. Velikost jednotlivých DNA fragmentů PCR reakce je porovnávána pomocí standardu, který obsahuje fragmenty DNA o známé velikosti. V jedné dráze gelu je vložen standard, do vedlejších drah pak ukončená PCR reakce a oba vzorky následně putují v gelu. Jednotlivé fragmenty se na gelu uspořádají podle svých velikostí (délek) (Čikoš et al. 2001). Po ukončení elektroforézy je gel přesunut do UV komory a dochází k vizualizaci produktů pomocí UV záření. Výsledné fragmenty DNA pozorujeme v podobě různě ostrých a velkých proužků (bandů) na gelu.

3.2.3.2 Rodově a druhově specifická PCR

Identifikace bifidobakterií na rodové či druhové úrovni může být dosaženo pomocí cílených rodově a druhově specifických PCR primerů. PCR se specifickými oligonukleotidovými primery představuje rychlou, přesnou a citlivou metodu. V **Tabulce 4** jsou uvedeny využívané rodově a druhově specifické primery pro rod *Bifidobacterium*. Většina z nich je navržena na základě sekvencí 16S rDNA. Na základě toho, jaká je vybrána cílená sekvence, mohou být specifické primery použity k detekci bakterií na různých fylogenetických úrovních (Matsuki et al. 2003).

Tabulka 4 Rodově a druhově specifické primery užívané pro identifikaci bifidobakterií

Cílová bifidobakterie	Názvy primerů	Sekvence	Velikost produktu (bp)	Reference
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F g-Bifid-R	CTCCTGGAAACGGGTGG GGTGTTCCTCCCGATATCTACA	549-563	Matsuki et al., 2002
<i>Bifidobacterium</i>	Bif164-PCR Bif662-PCR	GGGTGGTAATGCCGGATG CCACCGTTACACCGGGAA	523	Kok et al., 1996
<i>Bifidobacterium</i>	lm26 Lm3r	GATTCTGGCTCAGGATGAACG CGGGTGCTICCCACTTTCATG	1.35k	Kaufmann et al., 1997
<i>B. adolescentis</i>	BiADO-1 BiADO-2	CTCCAGTTGGATGCATGTC CGAAGCCTTGCTCCCACT	279	Matsuki et al., 1998
<i>B. angulatum</i>	BiANG-1 BiANG-2	CAGTCCATCGCATGGTGGT GAAGGCTTGCTCCCAAC	275	Matsuki et al., 1998
<i>B. bifidum</i>	BiBIF-1 BiBIF-2	CCACATGATCGCATGTGATTG CCGAAGGCTTGCTCCCAA	278	Matsuki et al., 1998
<i>B. breve</i>	BiBRE-1 BiBRE-2	CCGGATGCTCCATCACAC ACAAAGTGCCTTGCTCCCT	288	Matsuki et al., 1998
<i>B. catenulatum</i>	BiCATg-1 BiCATg-2	CGGATGCTCCGACTCCT CGAAGCCTTGCTCCCGAT	285	Matsuki et al., 1998
<i>B. longum</i>	BiLON-1 BiLON-2	TTCCAGTTGATCGCATGGTC TCSCGCTTGCTCCCGAT	277	Matsuki et al., 1998
<i>B. longum</i>	BiLON-1 BiLON-2	TTCCAGTTGATCGCATGGTC GGGAAGCCGTATCTCTACGA	831	Matsuki et al., 1999
<i>B. infantis</i>	BiINF-1 BiINF-2	TTCCAGTTGATCGCATGGTC GGAAACCCCATCTCTGGGAT	828	Matsuki et al., 1999
<i>B. dentium</i>	BiDEN-1 BiDEN-2	ATCCCGGGGGTTCGCCT GAAGGCTTGCTCCCGA	387	Matsuki et al., 1999
<i>B. gallicum</i>	BiGAL-1 BiGAL-2	TAATACCGGATGTTCCGCTC ACATCCCCGAAAGGACGC	303	Matsuki et al., 1999
<i>B. lactis</i>	Bflac2 Bflac5	GTGGAGACACGGTTTCCC CACACCACACAATCCAATAC	680	Ventura et al., 2001
<i>B. breve</i>	BreU3 BreL4	CTCCAGCTCGACTGTTCGC GCACCTTGTGTTGAGTGACCTTTCG	811	Roy et al., 1996
<i>B. infantis</i>	InfU5 InfU6	CCATCTCTGGGATCGTCCG TATCGGGGAGCAAGCGTGA	565	Roy et al., 1996
<i>B. longum</i>	LonU7 LonL8	GCCGTATCTCTACGACCGTCCG TATCGGGGAGCAAGCGAGAG	567	Roy et al., 1996
<i>B. adolescentis</i>	BIA-1 BIA-2	GGAAAGATTCTATCGGTATGG CTCCAGTCAAAAGCGGTT	244	Wang et al., 1996
<i>B. longum</i>	BIL-1 BIL-2	GTTCCCGACGGTCGTAGAG GTGAGTTCGGGCATAATCC	153	Wang et al., 1996
<i>B. breve</i>	L Bre-BV.R	GCTGGATCACCTCCTTCT GCAAGAACGAGGAATCAAAGG	350	Brigidi et al., 2000
<i>B. bifidum</i>	PBI245f	GCTTGTGGTGAGGTAACGGCT	1180	Dong et al., 2000
<i>B. breve</i>	PBR442f	AGGGAGCAAGGCACTTTGTGT	991	Dong et al., 2000
<i>B. infantis</i>	PIN710f	CTGTTACTGACGCTGAGGAGCT	723	Dong et al., 2000

<i>B. adolescentis</i>	PAD805f	GTGGGGACCATTCCACGGTC	628	Dong et al., 2000
<i>B. longum</i>	PLO965f	TCCCGACGGTCGTAGAGATAC	467	Dong et al., 2000

Převzato a upraveno z: Matsuki et al. (2003)

3.2.3.3 16S rRNA

Další genetickou metodou, díky které je dosaženo spolehlivé identifikace bakterií, je stanovení nukleotidové sekvence genu kódujícího 16S podjednotku ribosomální RNA. Genové sekvence 16S rRNA jsou hojně využívány zejména díky jejich přítomnosti u téměř všech bakterií. Gen pro 16S rRNA obsahuje velice konzervované regiony, ale zároveň i oblasti variabilní a typické pro daný druh bakterií (Ward & Roy 2005).

16S rRNA gen slouží ke studiu možné evoluční příbuznosti druhů a tvorbě fylogenetických stromů. Největší uplatnění nachází u bakterií, které na základě jiných metod nelze s jistotou zařadit nebo neodpovídají žádným známým biochemickým profilům bakterií (Janda & Abbott 2007).

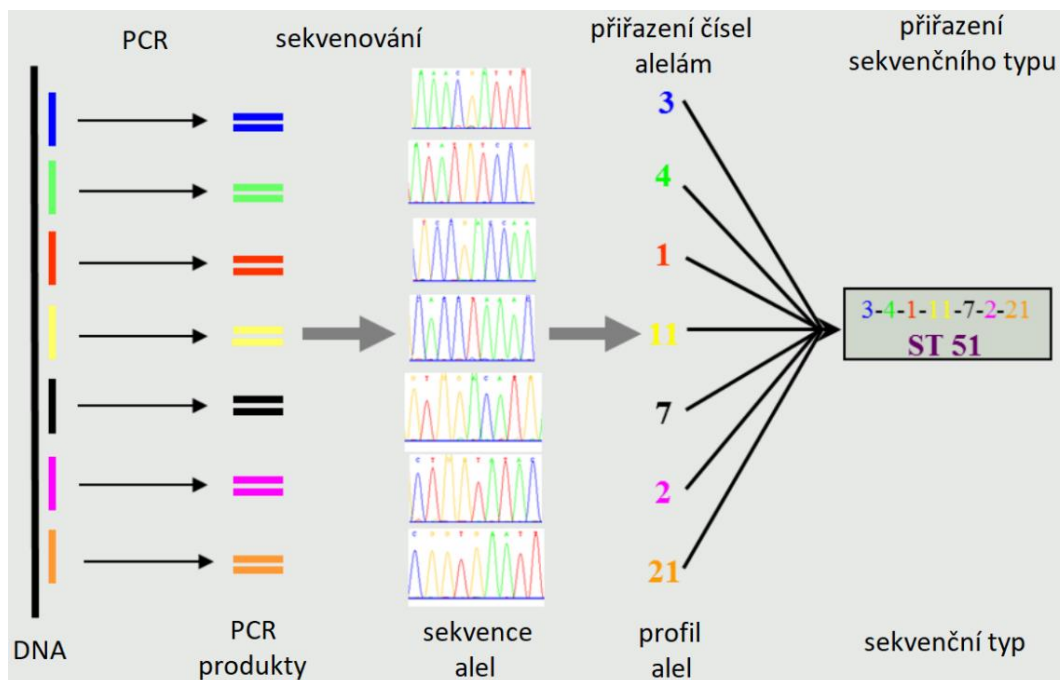
3.2.3.4 Multilokusová sekvenční typizace (MLST)

Metoda multilokusové sekvenční typizace byla vyvinuta v roce 1998 (Maiden 1998). Vůbec první MLST schéma bylo vytvořeno pro gram-negativní bakterii *Neisseria meningitidis*. Pomocí metody je možné odhalit alelické varianty v konzervovaných genech (Li et al. 2009) a hodnotit tak genetickou příbuznost kmenů bakterií a hub v rámci druhu (Robles et al. 2004). MLST je založena na amplifikaci a následném sekvenování fragmentů DNA (Maiden et al. 1998). Využívá se převážně sedmi tzv. provozních genů (z angl. housekeeping genes) (Urwin et al. 2003). Pro genotypizaci a fylogenetickou analýzu čeledi *Bifidobacteriaceae* může být například využíváno genů *glyS*, *pheS*, *rpsA* a *rpsB* (Mekadim et al. 2019). Avšak gen kódující CTP syntázu (*pyrG*) byl určen jako specifický pro klasifikaci a fylogenetickou analýzu celé čeledi *Bifidobacteriaceae*. Dalším možným markerem je i gen kódující glutamin syntetázu typu I (*glnAI*) (Killer et al. 2019).

Typicky jsou sekvenovány fragmenty o délce 450–500 bp (Li et al. 2009). Pro každý lokus genu je určen sekvenční typ. Každé unikátní sekvenci jsou přiřazena náhodná čísla, kombinací čísel alel v sedmi genech vznikají alelické profily a těm je pak určen sekvenční typ (Delétoile et al. 2010). Schéma postupu je na **Obrázku 4**.

MLST byla navržena tak, aby bylo možné analyzovat a porovnávat genetickou příbuznost prostřednictvím centrálních databází (Abdelbary et al. 2017). V těchto online databázích jsou ukládány DNA sekvence a sekvenční typy, což umožňuje jednoduchou výměnu informací o typizovaných kmenech mezi laboratořemi (Li et al. 2009). Výhodou metody je, že získaná data jsou vysoce reprodukovatelná a také srozumitelná díky mezinárodně uznávané nomenklatuře (Sabat et al. 2013). Rovněž se multilokusová sekvenční typizace stala velice

populárním nástrojem pro provádění globálních epidemiologických studií a studium vývoje patogenů na molekulární úrovni v různých geografických oblastech (Chui et al. 2015).



Obrázek 4 Schéma MLST

Převzato z Nykrýnová (2018)

3.2.3.5 Fingerprintové metody

Fingerprintové metody slouží k identifikaci a hodnocení genetické diverzity mikroorganismů (Mitchelson & Moricca 2008). Výsledkem těchto metod jsou profily konkrétních mikroorganismů, tzv. fingerprinty nukleových kyselin (otisky). Pomocí fingerprintů lze porovnávat skupiny mikroorganismů mezi sebou a prokazovat tak jejich genetickou příbuznost (Balouet et al. 2007). Mezi fingerprintové metody řadíme RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA PCR), REP-PCR (Repetitive element sequence-based PCR), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) nebo PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) (Mitchelson & Moricca 2008).

3.2.3.5.1 RAPD-PCR

Metoda náhodně amplifikované polymorfni DNA (RAPD-PCR) byla poprvé popsána v roce 1990 Williamsem, Welshem a McClellandem (Rocco et al. 2014). Tato metoda založená na PCR reakci využívá primeru, u kterého není vyžadována předchozí znalost konkrétních cílových oblastí DNA (Felbinger et al. 2020). Jedná se o krátké primery (10 nukleotidů) a v každé reakci je využíván pouze jeden primer (Ward & Roy 2005). Pro tyto krátké primery probíhá hybridizace s templátovou DNA za nižší teploty oproti klasické PCR, a to kolem 35 °C (Felbinger et al. 2020).

Amplifikací neznámých sekvencí DNA technikou RAPD-PCR získáváme polymorfni fragmenty. Takto získaný polymorfizmus slouží jako genetický marker a má velmi široké

využití v mnoha oblastech (Rocco et al. 2014). Nejčastěji je RAPD technika aplikována pro analýzu genetické příbuznosti v rámci sledované skupiny genotypů, křížení rostlin a zvířat nebo vývoj genetických vazebných map (Bardakci 2001). Metoda RAPD-PCR je vhodná pro charakterizaci bifidobakterií. Křížová et al. (2008) identifikovali a charakterizovali různé izoláty rodu *Bifidobacterium* s primery P2, P15, P16, P17, PER1, CC1, CORR1. Bunesova et al. (2017) využili metodu RAPD-PCR pro prozkoumání genotypové a fenotypové variability mezi kmeny *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* izolovaných z různých hostitelů za využití primerů 103, 173, OPR-13, OPV-07, OPV-08.

3.2.3.5.2 REP-PCR

PCR založené na repetitivních sekvencích (REP-PCR) je další metodou, díky které získáváme fingerprinty DNA. REP-PCR spočívá ve zmnožení úseků ohraničených repetitivními sekvencemi. V této reakci je nejčastěji využíváno tří různých primerů. Primer BOX (původně byl popsán u *Streptococcus pneumoniae*), ERIC (původně byl popsán u *Salmonella typhimurium*) a REP (původně byl popsán u *Escherichia coli*) (Ward & Roy 2005).

V současnosti je v některých studiích využíváno primerů BOX a ERIC pro charakterizaci rodu *Bifidobacterium*. Pomocí primeru ERIC je možné rozlišit pět druhů rodu *Bifidobacterium* (*B. pseudocatetulum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. animalis* a *B. indicum*). Odlišit bifidobakterie je možné i s využitím primeru BOX, a to konkrétně druhy *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* a *B. adolescentis* (Ward & Roy 2005). Při charakterizaci bifidobakterií lze provést REP-PCR např. s využitím primeru (GTG)₅ a BOXA1R (Křížová et al. 2008).

3.2.3.6 Sekvenování DNA

Metody sekvenování slouží ke stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA (Sanger et al. 1977). V 70. letech minulého století došlo k revolučnímu objevu sekvenačních metod. Původní metody (tzv. první generace) byly popsány M. Gilbertem a F. Sangerem, kteří svým objevem rozšířili možnosti genetického výzkumu (Ahmadian et al. 2006). Sangerova sekvenace, tzv. enzymatická metoda, je založena na využívání specifických vlastností enzymu DNA polymerázy při syntéze nového řetězce (Koubková et al. 2014). Sangerovo sekvenování bylo časově náročné a pracné, proto významným pokrokem bylo zavedení prvního automatického sekvenátoru (Liu et al. 2012). Automatický sekvenátor využívá kapilární elektroforézu k separaci jednotlivých úseků DNA (Koubková et al. 2014). Metoda se tak díky automatizaci stala rychlejší a přesnější (Liu et al. 2012).

Později byla tato metoda využita k sekvenaci lidského genomu (Human Genome Project), která trvala více než 10 let (Liu et al. 2012). Díky tohoto projektu bylo poukázáno na limity metody (vysoká cena, pracnost) a zároveň vyjádřena potřeba nových technologií, které by se vyznačovaly vyšší výkonností, přesností i nižšími náklady (Koubková et al. 2014).

Díky sekvenování druhé generace (Next-Generation sequencing) je dosaženo masivního paralelního sekvenování až tisíců molekul DNA současně. Zároveň dochází ke snížení času, který je nutný k přečtení dlouhých DNA sekvencí. Ačkoli se techniky sekvenace druhé generace odlišují způsobem fragmentace DNA, všechny jsou založeny na základní krocích, kterými jsou: příprava templátu neboli vytvoření knihovny ampliconů, sekvenování a detekce

inkorporovaných nukleotidů a analýza dat (Koubková et al. 2014). Mezi nejdůležitější platformy sekvenování druhé generace patří: System Roche 454, Illumina Genome Analyzer a AB SOLiD System (Liu et al. 2012).

S rostoucím využíváním sekvenování se objevují další modifikace a nové přístupy. Technologie single-molecule sekvenování, tedy sekvenace jediné molekuly DNA, se vyznačuje několika inovacemi. Před sekvenací není potřeba amplifikačního kroku, což zkracuje dobu přípravy DNA a snižuje chybovost pramenící z amplifikace DNA. Výhodou je také snížení nákladů, vyšší flexibilita v délce čtení a přesná kvantifikace DNA díky zaznamenávání signálu v reálném čase (Koubková et al. 2014). Příkladem těchto technologií, někdy označovaných jako technologie třetí generace, je tzv. metoda SMRT (single-molecule real-time) vyvinutá společností Pacific Bioscience či sekvenace využívající nanopórů (Liu et al. 2012).

Technologie sekvenování nové generace našly uplatnění zejména v oblasti genetiky, biologie, mikrobiologie, medicíny, forenzní analýzy nebo zemědělství. Se zlepšováním rychlosti a výkonnosti metod jsou sekvenační technologie využívány např. při celogenomovém sekvenování, resekvenování, exonovém sekvenování, detekci mutací a polymorfismů nebo v metagenomice (Kulski 2016).

3.2.3.7 Celogenomová sekvenace

Pomocí celogenomových sekvenačních technologií je dosaženo výrazného zlepšení diskriminační schopnosti při studiu genomu bakterií (Abdelbary et al. 2017). Sekvenování kompletního genomu a srovnávání genomů jednotlivých kmenů umožňuje určit odlišnosti, nebo naopak podobnosti mezi kmeny a objevovat unikátní funkce genů. Díky analýze genomu jsou nám dostupné informace o vlastnostech mikroorganismu, jeho metabolických funkcích, fyziologii, biochemických vlastnostech a schopnostech adaptace na měnící se podmínky a různá prostředí (Klaenhammer et al. 2005).

Celogenomové sekvenování zahrnuje dva přístupy, a to *de novo* sekvenování a tzv. resekvenování. Při resekvenování využíváme referenčních sekvencí, na které se nové sekvence zpětně mapují (Koubková et al. 2014).

Velice využívanou technologií pro sekvenaci celého genomu bakterií je PacBio singlemolecule real-time (SMRT). Tuto technologii využil Chenoll et al. (2015) pro kompletní sekvenaci genomu *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210, nebo Kang et al. (2017) pro *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL3.

Huang et al. (2020) prováděli kompletní genomovou sekvenaci u kmene *Bifidobacterium longum* LTBL16, potenciálního probiotického kmene se silnou antioxidační aktivitou. Pomocí této technologie získali informaci, že genom *B. longum* LTBL16 je genomem bez plazmidu, s kruhovým chromozomem (2,430,682 bp), GC obsah 61,23 %, což bylo podobné ostatním kmenům *B. longum*. Za zmínku stojí, že při této analýze byly zjištěny dva proteiny kódující geny (LTBL16-GM001233, LTBL16-GM1234), které nebyly nalezeny u ostatních kmenů *B. longum*. LTBL16-GM001233 je funkční gen s aktivitou methyltransferázy, zatímco funkce LTBL16-GM1234 není známa a vyžaduje další studium. Na základě sekvenování lze taktéž konstruovat tzv. fylogenetické stromy pro zhodnocení evoluční vzdálenosti a vztahů mezi jednotlivými druhy rodu *Bifidobacterium* (Huang et al. 2020).

4 Metodická část

4.1 Příprava kultur pro testování

Pro tuto diplomovou práci bylo vybráno celkem 27 sbírkových kmenů, které poskytla Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU. Jednalo se o 20 kmenů *Bifidobacterium dentium* a 3 kmeny *Bifidobacterium bifidum*. Mezi divokými kmeny bifidobakterií byly zařazeny oficiální typové/ sbírkové kmeny *B. dentium* DSM 20436, *B. bifidum* DSM 20456, DMS 20215, DMS 20239. Druhy *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae* LMG 15088, *Streptococcus thermophilus* MILCOM 55 byly použity jako kontroly pro vybrané fenotypové testy.

Kmeny byly původně izolovány zejména ze stolice primátů, dále pak z člověka, zubního kazu nebo kysaného mléčného výrobku. Přehled kmenů vybraných pro testování je uveden v **Tabulce 5**.

Tabulka 5 Přehled testovaných mikroorganismů

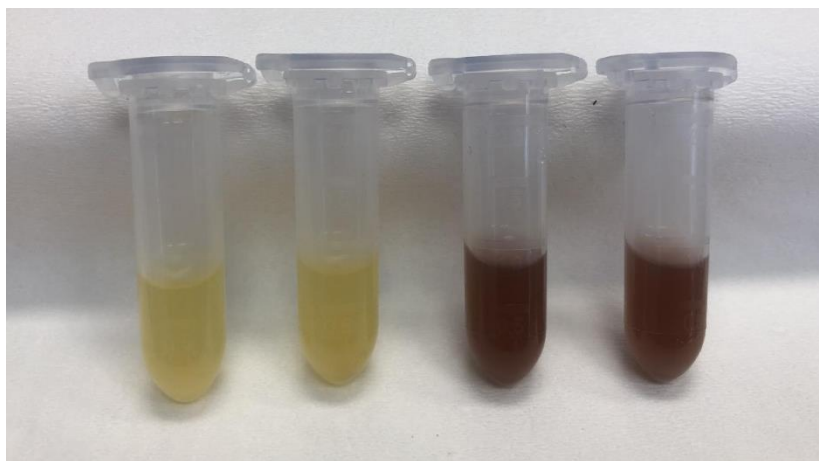
Číslo vzorku	Označení kmene	Identifikace	Izolováno ze stolice/ fekálního vzorku
1	N5	<i>B. dentium</i>	šimpanz
2	N12	<i>B. dentium</i>	makak lví
3	N21	<i>B. dentium</i>	šimpanz
4	N23	<i>B. dentium</i>	šimpanz
5	N26	<i>B. dentium</i>	šimpanz
6	N77	<i>B. dentium</i>	makak lví
7	N79	<i>B. dentium</i>	pavián pláštík
8	N103	<i>B. dentium</i>	šimpanz
9	N105	<i>B. dentium</i>	šimpanz
10	N109	<i>B. dentium</i>	šimpanz
11	N110	<i>B. dentium</i>	šimpanz
12	N111	<i>B. dentium</i>	šimpanz
13	N112	<i>B. dentium</i>	šimpanz
14	N122	<i>B. dentium</i>	šimpanz
15	TH1	<i>B. dentium</i>	kojenec
16	FD1	<i>B. dentium</i>	kojenec
17	VOK II.	<i>B. dentium</i>	kojenec
18	A1/5A	<i>B. dentium</i>	dítě – Crohnova choroba
19	028	<i>B. dentium</i>	dítě
20	DSM 20436	<i>B. dentium</i>	zubní kaz
21	DSM 20215	<i>B. bifidum</i>	dospělý člověk
22	DSM 20239	<i>B. bifidum</i>	kojenec
23	DSM 20456	<i>B. bifidum</i>	kojenec
24	MILCOM 55	<i>Strep. thermophilus</i>	kysaný mléčný výrobek
25	LMG 15088	<i>Strep. agalactiae</i>	vaginální vzorek
26	N47	<i>Strep. salivarius</i>	tamarín bělovousý
27	N49	<i>Staph. warneri</i>	tamarín sedlový

Den před testováním byly vybrané kmeny bifidobakterií (0,4 ml ze zamraženého zásobního roztoku) přeočkovány do tekutého anaerobního živného bujonu Wilkins-Chalgren (Oxoid) doplněného o sójový pepton (5 g/l), L-cystein (0,5 g/l), tween 80 (1 ml/l). Následně byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Nárůst kultury se projevil zákalem v kultivačním médiu.

Pro spolehlivé výsledky jednotlivých testů je nutné pracovat pouze s čistými kulturami. Před každým testováním proto byla vždy zkontrolována čistota kultur pomocí fázově kontrastního mikroskopu (Nikon Eclipse E 200LED MV RS, Japan).

4.2 F6PPK test

Bifidobakterie štěpí hexózy pomocí enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy (F6PPK), jehož detekci je umožněna jejich spolehlivá identifikace na rodovou úroveň. Pro detekci F6PPK je nutné narušení bakteriální buňky (cetrídium bromid) a vylití jejího obsahu včetně intracelulárních enzymů do roztoku a použití dalších činidel pro výslednou případnou barevnou reakci. Pokud je fruktózo-6-fosfát štěpen tímto enzymem na erytroso-4-fosfát a acetyl-1-fosfát, který následně reaguje s FeCl_3 , vzniká komplexní sloučenina fialové barvy značící pozitivní reakci (Vlková & Rada 2013). V případě negativní reakce dochází ke žlutému zbarvení. Pro ověření správnosti provedení testu je žádoucí současně testovat i pozitivní (např. rod *Bifidobacterium*) a negativní kontroly (např. rod *Streptococcus*) viz **Obrázek č. 5**.



Obrázek 5 F6PPK test (autor Štivarová)

Po kultivaci v anaerobních podmínkách bylo odebráno 1,5 ml čerstvě narostlé kultury. Vzorky byly stáčeny po dobu 2 a půl minut při 14 500 otáčkách. Po odstředění došlo k separaci vzorku na pelet (usazená část bakteriální kultury na dně zkumavky) a supernatant. Pelety byly resuspendovány v 75 μl bifipufu (0,12 g K_2HPO_4 , 0,33 g KH_2PO_4 , 0,05 g cystein, 100 ml H_2O) a poté bylo přidáno 50 μl roztoku CTAB (detergent cetrídium bromid), následovalo vortexování a 5minutová inkubace při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 31 μl roztoku 2 (roztok NaF 0,6 g/100 ml H_2O , Na-iodoacetát 1 g/100 ml H_2O) a 50 μl roztoku 7 (fruktózo-6-fosfát – substrát

pro působení enzymu, 1 dávka 6,6 mg/0,2 ml H₂O). Po 30minutové inkubaci při teplotě 37 °C bylo do směsi dodáno 188 µl roztoku 3 (roztok hydroxylaminu 13,9 g/100 ml H₂O, pH 6,5 NaOH). Směs byla inkubována po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Posledním krokem bylo postupné přidání 125 µl roztoků 4 (15% roztok TCA), 5 (4M HCl) a 6 (roztok FeCl₃ 5 g/100 ml H₂O, + 310 µl HCl). Bezprostředně po přidání posledních roztoků lze pozorovat výsledné zbarvení (Vlková & Rada 2013).

4.3 Katalázový test

Enzym kataláza slouží k rozkladu peroxidu vodíku, který vzniká jako produkt katabolismu bakterií. Tento enzym se uplatňuje zejména u aerobních mikroorganismů. Přítomnost enzymu katalázy u daného mikroorganismu se projevuje tvorbou plynu, kdy dochází k rozkladu peroxidu vodíku na kyslík a vodu (pozitivní reakce). V případě negativní reakce k tvorbě plynu nedochází (Vlková & Rada 2013).

1 ml čerstvě narostlé kultury byl centrifugován po dobu 2 a půl minuty při 14 500 otáčkách. Po odstředění byl slit supernatant a k peletu přidána kapka 3% peroxidu vodíku a sledována tvorba plynu. Jako kontrola byl použit *Staphylococcus warneri* (pozitivní) a *Streptococcus salivarius* (negativní) viz **Obrázek č. 6**.



Obrázek 6 Katalázový test, vlevo – negativní reakce, vpravo – pozitivní reakce (autor Štivarová)

4.4 Utilizace mucinu

Test se používá pro zjištění schopnosti bakterií degradovat mucin a využívat ho jako zdroj uhlíku.

Množství 0,4 ml čerstvě narostlé kultury bylo inokulováno do média se složením: trypton (5 g/l), pepton (5 g/l), kvasniční extrakt (2,5 g/l), tween 80 (1 ml/l), cystein-hydrochlorid (0,25 g/l), mucin (20 g/l) a bromokresolová violet' (0,01 g/l) (Pechar et al. 2014). Následovala kultivace při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. V případě schopnosti využít daný substrát,

byla detekována změna barvy média (z fialové na žlutou) v důsledku tvorby mastných kyselin a laktátu s následným poklesem pH. Při negativní reakci nedocházelo k žádné barevné změně.





















































































4.5 Hemolytický test

Pomocí hemolytického testu zjišťujeme, zda testované bakterie mají vlastnost rozkládat krevní složku agarů.

Čerstvě narostlá kultura byla inokulována na plotny s krevním agarem (Columbia agar s 5% obsahem beraní krve, Oxoid). Kultury byly kultivovány za anaerobních podmínek (AnaeroGen, Oxoid) při 37 °C po dobu 48 hodin. Při pozitivní reakci dochází k částečné či úplné lýze erytrocytů, v případě negativní reakce zůstává krevní agar nezměněn.

4.6 ANAEROTest 23

ANAEROTest 23 (Erba Lachema, ČR) je soubor 23 biochemických testů, které jsou umístěny ve třech řadách po osmi jamkách v mikrotitrační destičce. Je využíván pro rutinní identifikaci anaerobních bakterií na základě jejich sacharolytických vlastností. Schopnost využití daného substrátu je provázena barevnou změnou. Barevná škála pro pozitivní a negativní reakce je umístěna na **Obrázku 7**.

1		H	G	F	E	D	C	B	A
		IND	GLU	MLT	FRU	GAL	LAC	MLZ	URE
	⊕	 	 	 	 	 	 	 	
⊖		 	 	 	 	 	 	 	
2		H	G	F	E	D	C	B	A
		NIT	SUC	SAL	TRE	MAN	RHA	NAG	bGL
	⊕		 	 	 	 	 		
⊖	 	 	 	 	 	 			
3		H	G	F	E	D	C	B	A
		ESL	MNS	RAF	CEL	XYL	ARA	SOR	CON
	⊕	 	 	 	 	 	 	 	
⊖		 	 	 	 	 	 		

Obrázek 7 Barevná škála ANAEROTestu 23

Převzato z: <https://ridacom.com/en/products/view/6114>

Vysvětlivky:

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

1. řádek: IND – Indol, GLU – Glukóza, MLT – Maltóza, FRU – Fruktóza, GAL – Galaktóza, LAC – Laktóza, MLZ – Melezitóza, URE – Ureáza

2. řádek: NIT – Nitráty, SUC – Sacharóza, SAL – Salicin, TRE – Trehalóza, MAN – Manitol, RHA – Rhamnóza, NAG - N-acetyl- β -glukosamidáza, bGL - β -glukosidáza

3. řádek: ESL – Eskulín, MNS – Manóza, RAF – Rafinóza, CEL – Celobióza, XYL – Xylóza, ARA – Arabinóza, SOR – Sorbitol, CON – Kontrola růstu

1 ml čerstvě narostlé kultury byl odstředěn po dobu 2 a půl minuty při 14 500 otáčkách. Pelet byl resuspendován v suspenzním médiu a byl rovnoměrně rozdělen do všech jamek. Mikrotitrační destička byla společně s vyvíječem anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid) vložena do inkubačního sáčku a inkubována při teplotě 37 °C.

Barevné reakce byly hodnoceny po 24 a 48 hodinách a zaznamenány do formuláře. Pro ověření správnosti provedení testu a funkčnosti soupravy může být využíváno kontrolních kmenů *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1828 (ATCC 9595), *Clostridium sordellii* CCM 4611 a *Propionibacterium acnes* CCM 3343. Test byl v tomto případě používán pro získání fermentačního profilu kmenů *B. dentium*, tudíž byl jako kontrolní – referenční kmen použit sbírkový typový kmen *B. dentium* DSM 20436.

4.7 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Identifikace bifidobakterí na základě analýzy spekter ribozomálních proteinů byla provedena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Bruker Daltonik GmbH, Německo) podle Modrackova et al. (2019). Identifikace probíhá na základě porovnání hmotnostního spektra analytu s referenčními spektry bakterií v databázi.

1 ml kultury byl centrifugován po dobu 2 a půl minuty při 14 500 otáčkách. Pelety byly resuspendovány v 500 µl 70% etanolu. Po následné centrifugaci za stejných podmínek byl zcela odstraněn etanol a pelety byly resuspendovány v 15 µl 70% kyselině mravenčí a 15 µl acetonitrilu. Po zvortexování a další centrifugaci byl 1 µl supernatantu nanesen ve dvou kopiích na destičku. Po zaschnutí byl analyt překryt 1 µl HCCA matrice (Bruker Daltonik GmbH). Destička byla vložena do přístroje a analýza spuštěna.

4.8 PCR – fingerprintové metody

Před provedením polymerázové řetězové reakce (PCR) je nutné nejdříve vyizolovat bakteriální chromozomální DNA ze zkoumaného vzorku.

4.8.1 Izolace DNA

1 ml čisté kultury byl centrifugován po dobu 2 a půl minut rychlostí 14 500 otáček. Pelety byly resuspendovány ve 100 µl roztoku Prepman Ultra (Applied Biosystémy) s následným zahřátím v termobloku při teplotě 100 °C po dobu 10 minut.

Po vychladnutí suspenze na pokojovou teplotu byla opět provedena centrifugace. Ze zkumavky byl odpipetován supernatant do nové sterilní zkumavky. Izolovaná DNA byla ihned použita pro PCR reakci nebo zmrazena na -20 °C pro pozdější užití.

4.8.2 Příprava PCR směsi

Složení směsi a množství jednotlivých složek je uvedeno v **Tabulce 6**. Reakční pufr, enzym Taq DNA polymeráza a jednotlivé nukleotidy byly používány ve formě master mixu

DreamTaq Green PCR (Thermo Fisher Scientific). Pro metodu RAPD-PCR byl použit primer 103 (5'-GTGACGCCGC-3') a 173 (5'-CAGGCGGCGT-3'), REP-PCR byla provedena pomocí GTG₅ primeru (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). Jednotlivé složky směsi byly napipetovány do mikrozkušavek a doplněny o DNA izolovanou z příslušného vzorku. Směs byla promíchána, krátce zvortexována a vložena do termocykleru.

Tabulka 6 Složení směsi a množství komponent pro PCR

Komponenta	Množství (μl)
Mastermix	12,5
Primer	1
ddH ₂ O	10,5
DNA templát	1
Celkem	25

Teplotní programy RAPD-PCR a REP-PCR jsou uvedeny v **Tabulce 7**, které probíhaly ve třech opakujících se fázích. Při RAPD-PCR po úvodní denaturaci následovalo 45 cyklů, při kterých docházelo ke střídání procesů denaturace, hybridizace a elongace. Reakce byla završena finální elongací, tj. dosyntetizováním řetězců DNA. V případě REP-PCR po úvodní denaturaci probíhalo 30 cyklů.

Tabulka 7 Teplotní programy PCR reakce

RAPD-PCR			REP-PCR		
1 cyklus	95 °C	5 min	1 cyklus	95 °C	7 min
45 cyklů	95 °C	1 min	30 cyklů	90 °C	3 min
	36 °C	1 min		40 °C	1 min
	72 °C	2 min		65 °C	8 min
1 cyklus	72 °C	8 min	1 cyklus	65 °C	16 min

4.8.3 Agarosová gelová elektroforéza

Posledním krokem byla detekce vzniklých PCR produktů. Princip elektroforézy spočívá v separaci látek na základě jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli.

Do 100 ml 0,75krát koncentrovaného TAE (TRIS-kyselina octová-EDTA) pufru byl přidán 1 g agarosového prášku. Směs byla promíchána a zahřívána v mikrovlnné troubě po dobu 3 minut. Po vychladnutí bylo do směsi přidáno 5 μl GelRed barviva (Biotium). Celá směs byla vлита do vany s hřebínky pro vytvoření jamek. Po ztuhnutí gelu (cca 30 minut) byly vyjmuty hřebínky a gel přelit TAE puftrem v nádobě elektroforézy. Do jamek v gelu bylo opatrně napipetováno 5 μl PCR směsi. Do krajních jamek gelu bylo napipetováno stejné množství standardů (Thermo Scientific). Nádoba elektroforézy byla překryta víkem a separace probíhala při napětí 100 V po dobu 100 minut.

4.8.4 Vyhodnocení

Po dokončení elektroforézy byl gel vyjmut a umístěn do UV-transluminátoru (Bio-Rad) Gel byl prosvícen pomocí UV záření a docházelo k vizualizaci separované DNA. Byly pořízeny elektroforeogramy.

4.9 16S rRNA identifikace vybraných kmenů

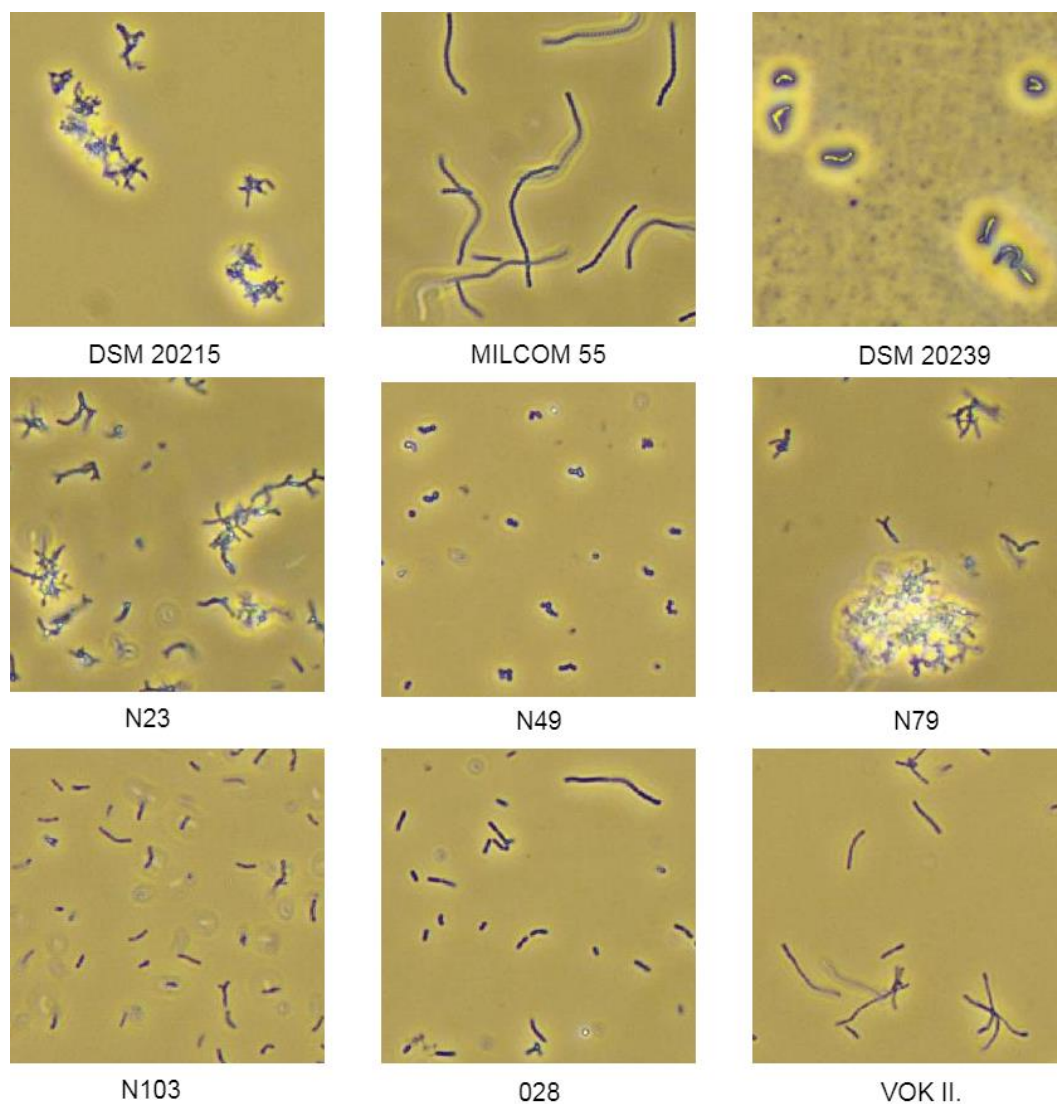
Výše uvedené kmeny, které mi byly poskytnuty pro testování v rámci diplomové práce jsou součástí aktuálního experimentu pracovníků katedry. Výsledná identifikace izolátů byla provedena sekvenací genu 16S rRNA pracovníky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, a to Věrou Neužil Bunešovou a Nikol Modráčkovou. Výsledky mi byly poskytnuty k porovnání s výše uvedenými metodami. Zjednodušený postup:

Z izolované DNA byla připravena PCR s použitím primerů 285F (5' - GAGGGTTCGATTCTGGCTCAG - 3') a 261R (5' - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3') pro 16S rRNA (Kim et al. 2010). Získaný PCR produkt byl zkontrolován a vizualizován pomocí gelové elektroforézy a následně purifikován podle Bunesova et al. (2017). Purifikovaný produkt byl zaslán k sekvenování do Eurofins Genomics (Německo). Výsledky byly poté analyzovány programy Chromas a BioEdit. Získané sekvence byly porovnány s typovými sekvencemi uloženými v databázi EZBioCloud databáze (<https://www.ezbiocloud.net/>).

5 Výsledky

V praktické části této diplomové práce byly charakterizovány vybrané kmeny rodu *Bifidobacterium* (zacíleno na zástupce druhu *Bifidobacterium dentium*) pomocí fenotypových a genotypových metod. Celkem bylo pro testování vybráno 27 sbírkových kmenů, které poskytla Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU. V práci bylo charakterizováno celkem 23 izolátů bifidobakterií, které pocházely z různých ekologických nik – zvířecích hostitelů – primátů (šimpanz, makak lví, pavián pláštík), lidských hostitelů (stolice dospělých jedinců a kojenců) a zubního kazu. Kdy 20 izolátů náleželo podle předchozí identifikace druhu *Bifidobacterium dentium*. Jako kontrolní kmeny při testování byly využity 3 kmeny *Bifidobacterium bifidum*, dále pak druhy *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae* LMG 15088, a *Streptococcus thermophilus* MILCOM 55. Podrobný přehled všech použitých mikroorganismů je uveden v **Tabulce 5** v metodice.

Pro testování byly použity pouze čisté kultury, které byly před každým testováním zkontrolovány pod světelným mikroskopem a byla zhodnocena jejich morfologie. Ukázka morfologie vybraných kmenů vizualizovaných pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem při zvětšení 400x je uvedena na **Obrázku 8**.



Obrázek 8 Ukázka morfologie vybraných kmenů (autor Štivarová)

Morfologie rodu *Bifidobacterium* je poměrně rozmanitá. Druhy *B. dentium* (N23, N79, N103, VOK II.) se vyskytují jako nepravidelné, různě dlouhé, větvené tyčinky jednotlivě i ve shlucích. Kmeny druhu *B. bifidum* tvoří rovněž zakřivené tyčinky, které se seskupují (DSM 20215) a také mohou mít zaoblený tvar (DSM 20239). Kmen 028, který se nepodařilo identifikovat, tvoří různě dlouhé nevětvené tyčinky. Naopak u kmenů, které sloužily jako kontroly při testování, pozorujeme koky (N49, *Staphylococcus warneri*), a jejich uspořádání v řetízcích (MILCOM 55, *Streptococcus thermophilus*).

5.1 Fenotypová charakterizace

Bylo provedeno celkem 5 biochemických testů pro zhodnocení fenotypových vlastností bifidobakterií. Jednalo se o F6PPK test, hemolytický test, katalázový test, test utilizace mucinu a komerční ANAEROTest 23. Souhrn výsledků 4 biochemických testů (F6PPK test, hemolytický test, katalázový test, test utilizace mucinu) se nachází v **Tabulce 8**.

Klíčovým testem pro rodovou identifikaci bifidobakterií bylo stanovení přítomnosti enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy (F6PPK), který vzniká při fermentaci hexóz. Na přítomnost enzymu F6PPK bylo testováno všech 27 izolátů. Předpokládalo se, že 23 izolátů (dříve identifikovaných jako bifidobakterie) bude mít enzym fruktózo-6-fosfát fosfoketolázu aktivní, což bylo potvrzeno pouze u 22 izolátů. Izolát 028 byl negativní na přítomnost tohoto enzymu, což nekoresponduje s jeho dřívějším zařazením k rodu *Bifidobacterium*. Negativní kontroly – druhy *Streptococcus agalactiae* (LMG 15088), *Streptococcus thermophilus* (MILCOM 55), *Streptococcus salivarius* (N47), *Staphylococcus warneri* (N49) neměly tento enzym aktivní.

Všechny izoláty byly testovány na přítomnost katalázy, enzymu rozkládajícího peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík. Bifidobakterie jsou obecně kataláza negativní. Byly však popsány i druhy s katalázovou aktivitou, jedná se o druhy *B. asteroides* a *B. indicum* (Felis & Dellaglio 2007). Pozitivní reakce, která se projevuje tvorbou bublinek, byla pozorována u kmene 028, který se tímto opět odlišoval od ostatních izolátů bifidobakterií. Pozitivně reagoval rovněž kontrolní kmen *Staphylococcus warneri*. Kmen *Streptococcus salivarius* je považován za druh nevykazující katalázovou aktivitu, nicméně v našem testování reagoval pozitivně. Ostatní negativní kontroly, kmen *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus thermophilus* neměly enzym aktivní.

Pro zhodnocení hemolytických vlastností bakterií byly izoláty podrobeny hemolytickému testu. Byl využit krevní agar (Columbia agar s 5% obsahem krve). Jak bylo předpokládáno, všechny izoláty druhu *B. dentium* i *B. bifidum* reagovaly negativně. Lehké červené projasnění poukazující na hemolytickou aktivitu bylo viditelné pouze u pozitivní kontroly *Streptococcus agalactiae*.

Dále byla zjišťována schopnost bifidobakterií využívat glykoprotein mucin. Utilizace mucinu je typická pouze pro druh *Bifidobacterium bifidum*. Ze 3 kmenů *B. bifidum* byla pozitivní reakce pozorována pouze u 2 kmenů (DSM 20215, DSM 20239). Neschopnost utilizace mucinu u kmene DSM 20456 může být spojena s tím, že kmen špatně rostl i v běžném kultivačním médiu. Pozitivní reakce, která se vyznačuje barevnou změnou z fialové na žlutou, proběhla také u kmene 028. Toto zjištění opět vyvrací předchozí zařazení tohoto kmene, který

dle původní identifikace byl považován za druh *B. dentium*. U zástupců druhu *B. dentium* a negativních kontrol neproběhla žádná reakce.

Tabulka 8 Výsledky biochemických testů

Kmen	Identita	F6PPK test	Hemolytický test	Katalázový test	Utilizace mucinu
N5	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N12	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N21	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N23	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N26	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N77	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N79	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N103	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N105	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N109	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N110	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N111	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N112	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
N122	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
A1/5A	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
028	<i>B. dentium</i> *	-	-	+	+
FD1	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
TH1	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
VOK II.	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
DSM 20436	<i>B. dentium</i>	+	-	-	-
DSM 20215	<i>B. bifidum</i>	+	-	-	+
DSM 20239	<i>B. bifidum</i>	+	-	-	+
DSM 20456	<i>B. bifidum</i>	+	-	-	-
LMG 15088	<i>Strep. agalactiae</i>	-	+/-	-	-
MILCOM 55	<i>Strep. thermophilus</i>	-	-	-	-
N47	<i>Strep. salivarius</i>	-	-	+	-
N49	<i>Staph. warneri</i>	-	-	+	-

- *Tento kmen byl po kontrole identifikace MALDI TOF MS shledán jako NRI – not reliable identification – neidentifikovaný (testovaná kultura není *B. dentium*)

5.1.1 ANAEROTest 23

Souprava ANAEROTest 23 obsahuje 23 biochemických testů, které slouží k identifikaci anaerobních bakterií na základě jejich sacharidového metabolismu. Při detekci je využíváno acidobazických indikátorů. Při pozitivní reakci dochází k tvorbě organických kyselin a poklesu pH, čímž dochází k barevné změně. V případě ureázy je indikátorem fenolová červeň a při výsledné pozitivní reakci je zbarvení červené. Většina médií obsahovala bromkresolovou červeň jako pH indikátor a při pozitivní reakci došlo ke změně fialové barvy na žlutou. Barevná škála pro pozitivní a negativní reakce je uvedena na **Obrázku 7** v metodické části.

Pomocí ANAEROTestu 23 bylo testováno celkem 20 kmenů druhu *B. dentium*. Testované kmeny byly izolovány z různých hostitelů (primát, dospělý, dítě, kojeneček), a také v rámci jednotlivých hostitelských skupin se schopnost využití jednotlivých substrátů často různila. Veškeré výsledné reakce ANAEROTestu 23 jsou uvedeny v **Tabulce 9**.

Všechny testované kmeny byly schopny využít velké množství sacharidových substrátů, konkrétně glukózu, maltózu, fruktózu, laktózu, sacharózu, rafinózu a arabinózu. Enzym β -glukosidáza byl také pozitivní u všech testovaných kmenů. Všechny testované kmeny rovněž projeví svou schopnost využít salicin a eskulin.

Celkem 15 kmenů dokázalo využívat trehalózu. Tři kmeny z celkových 11 kmenů pocházejících z výkalů šimpanzů ji naopak zutilizovat nedokázaly. Negativní reakci v případě trehalózy vykazovaly také 2 kmeny izolované ze stolice kojenců.

17 izolátů reagovalo pozitivně na celobiózu. 3 izoláty pak vykazovaly slabě pozitivní reakci, jednalo se o kmen N105 pocházející z výkalů šimpanze a kmeny TH1 a FD1 izolované ze stolice kojenců.

Melezitózu dokázal utilizovat kmen A1/5A izolovaný z dítěte. Kromě tohoto kmene melezitózu byl schopen utilizovat ještě kmen 028, který pocházel ze stolice dítěte a podle F6PPK a dalších testů neodpovídá rodu *Bifidobacterium*. Slabá pozitivní reakce na melezitózu byla zaznamenána u třech kmenů izolovaných z šimpanze a u jednoho kmene, který pocházel z makaka lvího.

Utilizovat manitol dokázalo 19 kmenů, tj. všechny kromě jediného kmene (N103) izolovaného z šimpanze. Manóza byla pozitivní u všech 19 kmenů, přičemž kmen N103 opět jako jediný vykazoval slabě pozitivní reakci.

Zcela odlišně reagoval kmen 028, jako jediný vykazoval pozitivní reakci v případě sorbitolu, N-acetyl- β -glukosamidázy a rhamnózy. Naopak jako jediný kmen neprokázal schopnost využít xylózu. Slabá pozitivní reakce byla prokázána u nitrátů. Ani jeden z testovaných kmenů nedokázal využít indol a ureázu.

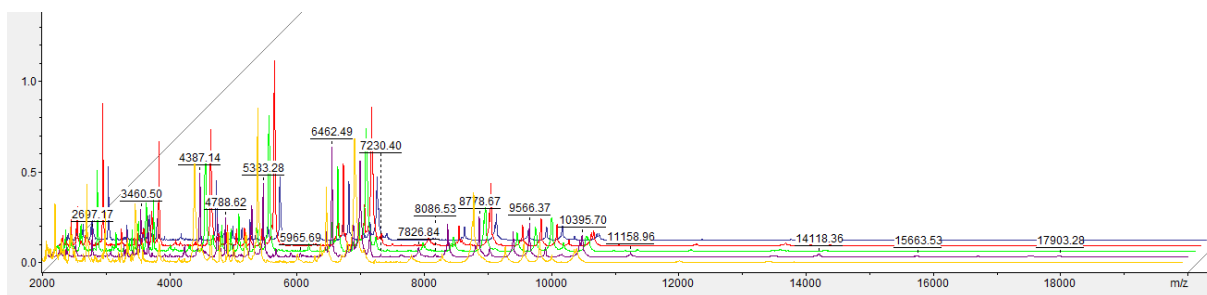
Tabulka 9 Výsledky ANAEROtestu 23

Test	ID vzorku																			
	N5	N12	N21	N23	N26	N77	N79	N103	N105	N109	N110	N111	N112	N122	2043 6	A1/5 A	028	TH1	FD1	VOK II.
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fruktóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktóza	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitóza	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Ureáza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitráty	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
Sacharóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalóza	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnóza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
N-acetyl- β -glukosamidáza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
β -glukosidáza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannoza	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobióza	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+
Xylóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Arabinóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Kontrola růstu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5.2 MALDI-TOF MS

Na rozhraní fenotypových a genotypových metod stojí hmotnostní spektrofotometrie (MALDI-TOF MS), která v rámci experimentu posloužila jako vhodný nástroj pro kontrolu rodové a druhové identity testovaných bifidobakterií a kontrolních kmenů. Během kultivace může docházet k záměně vzorků, kontaminaci či tomu, že kontaminant přeroste původní kulturu, a proto je vhodné zpětně ověřit identitu jednotlivých bakteriálních kmenů. Kmen 028, který dle původní identifikace byl považován za druh *Bifidobacterium dentium*, byl nakonec prostřednictvím MALDI MS shledán jako nemožný identifikace. Výsledky získané pomocí této metody tedy korespondují s výsledky výše uvedených biochemických testů, kdy podle F6PPK v případě kmene 028 nejde ani o rod *Bifidobacterium*. U všech ostatních testovaných kmenů byla metodou MALDI TOF MS identita potvrzena.

S cílem zjistit, zda je mezi testovanými kmeny *B. dentium* variabilita byla prohlédnuta a porovnána jednotlivá získaná spektra ribozomálních proteinů zaznamenaná softwarem MALDI TOF MS (Bruker). Spektra všech 19 kmenů identifikovaných jako *B. dentium* byla téměř identická. Na **Obrázku 9** je ukázka vybraných spekter (FD1, N105, N79, N21 a N12). Spektra uvedených kmenů zobrazená samostatně jsou v kapitole 10, **Samostatné přílohy**.



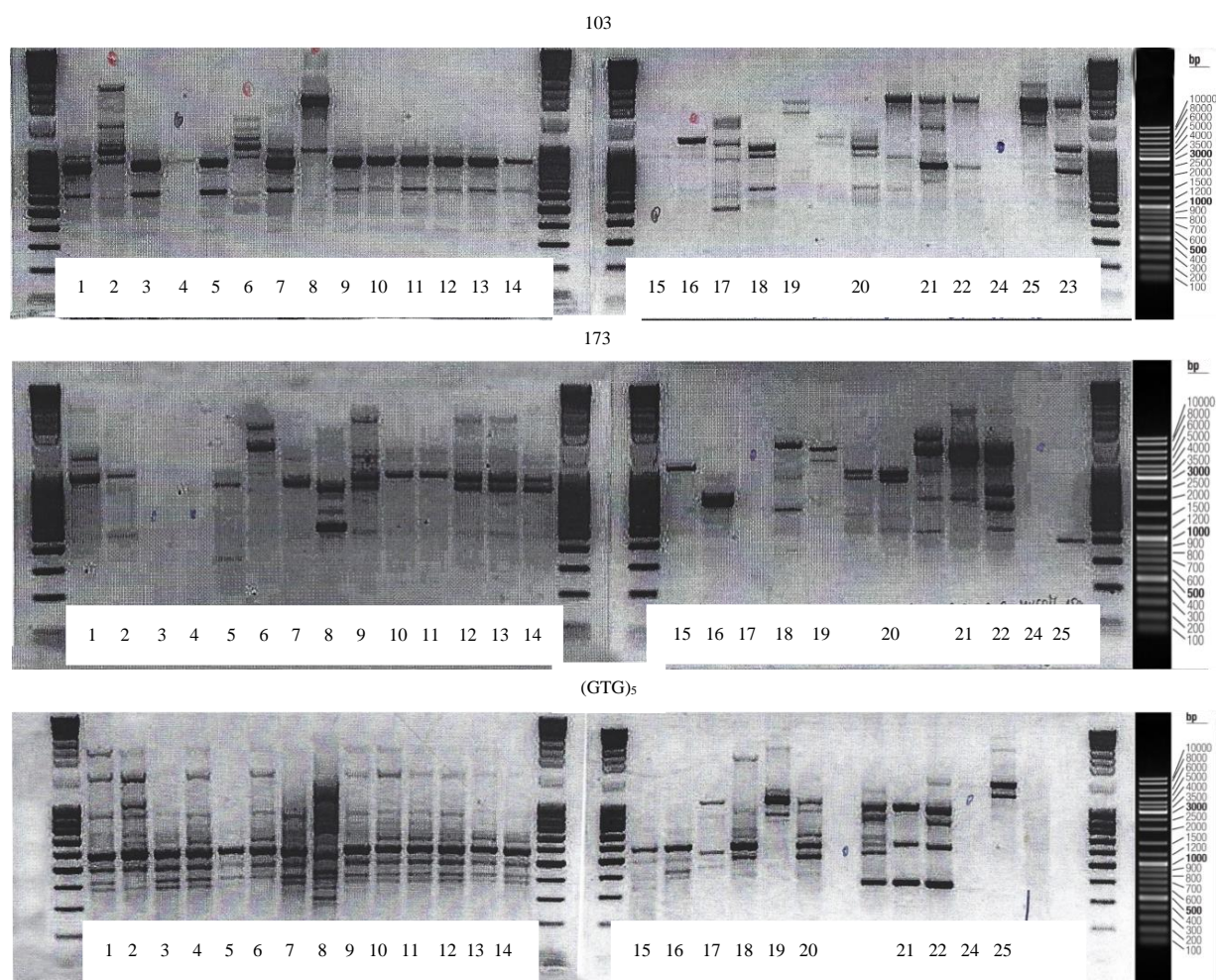
Obrázek 9 Ukázka vybraných spekter získaná pomocí MALDI-TOF MS

5.3 RAPD-PCR, REP-PCR

Z genotypových metod byly použity fingerprintové metody RAPD-PCR a REP-PCR. Pro metodu RAPD-PCR bylo využito primerů 103 (5'-GTGACGCCGC-3') a 173 (5'-CAGGCGGCGT-3'), REP-PCR byla provedena pomocí (GTG)₅ primeru (5'-GTGGTGGTGGTGGTGGT-3'). Získané profily jsou uvedeny na **Obrázku 10**. Z výsledků je patrné, že spolu s kmeny *B. dentium* jsou zde uvedeny i kmeny jiného bifidobakteriálního druhu, tedy *B. bifidum*, kde je jasně odlišný fingerprintový profil. Totéž platí pro ostatní použité kontrolní druhy jako *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius* a *Staphylococcus warneri*.

U některých DNA izolátů se profil pomocí použitých primerů nepodařilo získat. Hlavním cílem použité metody bylo zjistit, zda budou mezi testovanými kmeny *B. dentium* detekovány rozdíly. Profily se v rámci jednoho primeru skutečně odlišovaly, a to především u primerů pro

RAPD-PCR (103 a 173). V případě REP-PCR byly rozdíly minimální. Kmeny měly téměř shodný profil, byly zde detekovány spíše rozdíly v kvalitě vizualizace PCR produktu, což může souviset s množstvím a kvalitou použité DNA. Významně odlišný profil vykazoval kmen č. 19 (028), což potvrzuje předchozí výsledky, tedy to, že se nejedná o *B. dentium* ani rod *Bifidobacterium*. S použitím primeru (GTG)₅ se více lišil také kmen č.17 (VOK II). U primerů pro metodu RAPD-PCR 173 a 103 byla mezi kmeny vyšší variabilita. Opět je potřeba brát na zřetel kvalitu vizualizace PCR produktu, tedy při porovnávání zohlednit velikost PCR produktu podle použitého standardu (ladder). Zde by podle vzniklých fingerprintových profilů šlo kmeny rozdělit do několika skupin. Byla zde detekována variabilita nejen v závislosti na hostitech, ale i v rámci jednotlivých kmenů (**Obrázek 10**).



Obrázek 10 Fingerprinty

Vysvětlivky k identitě jednotlivých kmenů:

Kmen č. 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 – *B. dentium*, izolováno z šimpanze

Kmen č. 2, 6 – *B. dentium*, izolováno z makaka lvího

Kmen č. 7 – *B. dentium*, izolováno z paviána plástíkového

Kmen č. 15, 16, 17 - *B. dentium*, izolováno z kojence

Kmen č. 18 - *B. dentium*, izolováno z dítěte (Crohnova choroba)

Kmen č. 19 - *B. dentium*, izolováno z dítěte

Kmen č. 20 - *B. dentium*, izolováno ze zubního kazu
Kmen č. 21 - *B. bifidum*, izolováno z dospělého člověka
Kmen č. 22, 23 - *B. bifidum*, izolováno z kojence
Kmen č. 24 - *Streptococcus thermophilus*, izolováno z kysaného mléčného výrobku
Kmen č. 25 - *Streptococcus agalactiae*, izolováno z vaginálního vzorku

5.4 Identifikace – sekvenování genu 16S rRNA

Výsledky této metody jsou zde uvedeny pro srovnání s ostatními výše zmíněnými metodami charakterizace. Jsou součástí zatím nepublikované studie a jejich vlastní zpracování nebylo součástí této práce. Pomocí metody sekvenování genu 16S rRNA byla pro všechny výše uvedené kmeny *B. dentium* (19 kmenů) potvrzena identita k danému druhu. Nicméně bylo zjištěno, že většina kmenů izolovaná z primátů (šimpanzů a paviana plástíkového; N5, 21, 23, 26, 79, 103, 105, 109, 110, 111, 112, 122) má shodu s typovým kmenem *B. dentium* DSM 20436 jen v rozmezí 98,72 – 98,88 %, mohlo by se tak jednat o potenciální poddruh. Kmeny lidského původu (TH1, FD1, A1/5A, VOK II) a kmeny od makaka lviho (N12 a 77) vykazovaly shodu s typovým kmenem v rozmezí 99,58 – 100 %, což potvrzuje druhovou identitu k *B. dentium*.

6 Diskuze

Bakterie rodu *Bifidobacterium* běžně kolonizují trávicí trakt člověka i zvířat. Bifidobakteriální druhy mohou být typické výhradně pro určitého hostitele, nebo mohou být multihostitelské (kosmopolitní), tj. jejich výskyt je možný u různých hostitelských skupin (Turroni et al. 2014). V současné době jsou příslušníci rodu *Bifidobacterium* řazeni do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteridae*, řádu *Bifidobacteriales* (Felis & Dellaglio 2007). Čeleď *Bifidobacteriaceae* tvoří bifidobakterie společně s rody *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Gardnerella*, *Parascardovia* a *Scardovia* (Milani et al. 2016). V současnosti k rodu *Bifidobacterium* náleží přes 90 druhů a poddruhů (<https://www.bacterio.net/genus/bifidobacterium>). Bifidobakterie jsou prvními kolonizátory trávicího traktu člověka a většina z nich je považována za přínosné pro lidské zdraví (O'Callaghan & Sinderen 2016). Kromě těchto taxonů však do rodu *Bifidobacterium* patří i druhy, jejichž přínos je diskutabilní. Jedná se například o druh *Bifidobacterium dentium*, který byl poprvé izolován ze zubního kazu (Scardovi & Crociani 1974) a je považován za oportunní patogen (Ventura et al. 2009). Původně bylo *B. dentium* izolováno z appendixu člověka a pojmenováno jako *B. apendicitis*. Později byly tyto bakterie izolovány ze zubních kazů a stolice, přičemž jim bylo přiřazeno pojmenování *Actinomyces eriksonii*. Na základě pozdějších výzkumů byl druh finálně pojmenován jako *B. dentium* (Scardovi & Crociani 1974; Zhou & Li 2015).

Mezi multihostitelské druhy, které byly popsány u člověka a zároveň šimpanzů, patří *B. pseudolongum* (Nomoto et al. 2017), *B. angulatum* (Ushida et al. 2010), *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* (Uenishi et al. 2007), *B. dentium* (D'Aimmo et al. 2014). Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat multihostitelský druh *Bifidobacterium dentium* na fenotypové a genotypové úrovni. Velká část izolátů této práce pocházela z výkalů šimpanzů, makaka lvího a paviana pláštíkoviho. Dále pak ze stolice dospělého člověka, kojence a dítěte. Do testování byl zařazen také kontrolní typový kmen *B. dentium* DSM 20436. Kromě druhů *B. dentium* byly v některých testech charakterizovány i kmeny druhu *B. bifidum* a další kontrolní kmeny – *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus thermophilus*.

Výše uvedené izoláty byly charakterizovány pomocí fenotypových metod, jako první byly zvoleny kultivačně závislé metody, při kterých se pracuje s izolovanou kulturou. Pomocí F6PPK testu jsme si potvrdili rodové zařazení bifidobakteriálních izolátů. Všechny izoláty rodu *Bifidobacterium* reagovaly pozitivně, kromě izolátu 028. V rámci fenotypové charakterizace byl zařazen také hemolytický test, ve kterém kmeny izolované z primátů i člověka, byly všechny negativní. Dále byla stanovována přítomnost enzymu katalázy. Bifidobakterie jsou považovány za kataláza negativní, nedokáží tedy růst za přítomnosti kyslíku (Felis & Dellaglio 2007). Také v našem testování měly všechny kmeny negativní výsledek. Existují i výjimečné druhy, které vykazují pozitivní katalázovou aktivitu (Felis & Dellaglio 2007), jedná se o druhy *B. asteroides* nebo *B. indicum*, původně izolované z trávicího traktu včel (Scardovi & Trovatelli 1969).

Některé bifidobakterie jsou schopny využívat energii z glykanů hostitele. Schopnost utilizace a degradace mucinu byla prokázána u druhu *B. bifidum* (Cronin et al. 2011; Bottacini

et al. 2014). V případě našeho testování, mucin dokázaly využít 2 kmeny *B. bifidum* izolované ze stolice kojenců.

Cílem ANAEROTestu 23 bylo stanovení fermentačních profilů všech izolátů pocházejících z různých ekologických nik a následné porovnání substrátových preferencí jednotlivých kmenů. V ANAEROTestu 23 bylo testováno celkem 20 kmenů. Kmeny *B. dentium* prokázaly schopnost fermentace glukózy, maltózy, fruktózy, laktózy, sacharózy, rafinózy a arabinózy, čímž můžeme potvrdit, že bifidobakterie jsou schopny využívat širokou škálu sacharidových substrátů. Zcela uniformně reagovaly kmeny v případě β -glukosidázy, všechny vykazovaly pozitivní reakci. Dle Pokusaeva et al. (2011) se schopnost utilizace sacharidů mezi jednotlivými druhy rodu *Bifidobacterium* různí. Pokusaeva et al. (2011) ve své publikaci také uvádí fermentační charakteristiky vybraných druhů rodu *Bifidobacterium*. Výsledný fermentační profil kmene *B. dentium* JCM1195 se z velké části shoduje s našimi výsledky, a to v případě glukózy, fruktózy, galaktózy, laktózy, arabinózy, sorbitolu nebo salicinu. V našem testování byla zaznamenána odlišnost u kmene N103, který se různil v utilizaci manitolu, kde jako jediný kmen reagoval negativně, dále pak u manózy a galaktózy, kde jako jediný ze všech testovaných kmenů vykazoval slabou pozitivní reakci. Nicméně Pokusaeva et al. (2011) uvádějí, že v jejich testování kmen *B. dentium* JCM1195 reagoval rovněž negativně na manitol. Zajímavé zjištění bylo shledáno v případě trehalózy u kmenů izolovaných z šimpanzů. Fermentovat trehalózu nedokázaly 3 kmeny pocházející z šimpanzů a zbylých 8 kmenů naopak vykazovalo pozitivní reakci. 2 kmeny *B. dentium* izolované z kojenců rovněž nedokázaly trehalózu využít, další izolát ze stejné hostitelské skupiny naopak reagoval pozitivně. V případě ostatních kmenů již žádný markantní rozdíl ve fermentačních profilech nebyl nalezen. Oproti výše zmíněným biochemickým testům (hemolytický test, katalázový test, test utilizace mucinu) tedy při testování pomocí ANAEROTestu 23 byla zaznamenána mírná variabilita mezi kmeny, které pochází z jedné hostitelské skupiny.

Kmen 028 se výrazně odlišoval ve všech výše uvedených testech. Ve F6PPK testu reagoval negativně. Podle našeho testování se jedná o kataláza pozitivní bakterii se schopností utilizace mucinu. V ANAEROTestu 23 vykazoval pozitivní reakci např. v případě sorbitolu, N-acetyl- β -glukosamidázy a rhamnózy. Naopak jako jediný kmen neprokázal schopnost využít xylózu. Na základě výsledků našeho testování je zřejmé, že se nejedná o druh *B. dentium*, nepatří ani k rodu *Bifidobacterium* a čeledi *Bifidobacteriaceae*. Předpokládáme, že během kultivace mohlo dojít k záměně vzorků či kontaminaci.

Identita izolátů byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Tato metoda slouží k identifikaci, ke které dochází na základě porovnání hmotnostního spektra ribozomálních proteinů mikroorganismu se spektry již uloženými v databázi (Clark et al. 2013). V rámci našeho testování byla identifikace druhů *B. dentium* shledána jako spolehlivá. Výjimkou byl kmen 028, který nebylo možné pomocí MALDI-TOF MS identifikovat. V některých případech lze tuto metodu použít ke kmenovému odlišení. Bunesova et al. (2017) studovali diverzitu poddruhu *B. animalis* subsp. *lactis*, přičemž pomocí metody MALDI-TOF zaznamenali rozdíly na úrovni kmenů. V rámci této práce však mezi jednotlivými spektry izolátů nebyly shledány žádné rozdíly.

Rozvoj molekulárně-genetických technik výrazně rozšířil schopnost spolehlivé identifikace a zhodnocení evoluční příbuznosti kmenů (Ventura et al. 2004). V případě těchto metod, je prvním krokem před samotným testováním izolace bakteriální DNA. Často užívanou

metodou pro odlišení až na úroveň kmene jsou tzv. fingerprintové techniky, mezi které patří analýza náhodně amplifikované polymorfni DNA (RAPD-PCR) a repetitivní PCR sekvence (REP-PCR) (Bunesova et al. 2017). V rámci této práce byla provedena RAPD-PCR za použití primeru 173 a 103. Fingerpriny získané pomocí primeru 103 byly nejvíce variabilní. Tento přístup skrze molekulární genetiku dopomohl k odhalení variability kmenů N12, N77 a N103. Kmeny N12 a N77 pocházely z makaka lvího, kmen N103 ze šimpanze. Pomocí RAPD-PCR tak byla potvrzena variabilita nejen mezi hostitelskými skupinami, ale i v rámci jednotlivých kmenů. Při použití primeru 173 byla odhalena variabilita také u kmenů N77 (izolováno z makaka lvího) a N103 (izolováno ze šimpanze). Odlišnosti v profilu byly patrné také u kmene A1/5A, který byl izolován z dítěte s Crohnovou chorobou. Některé profily se nepodařilo pomocí primeru 173 získat. Je rovněž důležité brát v potaz kvalitu vizualizace PCR produktu. Jarocki et al. (2016) provedli RAPD-PCR s primery PER1 a CORR1 pro odlišení 17 bifidobakteriálních kmenů a uvádí, že na základě jejich výsledků je pomocí této metody možné rozlišení mezi druhy i poddruhy. PCR prováděné s primerem PER1 v jejich studii umožnilo rozlišení mezi kmeny *B. breve* DSM 20091 a *B. breve* NRRL B-41408 a také mezi třemi kmeny *B. pseudolongum* (DSM 20094, DSM 20095 a DSM 20099). Na základě výsledků této práce a rovněž studie Jarocki et al (2016) lze konstatovat, že RAPD-PCR je vhodným nástrojem pro identifikaci bifidobakterií na úrovni druhů i poddruhů, a navíc má RAPD potenciál rozlišovat bifidobakterie i na úrovni kmene.

V rámci této práce byla provedena také metoda REP-PCR s primerem (GTG)₅, kdy byly zjištěny pouze minimální rozdíly ve fingerprintech. Profil kmene VOK II (izolováno z kojence), se odlišoval od ostatních kmenů *B. dentium*. Profily ostatních kmenů, zejména izolovaných z šimpanzů, měly téměř shodné profily. Ve studii Křížová et al. (2008) a rovněž Masco et al. (2003) byly hodnoceny dva oligonukleotidové primery, a to BOXA1R a (GTG)₅ při identifikaci bifidobakterií metodou REP-PCR. Studie ukázaly, že BOX-PCR je vhodnější a univerzálnější technika při rozlišování kmenů rodu *Bifidobacterium* na všech taxonomických úrovních. Bylo by tedy zajímavé, pro další výzkumy, kmeny analyzované v této studii, otestovat pomocí REP-PCR např. s primerem BOXA1R.

Finální identifikace kmenů *B. dentium* byla završena pomocí metody sekvenování genu 16S rRNA. Zajímavé bylo zjištění, že většina kmenů izolovaná z primátů (šimpanzů a paviána pláštikového; N5, 21, 23, 26, 79, 103, 105, 109, 110, 111, 112, 122) má shodu s typovým kmenem *B. dentium* DSM 20436 v rozmezí 98,72–98,88 %. Sekvenování genu 16S rRNA tak poukázala na možnost, že by tyto kmeny mohly spadat do skupiny potenciálních poddruhů. Kmeny lidského původu (TH1, FD1, A1/5A, VOK II) a kmeny od makaka lvího (N12 a N77) vykazovaly shodu v porovnání s příslušným typovým kmenem v rozmezí 99,58–100 %, čímž byla potvrzena identita k druhu *B. dentium*.

K tomu, aby byly nalezeny další odlišnosti mezi kmeny a případně pro potvrzení, zda se jedná o poddruh v rámci druhu *B. dentium*, by bylo nutné provést další experimenty. Do budoucna by bylo vhodné využít dalších primerů v RAPD-PCR či REP-PCR, celogenomového sekvenování nebo MLST.

7 Závěr

- Hlavním cílem této diplomové práce bylo odhalit fenotypovou a genotypovou variabilitu mezi bifidobakteriemi stejného druhu pocházejících z různých hostitelů, především opic a člověka. Druh *Bifidobacterium dentium* byl shledán jako společný pro člověka (dospělce i kojence), starosvětské druhy opic (pavián pláštíkovitý, makak lví) a lidoopy (šimpanz), což potvrzuje jeden z předpokladů.
- Kmenovou variabilitu v rámci *B. dentium* se podařilo odhalit pomocí fermentačního testu ANAEROTest 23 a fingerprintových metod (RAPD a REP-PCR). Výsledky ostatních použitých metod jako F6PPK test, katalázový test, hemolytický test, test utilizace mucinu byly shodné v rámci daného druhu. Díky metodě sekvenace genu 16S rRNA se podařilo odlišit většinu izolátů pocházejících z primátů (šimpanz a pavián pláštíkovitý) s možným předpokladem popisu nového poddruhu *B. dentium*. Pro potvrzení tohoto předpokladu by byla vhodná další charakterizace na genomové úrovni.
- Z výsledků našeho testování lze dříve stanovenou hypotézu potvrdit, testované kmeny druhu *Bifidobacterium dentium* vykazovaly variabilitu. S ohledem do budoucna se nabízí možnosti provedení dalších metod, které by mohly prozradit více o genotypu tohoto druhu a zároveň potvrdit potenciální poddruh druhu *B. dentium*. Dle původu testovaných primátích izolátů *B. dentium* a dostupných zdrojů, lze též potvrdit, že tento multihostitelský druh je typický spíše pro starosvětské opice než pro opice novosvětské. Izoláty *B. dentium* od poloopic nebyly do testování zahrnuty.

8 Literatura

- Abdelbary MMH, Basset P, Blanc DS, Feil EJ. 2017. Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition). Elsevier, Bath.
- Abe F, Muto M, Yaeshima T, Iwatsuki K, Aihara H, Ohashi Y, Fujisawa T. 2010. Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. *Anaerobe* **16**:131-136.
- Ahmadian A, Ehn M, Hober S. 2006. Pyrosequencing: History, Biochemistry and Future. 2006. *Clinica chimica acta* **363**:83-94.
- Andriantsoanirina V, Allano S, Butel MJ, Aires J. 2013. Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe* **21**:39-42.
- Ayichew T, Belete A, Alebachew T, Tsehaye H, Berhanu H, Minwuyelet A. 2017. Bacterial Probiotics their Importances and Limitations: A Review. *Journal of Nutrition and Health Sciences* **4**:1-8.
- Balouet JC, Oudijk G, Petrisor I, Morrison R. 2007. Emerging forensics techniques. Pages 677-738 in Murphy BL, Morrison RD, editors. *Introduction to Environmental Forensics*. Academic Press, New York.
- Bardakci F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology* **25**:185-196.
- Bartůňková J, Paulík M. 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada, Praha.
- Bermudez- Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. 2012. Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism* **61**:160-174.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of microbiology* **50**:117-131.
- Bortlík M. 2009. Probiotika v gastroenterologii. *Remedia*. **19**:47-51.
- Bottacini F, Ventura M, Sinderen DV, Motherway M. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories* **13**:1-15.
- Brown CJ, Mtui D, Oswald BP, Van Leuven JT, Vallender EJ, Schultz-Darken N, Ross CN, Tardif SD, Austad SN, Forney LJ. 2019. Comparative genomics of *Bifidobacterium* species isolated from marmosets and humans. *American Journal of Primatology* (e983) DOI: 10.1002/ajp.22983.
- Bunesova V, Killer J, Javurkova B, Vlkova E, Tejnecky V, Musilova S, Rada V. 2017. Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Anaerobe* **44**:40-47.
- Bunesova V, Lacroix Ch, Schwab C. 2018. Mucin Cross-Feeding of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii*. *Microbial Ecology* **75**:228-238.
- Bunešová V, Joch M, Musilová S, Rada V. 2017. Bifidobacteria, lactobacilli, and short chain fatty acids of vegetarians and omnivores. *Scientia Agriculturae Bohemica* **48**:47-54.

- Buxton R. 2016. Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. American Society for Microbiology. Available from <https://www.asm.org/getattachment/7ec0de2b-bb16-4f6e-ba07-2aea25a43e76/protocol-2885.pdf> (accessed February 2020).
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **26**:547-603.
- Cronin M, Ventura M, Fitzgerald GF, Sinderen DV. 2011. Progress in Genomics, Metabolism and Biotechnology of Bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **149**:4-18.
- Čikoš Š, Koppel J, Kantíková M. 2001. Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice.
- D'Aimmo MR, Modesto M, Mattarelli P, Biavati B, Andlid T. 2014. Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. *Anaerobe* **30**:169-177.
- Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, Berenjian A, Ghasemi Y. 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* **8**:1-27.
- Delétoile A, Passet V, Aires J, Chambaud I, Butel MJ, Smokvina T, Brisse S. 2010. Species delineation and clonal diversity in four *Bifidobacterium* species as revealed by multilocus sequencing. *Research in Microbiology* **161**:82-90.
- Demnerová K. 2012. Mikrobiologická bezpečnosť potravín: súčasné stratégie pro efektívnu kontrolu. *Chemické listy* **106**:920-925.
- Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **50**:119-125.
- Duranti et al. 2019. Characterization of the phylogenetic diversity of five novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium castoris* sp. nov., *Bifidobacterium callimiconis* sp. nov., *Bifidobacterium goeldii* sp. nov., *Bifidobacterium samirii* sp. nov. and *Bifidobacterium dolichotidis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **69**:1288-1298.
- Duranti et al. 2020. Characterization of the phylogenetic diversity of two novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium cebidarum* sp. nov. and *Bifidobacterium leontopithecii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **70**:2288-2297.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Schumann P, Pukall R, Dicks LMT. 2012. *Bifidobacterium reuteri* sp. nov., *Bifidobacterium callitrichos* sp. nov., *Bifidobacterium saguini* sp. nov., *Bifidobacterium stellenboschense* sp. nov. and *Bifidobacterium biavatii* sp. nov. isolated from faeces of common marmoset (*Callithrix jacchus*) and red-handed tamarin (*Saguinus midas*). *Systematic and Applied Microbiology* **35**:92-97.

- Engevik et al. 2019. *Bifidobacterium dentium* Fortifies the Intestinal Mucus Layer via Autophagy and Calcium Signaling Pathways. *mBio* (e01087-19) DOI: 10.1128/mBio.01087-19.
- Felbinger Ch, Kutzsche F, Mönkediek S, Fischer M. 2020. Genetic profiling: Differentiation and identification of hazelnut cultivars (*Corylus avellana* L.) using RAPD-PCR. *Food control* DOI: doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106791.
- Felis EG, Dellaglio F. 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology* **8**:44-61.
- Gibson GR, et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **14**:491-502.
- Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics. *Nutrition research reviews* **17**:259-275.
- Gomes AMP, Malcata FX. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* **10**:139-157.
- Huang G, Pan H, Zhu Z, Li Q. 2020. The complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* LTBL16, a potential probiotic strain from healthy centenarians with strong antioxidant activity. *Genomics* **112**:769-773.
- Chaplin AV, Brzhozovskii AG, Parfenova TV, Kafarskaia LI, Volodin NN, Shkoporov AN, Ilina EN, Efimov BA. 2015. Species diversity of bifidobacteria in the intestinal microbiota studied using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Annals of the Russian academy of medical sciences* **70**:435-440.
- Chenoll E, Rivero M, Codoñer FM, Martinez-Blanch JF, Ramón D, Genovés S, Muñoz JAM. 2015. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Strain CECT 7210, a Probiotic Strain Active against Rotavirus Infections. *Genome announcements* (e00105-15) DOI: 10.1128/genomeA.00105-15.
- Janda JM, Abbott SL. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:2761-2764.
- Jarocki P, Podleśny M, Komoń-Janczara E, Kucharska J, Glibowska A, Targoński Z. 2016. Comparison of various molecular methods for rapid differentiation of intestinal bifidobacteria at the species, subspecies and strain level. *BMC Microbiology* **16**:1-11.
- Julák J. 1997. Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy. Karolinum, Praha.
- Kang J, Chung WH, Lim TJ, Lim S, Nam YD. 2017. Complete genome sequence of the *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BL3, preventive probiotics for acute colitis and colon cancer. *New microbes and new infections* **19**:34-37.

- Killer J, Mekadim C, Bunešová V, Mrázek J, Hroncová Z, Vlková E. 2019. Glutamine synthetase type I (glnAI) represents a rewarding molecular marker in the classification of bifidobacteria and related genera. *Folia Microbiologica* **65**:143-151.
- Kim MS, Roh SW, Bae JW. 2010. *Bifidobacterium stercoris* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**:2823-2827.
- Kim MJ, Ku S, Kim SY, Lee HH, Jin H, Kang S, Li R, Johnston TV, Park MS, Ji GE. 2018. Safety Evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI. *International Journal of Molecular Sciences* **19**:1-22.
- Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E. 2005. Genomic Features of Lactic Acid Bacteria Effecting Bioprocessing and Health. *FEMS microbiology reviews* **29**:393-409.
- Koubková L, Vojtěšek B, Vyzula R. 2014. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klinická onkologie* **27**:61-68.
- Křížová J, Španová A, Rittich B. 2008. RAPD and rep-PCR Fingerprinting for Characterization of *Bifidobacterium* Species. *Folia Microbiologica* **53**:99-104.
- Kulski JK. 2016. Next Generation Sequencing – Advances, Applications and Challenges. Intech Open DOI: 10.5772/60489.
- Chui L, Li V. 2015. Chapter 8 - Technical and Software Advances in Bacterial Pathogen Typing. *Methods in Microbiology* **42**:289-327.
- Li W, Raoult D, Fournier PE. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews* **33**:892-916.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**:1-11.
- Parte AC. 2018. LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**:1825-1829.
- Lugli GA et al. 2018. Phylogenetic classification of six novel species belonging to the genus *Bifidobacterium* comprising *Bifidobacterium anseris* sp. nov., *Bifidobacterium criceti* sp. nov., *Bifidobacterium imperatoris* sp. nov., *Bifidobacterium italicum* sp. nov., *Bifidobacterium margollesii* sp. nov. and *Bifidobacterium parmae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **41**:173-183.
- Lugli GA, Duranti S, Milani Ch, Turrone F, Viappiani A, Mangifesta M, Sinderen DV, Ventura M. 2014. The Genome Sequence of *Bifidobacterium moukalabense* DSM 27321 Highlights the Close Phylogenetic Relatedness with the *Bifidobacterium dentium* Taxon. *Genome Announcements* (e00048-14) DOI: 10.1128/genomeA.00048-14.
- Maiden MCJ et al. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:3140-3145.

- Masco L, Huys G, Gevers D, Verbruggen L, Swings J. 2003. Identification of *Bifidobacterium* Species Using rep-PCR Fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology* **26**:557-563.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R. 2003. Genus-and Species-Specific PCR Primers for the Detection and Identification of Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **4**:61-69.
- MBT Compass IVD: Návod k použití. 2016. Bruker Daltonik, Německo.
- Mekadim Ch, Bunešová V, Vlková E, Hroncová Y, Killer J. 2019. Genetic marker-based multi-locus sequence analysis for classification, genotyping, and phylogenetics of the family *Bifidobacteriaceae* as an alternative approach to phylogenomics. *Antonie van Leeuwenhoek* **112**:1784-1800.
- Milani Ch, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Ferrario CH, Sinderen DV, Ventura M. 2016. Genomics of the Genus *Bifidobacterium* Reveals Species-Specific Adaptation to the Glycan-Rich Gut Environment. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:980-991.
- Mitchelson K, Moricca S. 2008. DNA Fingerprinting Methods for Microbial Pathogens: Application to Diagnostics, Taxonomy and Plant Disease Management. Pages 333-355 in Ciancio A, Mukerji KG, editors. *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*. Springer, Amsterdam.
- Modesto M, Michelini S, Oki K, Biavati B, Watanabe K, Mattarelli P. 2018. *Bifidobacterium catulorum* sp. nov., a novel taxon from the faeces of the baby common marmoset (*Callithrix jacchus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**:575–581.
- Modrackova N, Makovska M, Mekadim Ch, Vlkova E, Tejnecky V, Bolechova P, Bunesova V. 2019. Prebiotic potential of natural gums and starch for bifidobacteria of variable origins. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* (100199) DOI: 10.1016/j.bcdf.2019.100199.
- Montalban-Arques A, De Schryver P, Bossier P, Gorkiewicz G, Mulero V, Gatlin DM, Galindo-Villegas J. 2015. Selective Manipulation of the Gut Microbiota Improves Immune Status in Vertebrates. *Frontiers in Immunology* **6**:1-14.
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**:56-65.
- Nagpal R, Kurakawa T, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, Nomoto K, Yamashiro Y. 2017. Evolution of gut *Bifidobacterium* population in healthy Japanese infants over the first three years of life: a quantitative assessment. *Scientific Reports* **7**:1-11.
- Nomoto R, Takano S, Tanaka K, Tsujikawa Y, Kusunoki H, Osawa R. 2017. Isolation and identification of *Bifidobacterium* species from feces of captive chimpanzees. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* **36**:91-99.
- O'Callaghan A, Sinderen DV. 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7**:1-23.
- O'Neill I, Schofield Z, Hall LJ. 2017. Exploring the role of the microbiota member *Bifidobacterium* in modulating immune-linked diseases. *Emerging Topics in Life Sciences* **1**:333-349.

- Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology* **52**:7577-7587.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, Sinderen DV. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition* **6**:285-306.
- Pechar R, Rada V, Parafati L, Musilova S, Bunesova V, Vlkova E, Killer J, Mrazek J, Kmet V, Svejstil R. 2014. Mupirocin-mucin agar for selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*. *International Journal of Food Microbiology* **191**:32-35.
- Rakická M, Marko A, Šturdík E, Danihelová M, Moškovská S, Juríková L. 2015. Vplyv fermentácie bakteriami mliečneho kysnutia na chemickú kompozíciu potravín. *Chemické listy* **109**:371-376.
- Robles C, Park S, Koreen L, Perlin DS. 2004. Multilocus Sequence Typing Is a Reliable Alternative Method to DNA Fingerprinting for Discriminating among Strains of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:2480-2488.
- Rocco L, Valentino IV, Scapigliati G, Stingo V. 2014. RAPD-PCR analysis for molecular characterization and genotoxic studies of a new marine fish cell line derived from *Dicentrarchus labrax*. *Cytotechnology* **66**:383-393.
- Rodriguez CI, Martiny JBH. 2020. Evolutionary relationships among bifidobacteria and their hosts and environments. *BMC Genomics* **21**:1-12.
- Rosypal S. 1981. *Obecná bakteriologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, Diji JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveillance* **18**:1-15.
- Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Collado MC, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Zagorec M. 2007. Low-pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of *Bifidobacterium longum* Biotype longum. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:6450-6459.
- Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A. 2017. Probiotics, Gut Microbiota, and Their Influence on Host Health and Disease. *Molecular nutrition & food research* **61**:1-15.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**:5463-5467.
- Salminen S, Wright A, Ouwehand A. 2004. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Scardovi V, Crociani F. 1974. *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: Three New Species and Their Deoxyribonucleic Acid Homology Relationships. *International Journal Of Systematic Bacteriology* **24**:6-21.

- Scardovi V, Trovatelli LD. 1969. New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* **123**:64-88.
- Scott KP et al. 2019. Developments in understanding and applying prebiotics in research and practice—an ISAPP conference paper. *Journal of Applied Microbiology* **128**:934-949.
- Segawa T, Fukuchi S, Bodington D, Tsuchida S, Nguema PPM, Mori H, Ushida K. 2019. Genomic Analyses of *Bifidobacterium moukalabense* Reveal Adaptations to Frugivore/Folivore Feeding Behavior. *Microorganisms* **7**:1-13.
- Solař S. 2010. Prebiotika a probiotika v klinické praxi. *Medicína pro praxi*. **7**:14-18.
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno.
- Tran A, Alby K, Kerr A, Jones M, Gilligan PH. 2015. Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **53**:2473-2479.
- Turroni F, Duranti S, Bottacini F, Guglielmetti S, Sinderen DV, Ventura M. 2014. *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in Microbiology* **5**:1-8.
- Turroni F, Milani Ch, Duranti S, Mahony J, Sinderen DV, Ventura M. 2018. Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. *Trends in Microbiology* **26**:339-350.
- Uenishi G, Fujita S, Ohashi G, Kato A, Yamauchi S, Matsuzawa T, Ushida K. 2007. Molecular Analyses of the Intestinal Microbiota of Chimpanzees in the Wild and in Captivity. *American Journal of Primatology* **69**:367-376.
- Urwin R, Maiden MCJ. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* **11**:479-487.
- Ushida K, Uwatoko Y, Adachi Y, Soumah AG, Matsuzawa T. 2010. Isolation of Bifidobacteria from feces of chimpanzees in the wild. *The Journal of General and Applied Microbiology* **56**:57-60.
- Ventura M, Sinderen DV, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**:205-223.
- Ventura M, Turroni F, Zomer A. 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 Genome Sequence Reflects Its Genetic Adaptation to the Human Oral Cavity. *PLoS Genet* (e1000785) DOI: 10.1371/journal.pgen.1000785.
- Vlková E, Rada V. 2013. *Cvičení z potravinářské mikrobiologie*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Ward P, Roy D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Le Lait* **85**:23-32.
- Wilson B, Whelan K. 2017. Prebiotic Inulin-Type Fructans and Galacto-Oligosaccharides: Definition, Specificity, Function, and Application in Gastrointestinal Disorders. *Journal of gastroenterology and hepatology* **32**:64-68.

Yasmin I et al. 2020. In Vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk. *Microorganisms* **8**:1-21.

Zhou X, Li Y. 2015. Atlas of Oral Microbiology. Elsevier, Zhejiang.

Použité obrázky

Kim MJ, Ku S, Kim SY, Lee HH, Jin H, Kang S, Li R, Johnston TV, Park MS, Ji GE. 2018. Safety Evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI. *International Journal of Molecular Sciences* **19**:1-22.

Nykrýnová M. 2018. Genotypizace kmenů bakterie *Klebsiella pneumoniae*. [MSc. Thesis]. Vysoké učení technické v Brně, Brno.

Ridacom. 2020. ANAERO test 23 - kit for identification of anaerobic bacteria. Available from <https://ridacom.com/en/products/view/6114> (accessed April 2020).

Xxpress NGx. 2017. Polymerase Chain Reaction: The Past, Present and Future. Available from <https://www.xxpresspcr.com/all-news/polymerase-chain-reaction-the-past-present-and-future/> (accessed April 2020).

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

F6PPK = fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza

HMOs (Human milk oligosacharides) = Oligosacharidy mateřského mléka

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) = Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

PCR (Polymerase chain reaction) = Polymerázová řetězová reakce

RAPD-PCR (Random amplification of polymorphic DNA PCR) = Analýza náhodně amplifikované polymorfni DNA

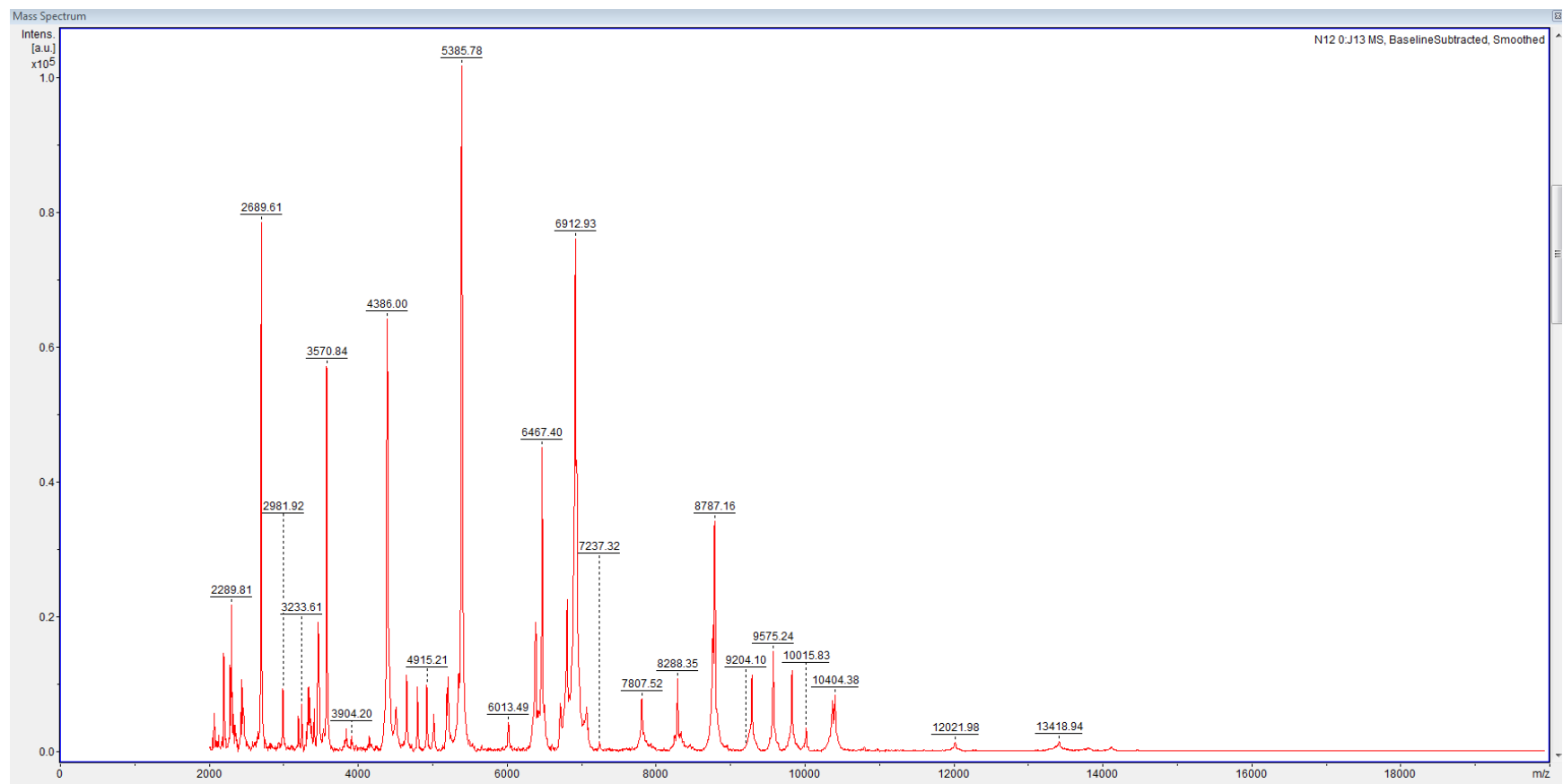
REP-PCR (Repetitive element sequence-based PCR) = PCR založené na repetitivních sekvencích

MLST (Multilocus sequence typing) = Multilokusová sekvenční typizace

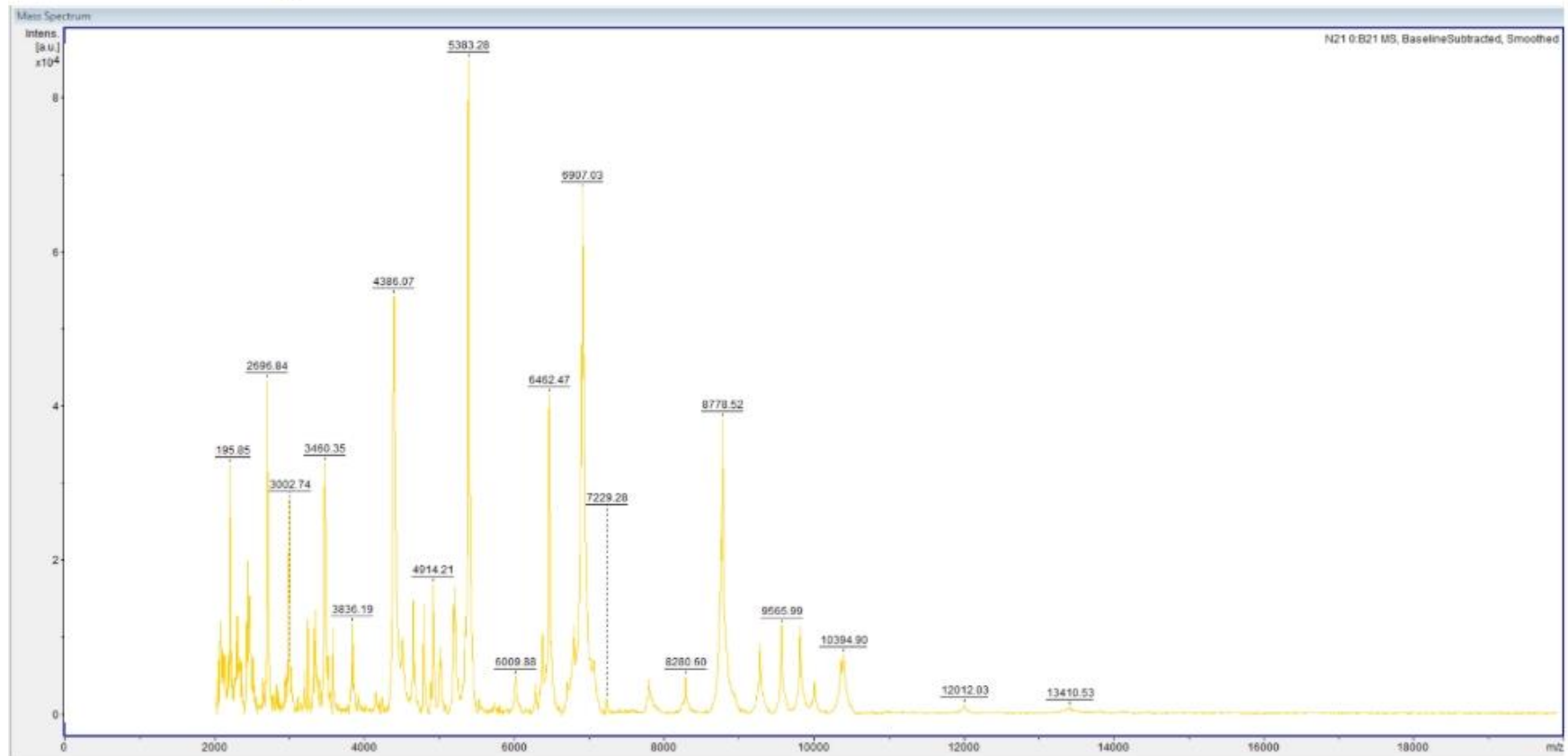
10 Samostatné přílohy

Seznam příloh

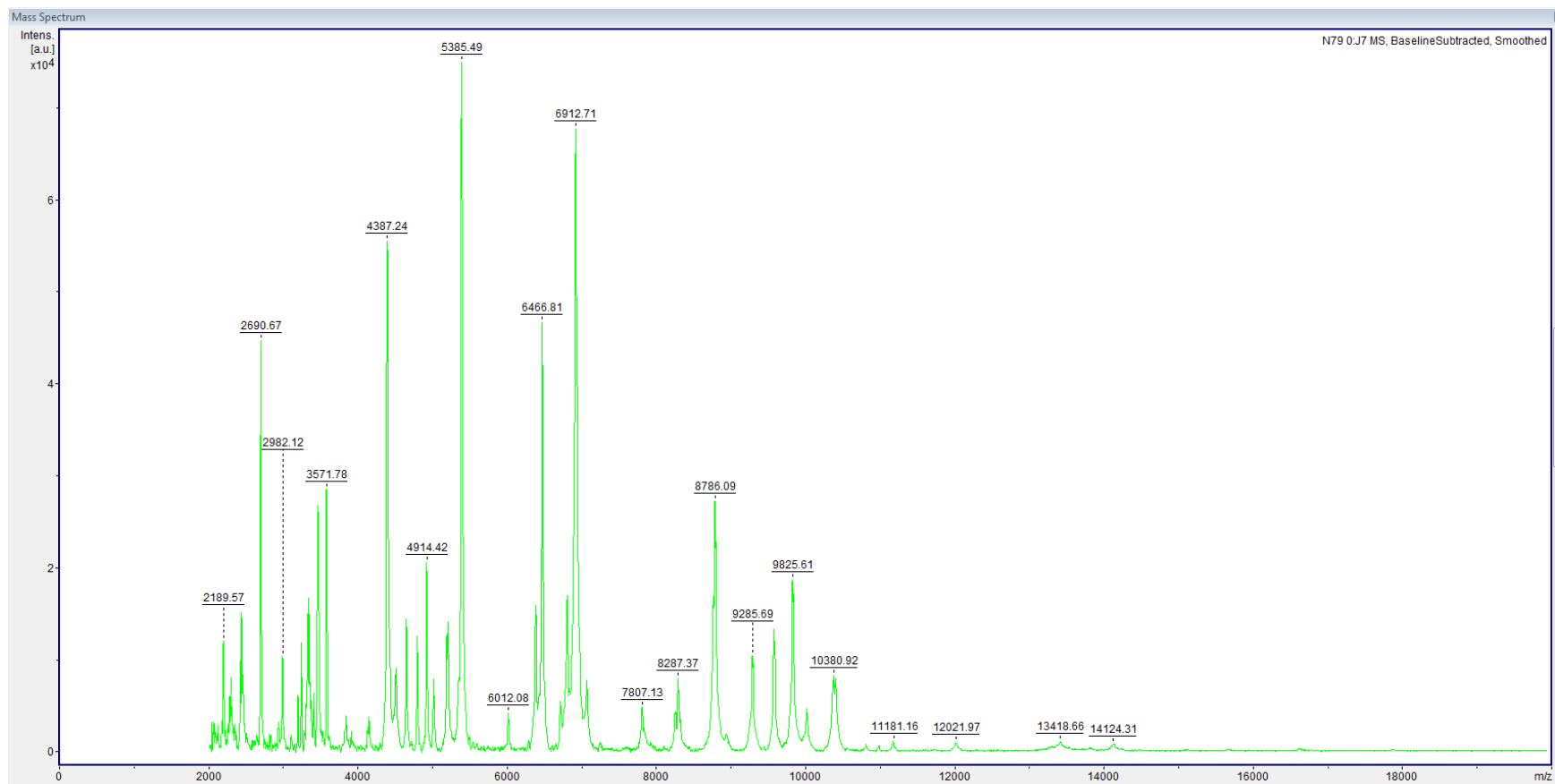
Příloha 1 Ukázka spekter (kmen N12).....	I
Příloha 2 Ukázka spekter (kmen N21).....	II
Příloha 3 Ukázka spekter (kmen N79).....	III
Příloha 4 Ukázka spekter (kmen N105).....	IV
Příloha 5 Ukázka spekter (kmen FD1)	V
Příloha 6 Ukázka spekter	VI
Příloha 7 Ukázka spekter	VII



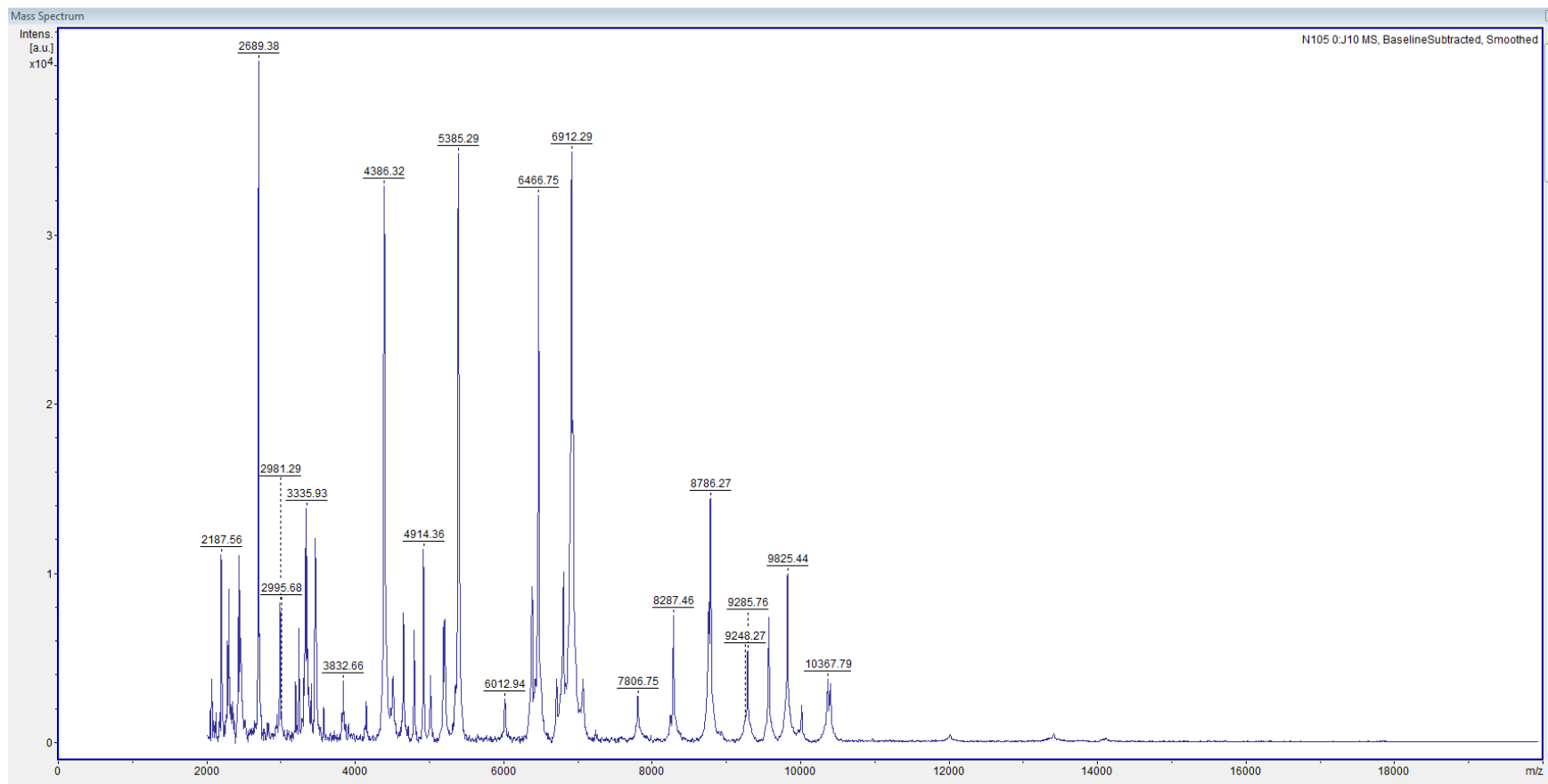
Příloha 1 Ukázka spekter (kmen N12)



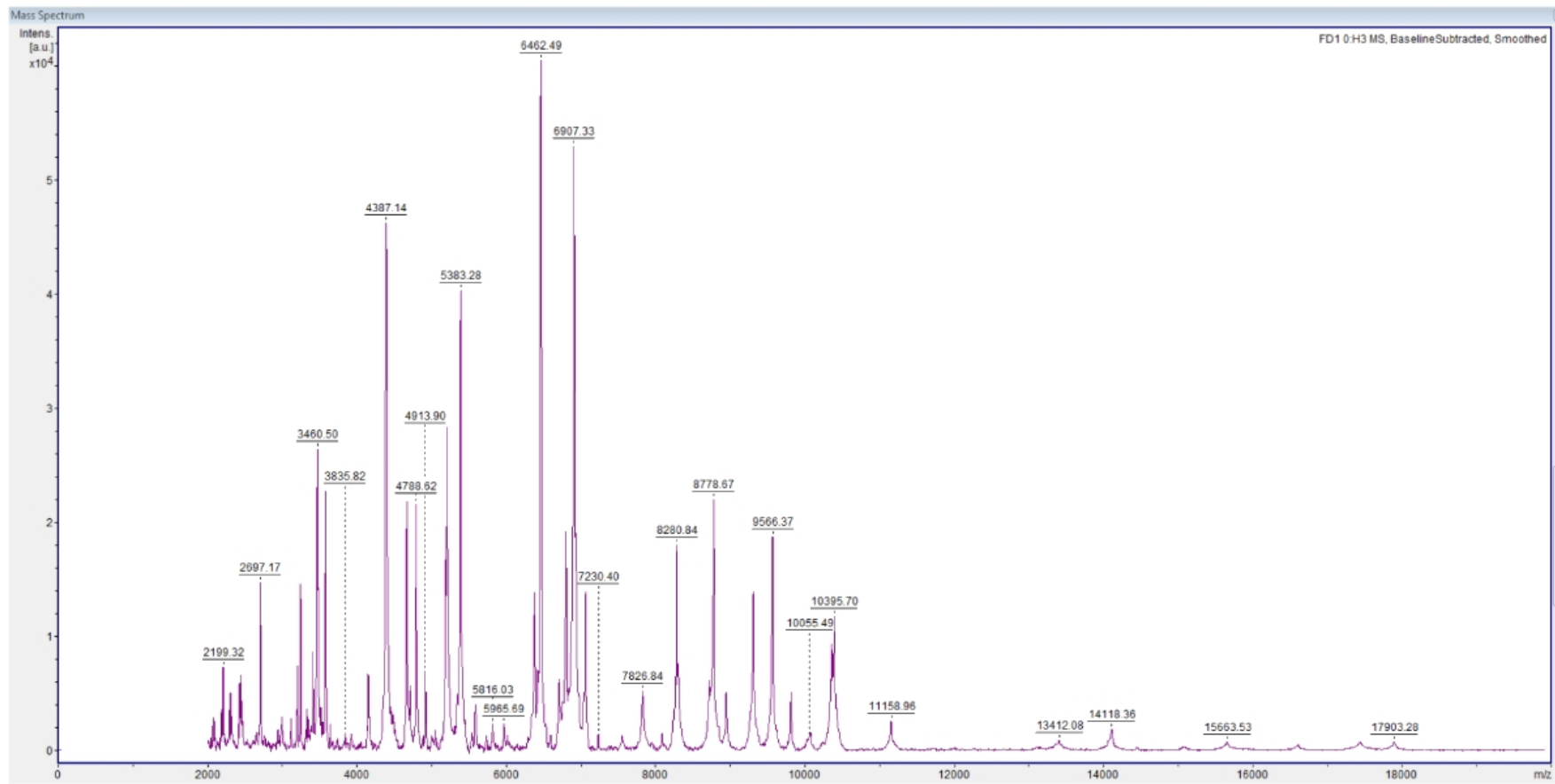
Příloha 2 Ukázka spekter (kmen N21)



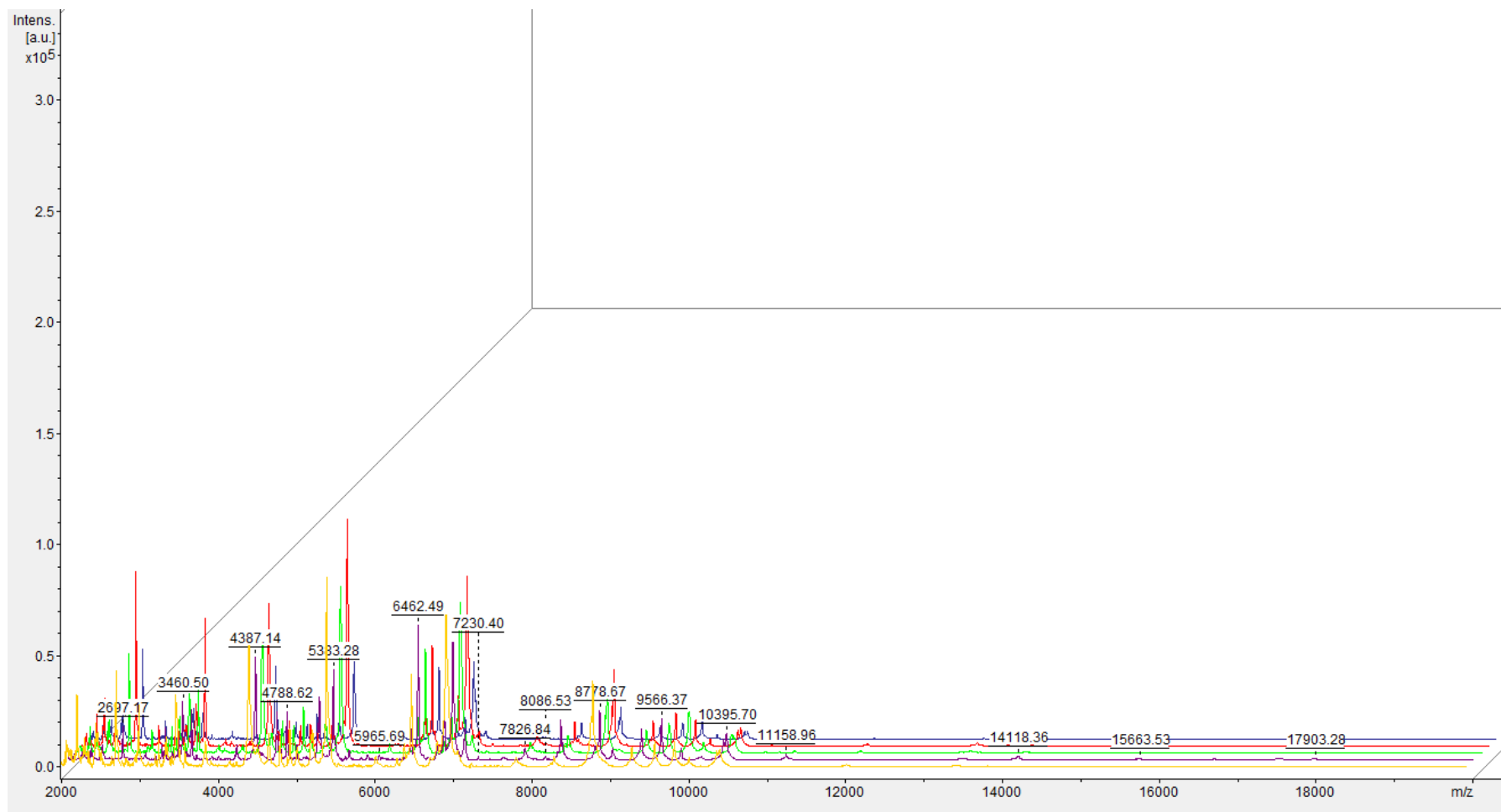
Příloha 3 Ukázka spekter (kmen N79)



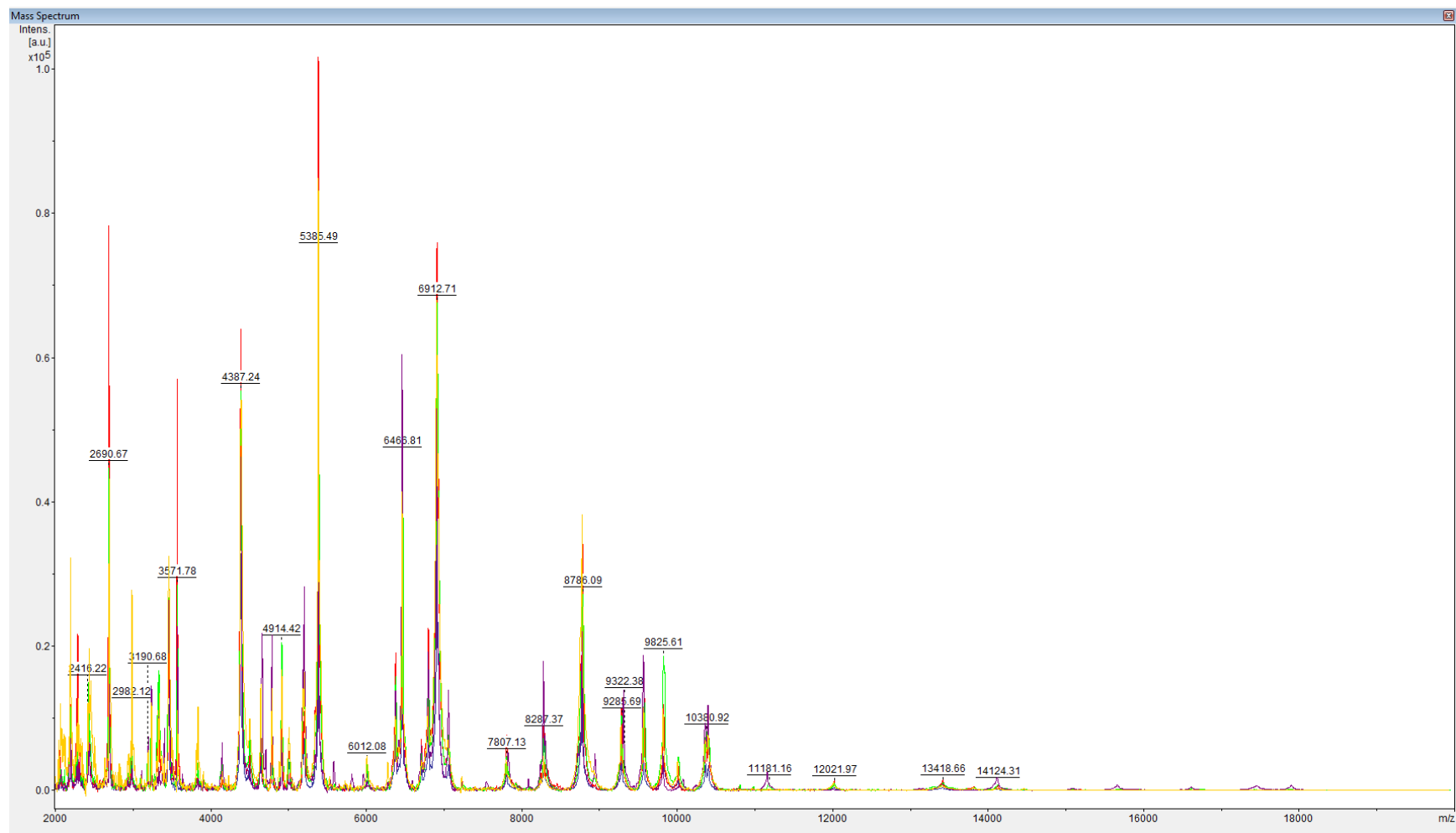
Příloha 4 Ukázka spekter (kmen N105)



Příloha 5 Ukázka spekter (kmen FD1)



Příloha 6 Ukázka spekter



Příloha 7 Ukázka spekter