

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie výživy a dietetiky



Druhová diverzita bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka v závislosti na dietě

Bakalářská práce

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

Autor práce: Lada Kratochvílová

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Druhá diverzita bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka v závislosti na dietě" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.4. 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Věře Bunešové, Ph.D. za její cenné rady a čas strávený v laboratoři a rodině Šulcových za jejich ochotu a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat dárcům vzorků, bez nichž by nebylo sepsání této bakalářské práce možné.

Druhová diverzita bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka v závislosti na dietě

Souhrn

Ve své bakalářské práci se zabývám druhovou diverzitou bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka v závislosti na dietě.

Pro tuto práci byly použity vzorky stolice dárců na konvenční dietě, vegetariánů a jednoho vegana. Jednalo se celkem o 21 vzorků. Vzorky bifidobakterií a laktobacilů byly izolovány pomocí kultivace vzorků stolice na selektivních médiích. Získané bakteriální izoláty byly poté charakterizovány a finální identifikace byla provedena metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS, kdy jsme předpokládaly rozdíl mezi kvantitativním a kvalitativním zastoupením bifidobakterií a laktobacilů.

Konvenčně se stravující osoby měly průměrný počet bifidobakterií $9,36 \pm 0,57$ log KTJ/g stolice a průměrný počet laktobacilů $5,00 \pm 1,17$ log KTJ/g stolice. U vegetariánů byly zjištěny podobné výsledky, a to $9,55 \pm 0,28$ log KTJ/g stolice bifidobakterií a laktobacilů $4,59 \pm 1,13$ log KTJ/g stolice. Vegan dosahoval hodnot u bifidobakterií $10,20$ log KTJ/g stolice a u laktobacilů hodnot $5,24$ log KTJ/g stolice.

Statistickým zpracováním údajů bylo zjištěno, že kvantitativní rozdíl mezi těmito skupinami je nevýznamný. U bifidobakterií byly největší počty zjištěny u vegana, druhá nejvyšší hodnota byla u vegetariána a nejnižší hodnota byla u konvenčně se stravující osoby. U laktobacilů byla největší hodnota naměřena u vegana, druhá nejvyšší hodnota byla zjištěna překvapivě u konvenčně se stravující osoby a nejnižší hodnota byla u vegetariána.

Na základě výsledků identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS bylo stanoveno, že u konvenčně se stravujících osob převládal z rodu *Bifidobacterium* druh *Bifidobacterium longum* a u rodu *Lactobacillus* byl nejčastěji detekován druh *Lactobacillus plantarum*. U osob stravujících se vegetariánskou stravou převládal opět druh *Bifidobacterium longum*. U laktobacilů byly nejvíce zastoupené dva druhy a to *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Vegan byl pouze jeden dárcem, proto není možné uvést převládající druh.

Ze zjištěných údajů vyplývá, že druhové zastoupení bifidobakterií je poměrně stabilní v závislosti na dietě. Jak v trávicím traktu lidí na konvenční dietě tak i u vegetariánů byly detekovány druhy bifidobakterií typické pro mikrobiotu dospělého jedince. Zastoupení laktobacilů bylo mnohem variabilnější a jednalo se o rozdíly závislé na dietě jedince a ne skupiny.

Klíčová slova: dieta, diverzita, bifidobakterie, laktobacily, MALDI-TOF MS

Species diversity of bifidobacteria and lactobacilli in the gastrointestinal tract of human depending on the diet

Summary

In my bachelor thesis I deal with the species diversity of bifidobacteria and lactobacilli in the digestive tract of humans depending on the diet.

Twenty-one stool samples of donors which have been consuming a conventional commercial, vegetarian and vegan diet were tested for this work. Totally, 21 isolates of bifidobacteria and lactobacilli were obtained by cultivation of the faecal samples on selective media. The isolates were characterized and a final identification was performed by mass spectrometry MALDI-TOF MS. A difference between quantitative occurrence and species composition of bifidobacteria and lactobacilli was expected.

In the samples of donors on the conventional commercial diet were bifidobacteria detected in the average number 9.36 ± 0.57 log CFU/ g of faeces and lactobacilli 5.00 ± 1.17 log CFU/ g of faeces. Similar results were found in the samples of vegetarians which contained bifidobacteria in the count 9.55 ± 0.28 log CFU/ g of faeces and lactobacilli 4.59 ± 1.13 log CFU/ g of faeces. Vegan reached the values of bifidobacteria 10.20 log CFU/ g of faeces and lactobacilli with the value 5.24 CFU/ g of faeces.

Using statistical data processing was found out that the quantitative difference between these groups is insignificant. The largest amounts of bifidobacteria were found in vegan samples, the second highest values were found for vegetarians and the lowest value was found in the samples of donors on the conventional diet. Amount of lactobacilli reached the largest value in vegan samples, the second highest value was surprisingly found in the stool samples of donors on the conventional diet. The lowest amounts were found in vegetarian samples.

Based on the results of identification using mass spectrometry MALDI-TOF MS was found out, that species *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus plantarum* were frequently detected in samples of the donors on commercial diet. In samples of vegetarians was also dominant the species *Bifidobacterium longum*. For the genus *Lactobacillus* were most abundant two species; *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus*. Because we had only one vegan donor, it was not possible to indicate the predominant species.

The obtained data showed that the genus composition of bifidobacteria is relatively stable depending on the diet. In the digestive tract of people on the conventional diet and even vegetarians were detected bifidobacteria species common for the microbiota of adults. Lactobacilli were more varied depending on the diet of the donor.

Keywords: diet, diversity, bifidobacteria, lactobacilli, MALDI-TOF MS

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Hypotéza.....	9
3. Cíle bakalářské práce.....	10
Cíl teoretické části.....	10
Cíl praktické části.....	10
4. Literární rešerše.....	11
4.1. Mikroflóra trávicího traktu člověka.....	11
4.1.1. Kvantitativní a kvalitativní složení mikroflóry v jednotlivých částech trávicího ústrojí.....	11
4.2. Význam mikroflóry trávicího traktu.....	14
4.2.1. Význam bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka.....	14
4.3. Bifidobakterie.....	14
4.3.1. Zařazení.....	15
4.3.2. Vlastnosti.....	15
4.3.3. Růst.....	16
4.3.4. Výskyt.....	16
4.3.5. Použití.....	16
4.4. Laktobacily.....	17
4.4.1. Zařazení.....	17
4.4.2. Vlastnosti.....	18
4.4.3. Růst.....	19
4.4.4. Výskyt.....	19
4.4.5. Použití.....	20
4.4.6. Nežádoucí účinky.....	20
4.5. Vliv výživy na rozmanitost bakteriálního zastoupení v trávicím traktu.....	20
4.5.1. Vliv vlákniny na mikrobiální diverzitu.....	21
4.6. Vláknina.....	22
4.7. Hmotnostní spektrometrie MALDI – TOF MS.....	23
4.7.1. Identifikace bakterií pomocí hmotnostní spektrofotometrie MALDI- TOF.....	23
4.7.2. Příprava vzorku pro MALDI – TOF MS.....	23
4.7.3. Princip metody.....	24
4.7.4. Vyhodnocení výsledků.....	25

5. Materiál a metody.....	26
5.1. Původ a charakterizace vzorků.....	26
5.2. Izolace bakterií ze selektivních agarů.....	27
5.3. Identifikace bifidobakterií na úrovni rodu.....	27
5.3.1. Postup metody testu F6PPK.....	27
5.4. Postup přípravy vzorku pro identifikaci metodou MALDI-TOF MS.....	28
5.5. Výstupní data analýzy MALDI-TOF MS.....	28
6. Výsledky.....	30
6.1. Výskyt bifidobakterií.....	31
6.2. Výskyt laktobacilů.....	33
7. Diskuze.....	40
8. Závěr.....	44
9. Použitá literatura.....	45

1. Úvod

Bakteriální zastoupení v trávicím traktu člověka je v jeho různých částech kvantitativně i kvalitativně variabilní. Mezi nejvíce mikrobiálně aktivní část trávicího traktu patří tenké a tlusté střevo. V tomto prostředí žije velké množství jak pozitivně působících bakterií tak potenciálně patogenních bakterií, které významným způsobem ovlivňují metabolismus a zdravotní stav hostitele.

Mikroflóra trávicího traktu má nezastupitelnou roli v trávení potravy, produkci potřebných látek jako jsou například vitamíny B₁₂ a K a v neposlední řadě chrání slizniční povrch před útokem možných patogenů. Mezi nejvýznamnější pozitivní bakterie se řadí rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Tyto bakterie svou přítomností a metabolity snižují pH tráveniny, čímž znesnadňují růst potenciálních patogenů, zlepšují motilitu, zvyšují prokrvení sliznice střeva, využívají nutrienty potenciálních patogenů a chrání povrch sliznice tím, že adherují na povrch sliznic v místě možné adherence patogenů. Pro tyto vlastnosti jsou ceněny a mohou se přidávat do potravy ve formě probiotik v potravinových doplňcích.

Jedním z nejdůležitějších faktorů, který má vliv na složení tráveniny a tím i na složení substrátu pro mikroflóru trávicího traktu je druh diety, kterou člověk konzumuje. Někteří lidé se za svého života rozhodnou vyřadit ze svého jídelníčku maso či dokonce veškeré živočišné produkty. Místo živočišných produktů poté konzumují potraviny rostlinného původu. Tyto potraviny mají většinou vyšší zastoupení vlákniny. Proto se dá díky substrátovým preferencím bakterií předpokládat, že při změně množství vlákniny ve střevě se zároveň změní i druhové a kvantitativní zastoupení bifidobakterií a laktobacilů.

Druhové zastoupení je možné pro potřeby výzkumu zjistit různými metodami vhodnými k detekci, identifikaci a popisu bakterií. Jedny z nejčastěji používaných metod jsou FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), PCR (polymerázová řetězová reakce) a sekvenování 16S rDNA.

V poslední době nabývá na významu metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS. Tato metoda se stala nepostradatelnou nejen v oblasti studia a identifikace biopolymerů, nízkomolekulárních organických i anorganických látek, ale především v oblasti zkoumání a identifikace bakterií. Jednou z hlavních předností této metody je její rychlost a přesné výsledky.

2. Hypotéza

Strava je hlavním faktorem ovlivňujícím složení a metabolismus střevní mikrobioty. Substrátové preference bakterií jsou druhově specifické. Lze tedy očekávat rozdílné druhové zastoupení bifidobakterií a laktobacilů ve stolici lidí na konvenční dietě, vegetariánů či veganů.

3. Cíle bakalářské práce

Cíl teoretické části

Cílem teoretické části bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o mikroflóře trávicího traktu člověka se zaměřením na rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Dále pak vyhledat dostupné informace o výzkumech zaměřujících se na vliv diety na množství a druhovou diverzitu bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka a porovnat je s výsledky vlastního výzkumu.

Cíl praktické části

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo získat a porovnat informace o kvantitativním a druhovém zastoupení bifidobakterií a laktobacilů ve vzorcích vegetariánů a konvenčně se stravujících osob.

4. Literární rešerše

4.1. Mikroflóra trávicího traktu člověka

Mikroflóra trávicího ústrojí je komplexní ekosystém, zahrnující anaerobní i aerobní bakterie, houby, viry a mnoho dalších mikroorganismů. Metody sekvenční analýzy ribozomální RNA a DNA ukazují, že počet mikrobiálních kmenů obsažených ve střevní mikroflóře může dosahovat až 40 000. To znamená, že všichni lidé mají na povrchu sliznic trávicího traktu 10krát více buněk, než činí celkový počet buněk v lidském těle a 100krát více genů, než je v celém lidském genomu (Mai and Draganov, 2009).

Hmotnostně se dají tyto mikroorganismy kvantifikovat na 1 až 1,5 kg bakterií v průměrném střevě dospělého jedince (Nováková, n.d.). Bakterie trávicího traktu tvoří až 60 % hmotnosti stolice (Krejsek et al., 2007).

Mikroflóra trávicího traktu se v průběhu života vyvíjí a mění. Trávicí trakt je v děloze matky aseptický. V průběhu porodu se do něj často dostávají první bakterie. Trávicí trakt může být infikován přirozenou mikroflórou vagíny případně i trávicího traktu matky. Další možnost infikování trávicího traktu kojence je po napití se mleziva s případnými nečistotami z povrchu bradavky. Následný vývoj mikroflóry je zcela individuální a závisí na skladbě potravy, pH, lécích, teplotě, vnějších podmínkách, stáří organismu, interakcemi mezi mikroorganismy a mnoha dalších faktorech (Krejsek et al., 2007).

4.1.1. Kvantitativní a kvalitativní složení mikroflóry v jednotlivých částech trávicího ústrojí

Trávicí trakt je uzpůsoben na přijímání, zpracování a vylučování potravy. Skládá se z několika částí. Začátek tvoří dutina ústní, která dále pokračuje v hltan, který přechází v jícen, žaludek, oddíly tenkého a tlustého střeva. Trávicí trubice končí posledním oddílem tlustého střeva, konečníkem. V každé této části žije větší či menší počet mnoha druhů bakterií (Krejsek et al., 2007).

Dutina ústní

Dutina ústní je před narozením sterilní. Po narození dochází ke kolonizaci ústní dutiny laktobacily a streptokoky (Hull and Chow, 2005). V ústní dutině jich žije cca 10^{11} /gram tkáně, což je podobné množství, jako bakterií v tlustém střevě (Bednář et al., 1996). Podstatná část bakterií žije v plaku zubů. Z bakterií zde můžeme nalézt početnou

anaerobní mikroflóru skládající se z druhů *Eubakterium*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacteriu*, *Treponema*, *Wolinela*, *Arachnie*, *Spirochetaes*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces a Fusobacterium* (Bednář et al., 1996; Murray et al., 2007). Z aerobních bakterií zde můžeme nalézt zástupce rodů *Streptococcus*, *Haemophilus* a *Neisseria* (Murray et al., 2007).

Hltan a jícen

V těchto částech žije poměrně malý počet bakterií. Kvantitativně lze počet bakterií vyjádřit na 10^2 - 10^4 bakterií. Tyto bakterie se dovnitř dostanou společně s potravou při polknutí nebo při dávení. Malý počet bakterií je zřejmě dán horizontální polohou orgánu a rychlosti procházení potravy (Bednář et al., 1996). Ze zástupců zde můžeme najít *Firmicutes*, *Lactobacillus*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Streptococcus* a *Fusobacteria* (Pei et al., 2003; Shigwedha and Jia, 2013)

Žaludek

V žaludku nalezneme kyselinu chlorovodíkovou o hodnotě 2 - 4 pH, která funguje jako přirozená obrana těla proti mikroorganismům (Bednář et al., 1996). I přes toto nehostinné prostředí zde žijí některé druhy laktobacilů, aerobních stafylokoků, koliformních bakterií a kvasinek (Švestka, 2007). V 1 ml tekutiny můžeme nalézt 10^1 až 10^3 bakterií (Zbořil, 2005). Mezi patogenní organismy osidlující žaludek patří *Helicobacter pylori*, která může způsobit gastritidu, či rakovinu žaludku. Tato bakterie produkuje enzym ureázu, který katalyzuje rozklad močoviny na oxid uhličitý a amoniak čímž neutralizuje kyselé žaludeční šťávy (Radosz-Komoniewska et al., 2005).

Tenké střevo

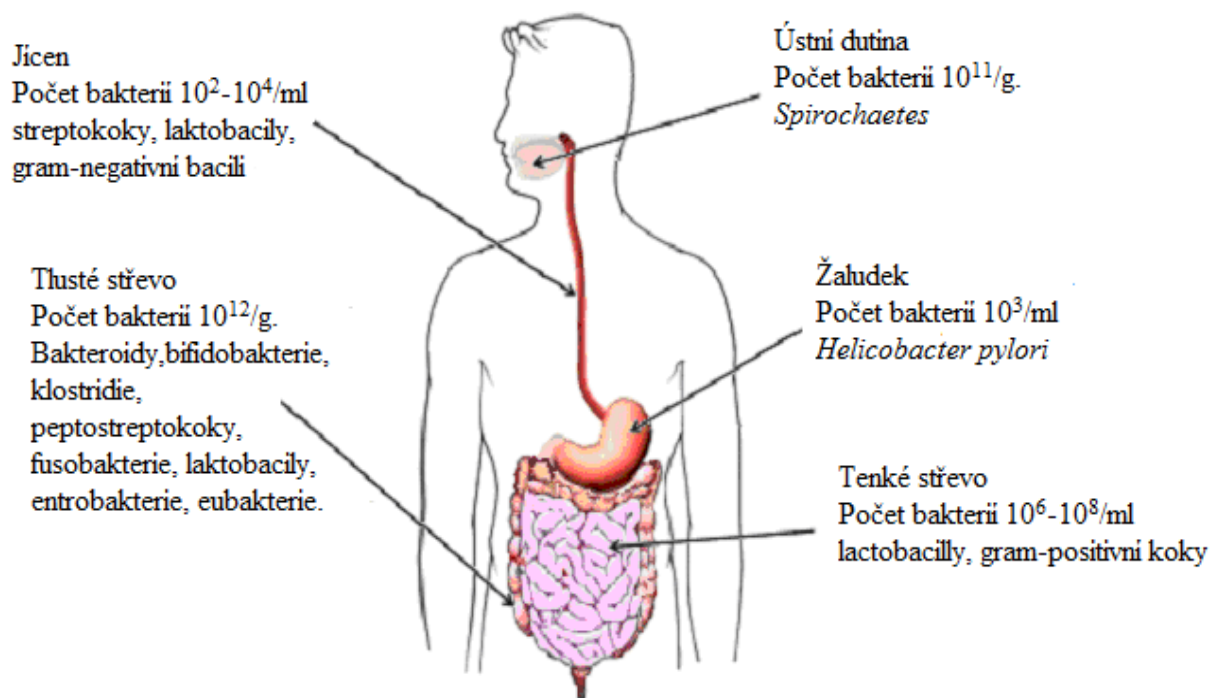
Tenké střevo se dělí na tři části - dvanáctník, lačník a kyčelník. Jednotlivé oddíly se od sebe odlišují v kvalitativním a kvantitativním zastoupení mikroorganismů. V dvanáctníku se nachází jen velmi malá koncentrace bakterií. Tato skutečnost je způsobena kyselostí tráveniny, která přichází ze žaludku, rychlou peristaltikou a žlučí (Bednář et al., 1996). V lačníku se nachází již větší zastoupení bakterií s největším zastoupením rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* a *Candida*. Kyčelník nejčastěji osidlují *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Candida* a *Clostridium* (Zbořil, 2005). Distálním směrem přibývá bakterií.

U ileocekální chlopně již dosahuje počet bakterií 10^6 až 10^8 /gram tráveniny (Bednář et al., 1996).

Tlusté střevo

Tlusté střevo obsahuje kvalitativně a kvantitativně nejvíce zastoupenou mikroflóru. Žije zde více než 500 druhů bakterií, z nich hlavní mikroflóru představuje cca 30-40 nejběžnějších druhů (Ojetti et al., 2009). Počet bakterií nelze přesně stanovit. Lze však říci, že se počet bakterií pohybuje okolo 10^{12} až 10^{14} bakterií na 1 gram stolice (Ojetti et al., 2009; Shigwedha and Jia, 2013). Převažují zde anaerobní druhy bakterií. Mezi nejvýznamnější zástupce osidlující tlusté střevo patří *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* a *Saccharomyces* (Švestka, 2007). Dále pak *Propionibacterium* a *Aktinomycety* (Zbořil, 2005). Toto osídlení vytváří metabolity v podobě kyseliny mléčné, máselné a octové, které mají pozitivní vliv na další skladbu mikroflóry ve střevě tím, že zabraňují růstu jiných bakteriálních druhů (Bednář et al., 1996).

Obrázek č. 1.: Rozložení mikrobů v trávicím traktu člověka (Shigwedha and Jia, 2013), upraveno



4.2. Význam mikroflóry trávicího traktu

Mikroflóra má v těle nezastupitelnou úlohu. Za nejdůležitější mikroflóru se považuje mikroflóra nacházející se v tenkém a tlustém střevě, která je velice různorodá. V horní části střev můžeme nalézt početné kolonie fakultativně anaerobních bakterií, jako jsou například rody *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Propionibacterium*. V dolní části střeva pak nalézáme striktně anaerobní bakterie, jako jsou například rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* a *Peptococcus*. Tato mikroflóra zde zabezpečuje procesy trávení. Kromě toho tvoří mikroorganismy přirozenou ochranu vůči patogenním mikroorganismům, zlepšují trávení bílkovin, štěpení mléčného cukru laktózy a štěpení lipidů. V tlustém střevě mikroflóra částečně rozkládá polysacharidy, které nebyly metabolizovány v tenkém střevě a odbourává nestrávené složky potravy s obsahem dusíku (Tláškal, 2010). Hraje významnou roli v syntéze vitamínu K, některých vitaminů ze skupiny B a mikronutrientů. Příznivě také ovlivňuje vstřebatelnost vápníku a regulaci hladiny cholesterolu (Nováková, n.d.). Dále pak tvoří při fermentaci vlákniny mastné kyseliny s krátkým řetězcem, jako je například acetát, propionát či butyrát, které zabraňují růstu potenciálních patogenních organismů, snižují počet mutací a riziko rakoviny (Scharlau et al., 2009).

4.2.1. Význam bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka

Mezi nejdůležitější role bifidobakterií v trávicím traktu patří produkce kyseliny mléčné a octové, syntéza vitamínu B₁, B₆, B₁₂, kyseliny listové a některých aminokyselin. Díky produkci těchto látek mají tyto bakterie imunostimulační účinky. Dále mají bifidobakterie anticholesterolový a antimutagenní účinek (Nevoral, 2005; Zbořil, 2005).

Laktobacily jsou v trávicím traktu neméně důležité. Podobně jako bifidobakterie vylučují do svého prostředí kyselinu mléčnou a produkují enzymy a vitamíny skupiny B. Svým působením v trávicím traktu, především pak v tlustém střevě, zvyšují stravitelnost bílkovin, sacharidů a tuků. V neposlední řadě zvyšují biologickou dostupnost vápníku (Görner et Valík, 2004; Nováková, n.d.).

4.3. Bifidobakterie

Mezi prvními bakteriemi, které začnou natrvalo osidlovat trávicí trakt novorozenců, patří bifidobakterie, které tvoří u kojenců krmených mateřským mlékem až 95% mikroflóry. U dospělého člověka klesá jejich počet na zhruba 25% z celkové mikroflóry trávicího traktu

(Krejsek et al., 2007). Bifidobakterie zastávají v trávicím traktu několik nezastupitelných úloh. Adherují na povrch sliznice v místě možné adherace patogenů, využívají potenciální nutrienty patogenů, snižují pH střevního obsahu a ovlivňují metabolismus bakterií a produkci toxinů (Nevoral, 2005). V neposlední řadě produkují z fermentovatelných sacharidů kyseliny mléčnou a octovou v poměru 2:3, které inhibují růst potenciálně patogenních buněk. Kyselina octová, kterou produkují bakterie ve větším množství, má silnější antagonistický účinek na patogenní mikroorganismy (Görner et Valík, 2004). Díky těmto vlastnostem se často používají tyto bakterie jako jedna z hlavních složek probiotik. Nejčastěji se používá 6 druhů, a to *Bifidobacterium bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis* spp. *lactis*, *B. longum* spp. *infantis*, *B. longum* spp. *longum*, a *B. breve* (Bunešová et al., 2014). Za povšimnutí stojí fakt, že děti s alergiemi mají ve svém trávicím traktu daleko menší počet bifidobakterií a enterokoků (Krejsek et al., 2007).

4.3.1. Zařazení

Bifidobacterium sp.

Doména	Bakteria
Kmen	Actinobacteria
Třída	Actinobacteria
Řád	Bifidobacteriales
Čeleď	Bifidobacteriaceae
Rod	<i>Bifidobacterium</i>

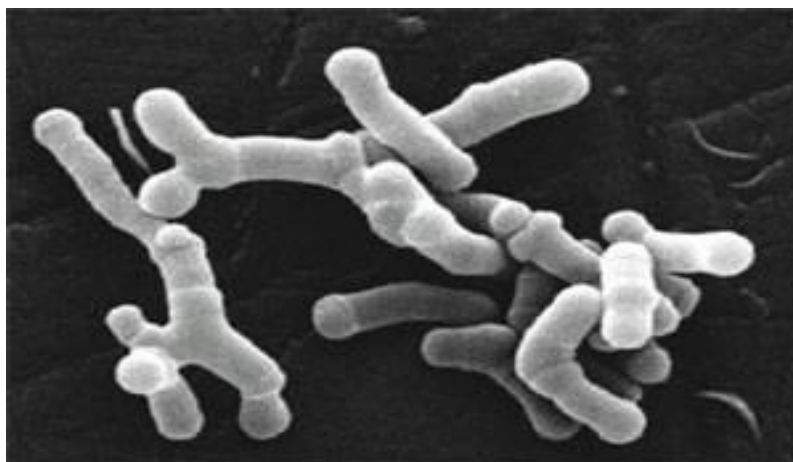
(Sedláček, 2007)

4.3.2. Vlastnosti

Bifidobacterium jsou velmi nepravidelné, větvené, grampozitivní, anaerobní bakterie, kataláza negativní, nesporulující. Tvoří delší či kratší nepohyblivé paličky či tyčinky. Rostou jednotlivě, v řetízcích, hvězdicích, palisádách či nepravidelném uspořádání. Tento rod nevytváří spóry. Morfologie je proměnlivá, obvykle bývají zahnuté či vypouklé. Mohou se větvit, nebo seskupovat do tvaru písmene V nebo Y. Velmi často jsou rozvětvené (viz obrázek

č. 2). Jejich kolonie jsou na polotuhých médiích hladké, vypouklé s hladkými okraji, smetanově bílé, lesklé, měkké konzistence. Dvě molekuly hexózy dokáží přeměnit na 3 moly kyseliny octové a 2 moly kyseliny mléčné. Jako vedlejší metabolity tvoří kyselinu mravenčí, etanol a kyselinu jantarovou (Görner et Valík, 2004).

Obrázek č. 2.: Detail tvaru bakterií druhu: *Bifidobacterium longum* (Schnell, 2002).



4.3.3. Růst

Rozeptí teplot, za kterých dokážou bifidobakterie růst je poměrně široké, a to od 25 do 45° C, optimum se nachází od 37 do 41° C. Optimální pH je v rozmezí 6,5 až 7,0. Za spodní hranici, pod kterou bifidobakterie nerostou, je považovaná pH 4,5 a horní hranice pH je 8. Některé druhy tolerují přítomnost O₂ za podmínky spolupřítomnosti CO₂ (Görner et Valík, 2004).

4.3.4. Výskyt

Zástupce rodu *Bifidobacterium* nalézáme v dutině ústní a trávicím traktu člověka. U kojenců jsou tyto bakterie v trávicím traktu dokonce dominantní. Dalším místem výskytu bakterií rodu *Bifidobacterium* v přírodě je trávicí trakt hmyzu se sociálním způsobem života a mnohých teplokrevných živočichů (Ventura et al., 2004). Nalézt je lze i v odpadních vodách v důsledku sekundární kontaminace (Görner et Valík, 2004). Výskyt v potravinářství je doložen například v kysaném mléce (Ventura et al., 2004).

4.3.5. Použití

Bifidobakterie našly široké uplatnění ve farmacii a potravinářském průmyslu (Nevoral, 2012). V potravinářství se používají ve formě čistých kultur spolu s ostatními bakteriemi

mléčného kysání pro výrobu kysaných mlék a jogurtů. Pro tyto účely se používá nejčastěji kmen *B. animalis* subsp. *lactis* BB12® (Görner et Valík, 2004). Ve farmacii je jejich druhové zastoupení variabilnější a jsou součástí probiotických potravinových doplňků, které jsou často vícedruhové (Nevoral, 2012).

4.4. Laktobacily

U kojenců patří laktobacily k nezastupitelné části mikroflóry. Nejvíce zastoupený druh je *Lactobacillus acidophilus* v počtu 10^9 bakterií na 1 g stolice. U dospělých jsou laktobacily dominantní v proximální části tenkého střeva. V trávicím traktu fermentují glukózu a laktózu na kyselinu mléčnou, octovou, etanol a CO₂ (Görner et Valík, 2004). Tyto metabolity snižují pH ve střevě, inhibují růst případných patogenních mikroorganismů, jako jsou například *Salmonella* subsp. či *Clostridium difficile* a využívají nutrienty, které by jinak mohly patogenní organismy využít ke svému růstu (Kohout, 2010; Nevoral, 2005). Proto se také používají jako probiotika. Nejčastěji používané druhy pro tyto potřeby jsou *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. casei* Sirota, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. breve*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* 299v (Nevoral, 2012). Do trávicího traktu přichází laktobacily také díky potravinám jako je kysané zelí, mléko, sýry, jogurty a kysané mléčné výrobky (Görner et Valík, 2004).

4.4.1. Zařazení

Lactobacillus sp.

Doména:	Bacteria
Kmen:	Firmicutes
Třída:	Bacilli
Řád:	Lactobacillales
Čeleď:	Lactobacillaceae
Rod:	<i>Lactobacillus</i>

(Bernardeau et al., 2006)

Lactobacily se dělí na 3 skupiny podle fermentace hexóz, pentóz a glukonátů.

- Skupina 1 – obligátně homofermentativní laktobacily

Tato skupina fermentuje hexózy z více než 90 % na kyselinu mléčnou. Glukonáty ani pentózy nejsou fermentovány.

Mezi bakterie patřící do této skupiny řadíme druhy *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, a *L. helveticus*.

- Skupina 2 – fakultativně heterofermentativní laktobacily

Hexózy jsou touto skupinou fermentovány téměř výhradně na kyselinu mléčnou. Pentózy jsou fermentovány pomocí indukovatelné fosfoketolázy. Mezi bakterie patřící do této skupiny řadíme například druhy *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. sake*.

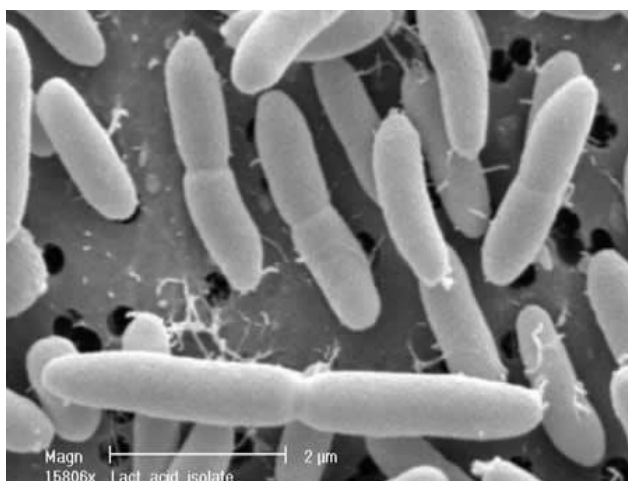
- Skupina 3 – obligátně heterofermentativní laktobacily

Hexózy jsou fermentovány na kyselinu mléčnou, octovou a CO₂. Pentózy jsou fermentovány na kyselinu mléčnou a octovou. Mezi bakterie patřící do této skupiny řadíme například druhy *Lactobacillus buchneri*, *L. fermentum*, *L. kefir* (Sedláček, 2007).

4.4.2. Vlastnosti

Rod *Lactobacillus* zahrnuje grampozitivní, katalasa negativní, fakultativně anaerobní či mikroaerofilní, nepohyblivé krátké až dlouhé, zpravidla rovné paličkovité bakterie, často spojené v řetězky. (Giraffa et al., 2010; Görner et Valík, 2004). Někdy se mohou vyskytovat i v kokovitém tvaru. Tento rod nevytváří spóry (Sedláček, 2007). Po anaerobní kultivaci na agaru mají jejich kolonie 2-5 mm, okrouhlý tvar s hladkými okraji, smetanové až bílé, lesklé, měkké konzistence. Většina druhů tohoto rodu fermentuje glukózu a laktózu na laktát, odtud také pochází název tohoto rodu. Mezi další metabolity patří kyselina mléčná, kyselina octová, etanol a CO₂ (Görner et Valík, 2004). Krom těchto metabolitů dokáží vytvářet i H₂O₂, která se významně podílí na inhibici růstu patogenních mikrobů (Bednář et al., 1996). Bakterie tohoto rodu patří mezi acidotolerantní až acidorezistentní (Görner et Valík, 2004).

Obrázek č. 3.: *Lactobacillus acidophilus*. (Anon, 2013)



4.4.3. Růst

Rodu *Lactobacillus* nejlépe vyhovují k růstu bohatá komplexní média. Hraniční teploty pro růst laktobacilů jsou od 15 do 45° C (Görner et Valík, 2004). Optimální podmínky nastávají při 37 až 40° C (Topley and Wilson, 2005). Výjimku tvoří *Lactobacillus farciminis* a *L. yamanashiensis*, které dokáží růst i při 15° C a *L. sake*, *L. plantarum* a *L. curvatus*, které dokážou velmi pomalu růst i v teplotách blízkých mrazu. Optimální pH je 5,5 až 6,2. Při fermentaci metabolismů snižují kyselost prostředí až na hodnotu pH 4. Hraniční pH pod kterou většina laktobacilů nedokáže růst, je pH 3,6 (Görner et Valík, 2004).

4.4.4. Výskyt

Zástupci rodu *Lactobacillus* rostou především v prostředí bohatém na sacharidy. Takovýmto prostředím je v lidském těle povrch membrán v trávicím traktu a vagíně. U zdravých jedinců jsou laktobacily izolovány z dutiny ústní. Jedním z nejčastějších druhů je zde *Lactobacillus salivarius*. Ve vagíně nalézáme v početném zastoupení *L. vaginalis* a *L. acidophilus* (Görner et Valík, 2004). Laktobacily se také uplatňují jako dominantní mikroflóra v tenkém střevě člověka konkrétně v konečné části tenkého střeva (terminálním ileu), kde patří mezi nejvýznamnější druh *L. acidophilus* (Bednář et al., 1996; Görner et Valík, 2004). Dále jej můžeme naleznout v tlustém střevě. Jejich výskyt se neomezuje jen na trávicí trakt člověka, ale nacházejí se i v bachorech přežvýkavců, kde najdeme *L. ruminis* a *L. vitulinus*. Laktobacily se ve volné přírodě nacházejí na povrchu neporušených rostlin

a jsou jednou z nejdůležitějších součástí mikroflóry, potřebnou pro začátek silážování. V této souvislosti jsou nejčastěji izolovány *L. breve*, *L. plantarum*, *L. sake* a *L. fermentum*. V daleko větším množství se nacházejí na rozkládajícím se rostlinném materiálu či kazícím se ovoci a zelenině (Görner et Valík, 2004).

4.4.5. Použití

Laktobacily našly široké uplatnění ve farmacii, potravinářském průmyslu a zemědělství. Ve farmacii se pro své vlastnosti využívá nejčastěji 10 druhů jako probiotikum. Jedná se o druhy *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei* subsp. *ramnosus*, *L. casei* Shirota, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulggaricus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* 299v a *L. reuteri* (Nevoral, 2012). Všechny tyto kmeny jsou považovány za bezpečné s výjimkou *Lactobacillus rhamnosus*, jehož aplikace je u imunokompetentních osob sporná (Krejsek et al., 2007). V potravinářství se tento rod používá při konzervaci zeleniny jako je kyselé zelí, kvašené okurky, výrobě jogurtu, fermentaci mléka, masa a masných výrobků, těst a sýrů eidam (Maragkoudakis et al., 2006). V zemědělství se tento rod používá při přípravě siláže (Görner et Valík, 2004).

4.4.6. Nežádoucí účinky

Laktobacily hrají velmi významnou roli v potravinářském průmyslu při výrobě mlékařských, masných a zelinářských výrobků. Na druhé straně se však některé druhy laktobacilů, jako například *Lactobacillus brevis*, vyskytují jako kontaminace v pivovarnictví, vinařství a droždářství (Görner et Valík, 2004). Mohou se podílet na kažení masa a masných výrobků (Dušková et al., 2011). Způsobují chuťové vady potravin a nápojů. Dále způsobují kazivost potravin a krmiv rostlinného původu, jako jsou kvašené okurky a zelí, případně další kvašená zelenina, ovocné šťávy a siláže. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* je charakteristická bakterie, izolovaná z bramborové a obilné zápary (Görner et Valík, 2004).

4.5. Vliv výživy na rozmanitost bakteriálního zastoupení v trávicím traktu

Mnoho lidí konzumuje stravu, ve které je více či méně zastoupena jak živočišná tak rostlinná složka potravy. Tento způsob stravování se označuje jako konvenční dieta. Někteří lidé se však mohou rozhodnout, ať už z etického, sensorického, náboženského či zdravotního hlediska, vyřadit ze svého jídelníčku živočišné výrobky. Podle zastoupení masa a živočišných

produktů se poté dělí na laktoovovegetariány, laktovegetariány, ovovegetariány, vegany a fruktariány (Kunová, 2004). Základní druhy diet a jejich výživová specifika jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. : Základní druhy diet a jejich specifika

Název diety	Nekonzumují	Konzumují
Laktoovovegetariáni	maso, ryby	vejce, mléko
Laktovegetariáni	maso, ryby, vejce	mléko
Ovovegetariáni	maso, ryby, mléko	vejce
Vegani	jakoukoli živočišnou potravu včetně medu	výhradně rostlinnou stravu
Fruktariáni	jakoukoli živočišnou a rostlinou potravu, při jejímž sběru byla poškozena rostlina	ovoce, ořechy a semena

(Kunová, 2004).

4.5.1. Vliv vlákniny na mikrobiální diverzitu

Zjištění, že dietní zvyklosti trávníka mají vliv na mikroflóru trávicího traktu, je záležitost dlouhodobě známá. Jedni z nejznámějších propagátorů této myšlenky byli Mečnikov a Tissier, kteří za jeden z hlavních vlivů na mikrobiální diverzitu považovali kojení, geografické vlivy a dietní zvyklosti (Zbořil, 2005).

Byly prokázány významné odlišnosti v kvantitativním poměru mikroflóry trávicího traktu mezi lidmi s dlouhodobou konzumací vysokého množství vlákniny a konzumenty nízkého množství vlákniny (Zbořil, 2005).

Jedna z hlavních odlišností mezi vegetariány a konvenčně se stravujícími osobami je v množství vlákniny přijímané v potravě (Zbořil, 2005). Laktoovovegetariáni konzumují ve své stravě bohaté na rostlinné produkty až 55 gramů vlákniny za den, což je téměř dvojnásobek oproti lidem, kteří se stravují konvenčně či stravou s nižším podílem rostlinných produktů (Nováková, n.d.).

Některé výzkumy poukazují na fakt, že při dlouhodobé konzumaci vlákniny stoupá počet bifidobakterií a laktobacilů a klesá počet gram pozitivních anaerobů, sulfbakterií, metanogenů a bakteroidů. Tímto de facto vláknina ovlivňuje množství bakterií v trávicím traktu (Zbořil, 2005).

4.6. Vlákna

Definice vlákniny není jednotná. Obecně však vlákninu můžeme chápat jako látky, které nejsou stravitelné a absorbovatelné v tenkém střevě člověka. Mají chemickou strukturu sacharidů, analogů sacharidů, ligninu a příbuzných sloučenin (Gray, 2006). Vláknu tvoří převážně polysacharidy, které se ve velké míře vyskytují v ovoci a zelenině. Mezi hlavní složky vlákniny patří celulóza, hemicelulóza, vosky, pektiny, pryskyřice, beta-glukany, lignin, inulin, gummy, slizy a chitin (Kalač, 2008; Velíšek, 2002).

Po požití potravy s obsahem vlákniny se nestrávená vláknina v nezměněné podobě dostane do tlustého střeva, kde ji dokáže fermentovat tamní mikroflóra složená mimo jiné z laktobacilů a bifidobakterií (Kalač, 2008). Produktem fermentace vlákniny jsou takzvané krátké mastné kyseliny (kyselina octová, propionová, máselná a mléčná), přičemž každý druh bakterie metabolizuje tyto kyseliny v jiném poměru (Zbořil, 2005).

Rozpustná vláknina

Je součástí ovoce, zeleniny ořechů a luštěnin či mateřského mléka. Rozpustná vláknina, jak již její název napovídá, má schopnost vstřebávat vodu a zvětšovat svůj objem (Pozler, 2009). Tím změkčuje stolicí a zvětšuje objem tráveniny. Také na sebe dokáže navázat cholesterol, který tím pomáhá vylučovat z těla (Grygárková, 2008). Mezi hlavní složky rozpustné vlákniny patří pektin, inulin, gummy a slizy. V tenkém, ale především tlustém střevě je rozpustná vláknina důležitým zdrojem potravy pro bakterie tamní mikroflóry, které ji fermentují na kyselinu octovou, máselnou a propionovou (Kalač, 2008).

Nerospustná vláknina

Je součástí ovoce, zeleniny, hub, obilovin a luštěnin. Tento druh vlákniny se ve vodě nerozpouští a nezvětšuje svůj objem (Velíšek, 2002). Zažívacím traktem prochází v nestráveném stavu, poněvadž nemůže být vstřebána ani rozštěpena enzymy lidského těla. Tento druh vlákniny na sebe dokáže navázat toxiny a rakovinotvorné látky a podporuje jejich vylučování (Grygárková, 2008). Zároveň ovlivňuje dobu, kterou potrava putuje trávicím traktem a v neposlední řadě zlepšuje střevní peristaltiku. Mezi hlavní složky nerozpustné vlákniny patří celulóza, hemicelulóza, beta-glukany, chitin a lignin (Velíšek, 2002).

4.7. Hmotnostní spektrometrie MALDI–TOF MS

První studie o využití hmotnostní spektrometrie v klinické mikrobiologii je datována do roku 1975, kdy jí poprvé použil Anthalt a Fenselau pro identifikaci mikroorganismů na rodové, druhové a kmenové úrovni (Bizzini et Greub, 2010). Velký úspěch zažila tato metoda v roce 1994, kdy se díky ní zdařila úspěšná analýza bakterií z lyzátu buněk (Cain et al., 1994). O dva roky později (1996) byla MALDI-TOF MS poprvé s úspěchem použita pro analýzu celé bakteriální buňky (Holland et al., 1996).

V roce 2009 publikoval Seng a kolektiv práci, která pojednává o použitelnosti MALDI-TOF MS k identifikaci bakteriálních kmenů. V této práci uvádí, že zpracování výsledků z 1660 vzorků odhalilo správnost analýzy u 95,4 % vzorků, z čehož bylo 84,1 % vzorků identifikováno na úrovni druhu a 11,3 % vzorků bylo identifikováno na úrovni rodu. Ze zbývajících 4,6 % vzorků bylo 1,7 % chybně identifikováno a u 2,8 % byla absence identifikace. Tyto chyby byly nejspíše způsobeny nesprávnými záznamy či nesprávnou interpretací výsledků (Seng et al., 2009).

4.7.1. Identifikace bakterií pomocí hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF MS

Metoda hmotnostní spektrofotometrie se v posledních letech stala nepostradatelnou v oblasti studování a identifikace biopolymerů, syntetických polymerů, farmaceutik, nízkomolekulárních organických i anorganických látek, plísní, kvasinek a především bakterií. Díky své rychlosti, přesnosti a potřebě relativně malého množství vzorku se tato metoda stala velkým přínosem především v oblasti zkoumání mikroorganismů (Holland et al., 1996; Seng et al., 2009; Theel, 2013).

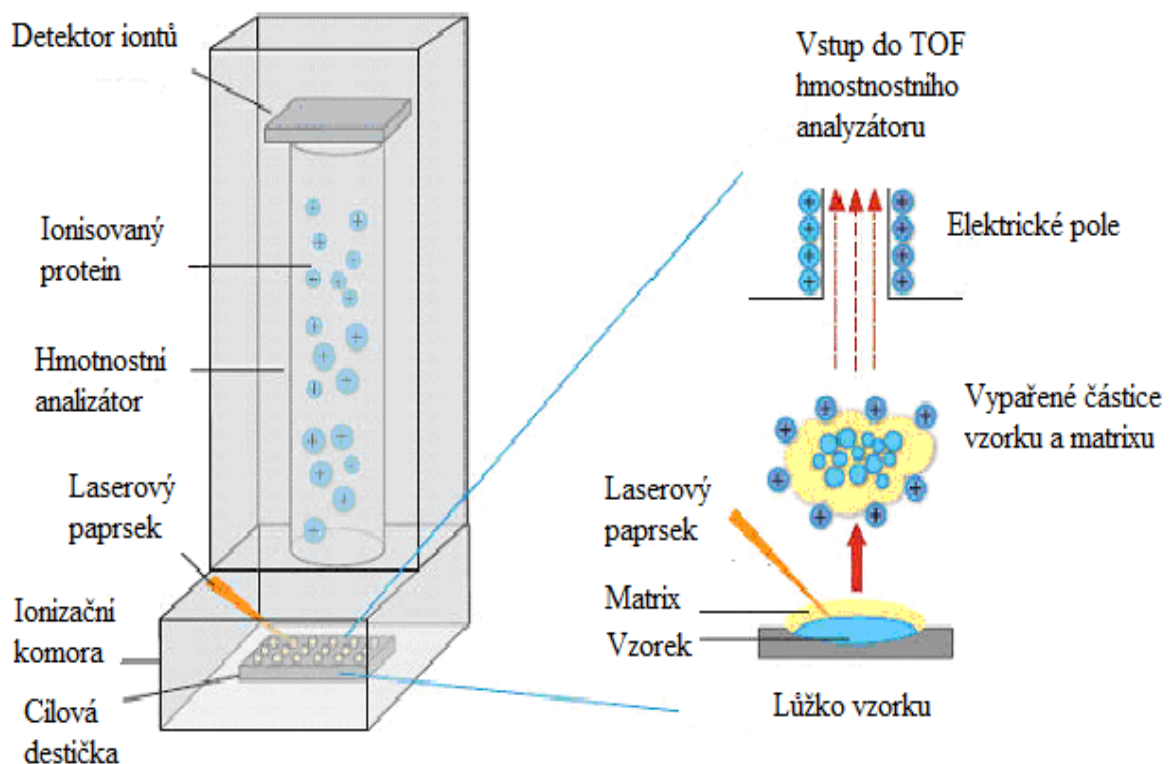
4.7.2. Příprava vzorku pro MALDI – TOF MS

Příprava vzorku spočívá ve smíchání zkoumaného vzorku s nadbytkem matrice v optimálním poměru 1:10⁴ (zkoumaný vzorek: matrice). Jako matrice se nejběžněji používá kyselina skořicová či benzoová (Ho et Reddy, 2011). Směs je následně nanášena na destičku z inertního kovu. Nejčastěji bývá destička nerezová či hliníková. Na povrchu destičky jsou vyryty kruhové zářezy, omezující rozlití a smíchání vzorků (Dekker et Branda, 2011).

4.7.3. Princip metody

Kovová destička je po vysušení umístěna do analyzátoru, kde je vytvořeno vakuum (Friedecký et Lemr, 2012). Krátký puls laseru, zaměřený na jednotlivé terčíky se vzorkem způsobí zahřátí a sublimaci matrice, která přednostně absorbuje paprsek, přechází do plynné fáze a strhává s sebou molekuly analytu (Kadlčík et al., 2002; Friedecký et Lemr, 2012). Ionizované molekuly poté vstupují do trubice s vakuem. Toto prostředí dovoluje pohyb molekul rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Lehčí částice se pohybují rychleji než molekuly s vyšší hmotností (Anon, n.d.). Rychlost pohybu molekul a čas potřebný k průletu molekul mezi iontovým zdrojem a detektorem je rozhodujícím faktorem pro detekci vzorku (Lewis et al., 2000). Výstupními daty jsou hmotnostní spektra v podobě píkového grafu. Profily proteinů získaných při analýze se pohybují v hodnotách od 2 do 20 kDa (Theel, 2013).

Obrázek č. 4.: Princip metody MALDI-TOF MS (Theel, 2013), upraveno



4.7.4. Vyhodnocení výsledků

Píkový graf je následně identifikován pomocí porovnání hmotnostního spektra s databází referenčních spekter z již dříve identifikovaných izolátů. Výsledkem je druhová identifikace mikroorganismů s přiřazenou hodnotou vyjadřující shodu vzorku s referenčním vzorkem z databáze MALDI Biotyper (Theel, 2013). Vlastní vyhodnocení o shodnosti či odlišnosti vzorku provádí v konečné fázi laborant (Seng et al., 2009).

Úspěšnost metody MALDI-TOF MS dosahuje přesnosti pohybující se kolem 95 % správně určených vzorků. Mnoho vzorků tato metoda dokáže zařadit i druhově a rodově. Chyby, které se vyskytují, jsou většinou připsány na vrub nesprávným záznamům v databázi, chybnému rozhodnutí laboranta či nesprávné přípravě vzorků. Průměrná doba potřebná pro identifikaci jednoho izolátu, se pohybuje od 2 do 6 minut (Seng et al., 2009). Musíme však započítat i dobu nutnou ke kultivaci a vyizolování kmene v čisté kultuře. I přesto se jedná o velké zrychlení, neboť klasickými biochemickými testy trvá identifikace od 24 do 48 hodin (Taichmanová, 2013).

5. Materiál a metody

5.1. Původ a charakterizace vzorků

V pokusu byly identifikovány izoláty bifidobakterií a laktobacilů ze stolice 21 dárců. Z přihlášených dárců bylo 9 dospělých osob a jedno dítě ve věku 7 let s běžnou konvenční stravou obsahující maso a masné produkty, 8 dospělých osob, jedno dítě ve věku 7 let s vegetariánskou stravou, jeden kojeneček ve věku 2 měsíců krmený mateřským mlékem od vegetariánské matky a jeden vegan. Podrobnější informace o dárcích jsou uvedeny v tabulce č. 2. Izoláty použité pro tuto bakalářskou práci byly získány pomocí kultivace na selektivních médiích, a to na agaru WSPMup podle Bunešová et al. (2012) pro bifidobakterie a Rogosa agaru (Oxoid, UK) pro laktobacily. Vlastní rozbor stolice dárců a kultivace na selektivních médiích byl proveden studentkou České zemědělské univerzity Evou Mráčkovou. Pro potřeby této bakalářské práce byly dále použity jen bakteriální izoláty a informace o kvantitě a druhu výše zmíněných skupin bakterií.

Tabulka č. 2 : Informace o dárcích

Druh diety	Pohlaví	Věk	Druh diety	Pohlaví	Věk
Konvenční dieta	Žena	21	Vegetariánská dieta	Žena	7
	Žena	24		Žena	21
	Žena	26		Žena	27
	Žena	28		Žena	32
	Žena	29		Žena	32
	Žena	36		Žena	33
	Žena	36		Žena	34
	Muž	7		Žena	36
	Muž	24		Muž	2 (měsíce)
	Muž	50		Muž	39
			Veganská dieta	Žena	30

5.2. Izolace bakterií ze selektivních agarů

Po 48 hodinách při 37° C v anaerobních podmínkách (bifidobakterie) a mikroaerofilních podmínkách (laktobacily) narostly na selektivních agarech kolonie z nichž bylo potřeba vyizolovat čisté kultury. Z jednotlivých kolonií byly odebrány vyžíhanou kličkou vzorky tak, aby se zamezilo odebrání živného média. Vzorky byly následně přeneseny aseptickou cestou do bujónu. Jako vhodný bujón byl použit Wilkins Chalgren bujón (Oxoid) doplněný o sojový pepton (5 g/l), L-cysteine (0,5 g/l) a Tween 80 (1 ml/l). V bujónu probíhala anaerobní kultivace po dobu 24 hodin při teplotě 37° C. Z narostlé kultury byl za aseptických podmínek odebrán vzorek, který byl podroben morfologické kontrole pomocí mikroskopu.

5.3. Identifikace bifidobakterií na úrovni rodu

Jedním ze základních biochemických testů používaných pro identifikaci bifidobakterií, je prokázání přítomnosti enzymu vznikajícího při fermentaci hexózo fruktózo-6-fosfát fosfoketolázou v buněčném extraktu. Principem testu nazývaného F6PPK je reakce, při níž z fruktózo-6-fosfátu vzniká acetylfosfát. Vznik acetylfosfátu se detekuje červenofialovým zbarvením chalátů železa (Scardovi, 1982).

5.3.1. Postup metody testu F6PPK

Po kultivaci v anaerobních podmínkách při teplotě 37° C po dobu 42 hodin se buňky odstředí při 14 000 otáčkách po dobu 3 minut. Paleta se dvakrát promyje roztokem fosfátového pufru o pH 6,5. Buňky jsou rozmíchány v 1 ml pufru a rozrušovány pomocí ultrazvuku v ledu po dobu 2 minut. Supernatan se smíchá s 0,25 ml roztoku (složeného z 6 mg NaF, 10mg C₂H₂INaO₂ a 1 ml destilované H₂O) a 7 fruktózo-6-fosfátem o koncentraci 80 mg/l destilované H₂O. Po 30 minutách kultivace při 37° C je reakce zastavena přidáním 1,5 ml roztoku NH₂OH. HCl o koncentraci 13,9 g/ 100 ml destilované H₂O o pH 6,5. Směs je uložena na 10 minut při pokojové teplotě, která je přibližně 25° C. Po uplynutí stanovené doby je do směsi přidán barvicí roztok 1 ml 5% FeCl₃.6H₂O rozpuštěné v 0,1 molární HCl. Bezprostředně po přidání se obsah promísí a pozoruje zbarvení. Pokud je vzorek pozitivní na přítomnost acetylfosfátu produkovaného bifidobakteriemi, zbarví se roztok do červenofialova. Pokud roztok acetylfosfát neobsahuje, zůstává žlutý (Vlková et al., 2002).

Identifikace laktobacilů ze vzorků byla prováděna pomocí morfologické analýzy buněk v mikroskopu, jelikož pro laktobacily není dostupný žádný test podobný testu F6PPK.

5.4. Postup přípravy vzorku pro identifikace metodou MALDI-TOF MS

K identifikaci byly použity čisté kmeny vykultivované z bujónu. Do uzavíratelné zkumavky (Eppendorff) o objemu 1,5 ml byl asepticky převeden 1 ml čerstvě narostlé mikroskopicky zkontrolované bakteriální kultury. Vzorek byl vložen do centrifugy a odstředován po dobu 3 minuty při 14 500 otáčkách. Po odstředění se vzorek rozdělil na sediment (peletu bakteriální kultury) a supernatant. Peleta byla poté rozpuštěna v 60% etanolu a v chladničce uchovávána pro další zpracování. V této formě může být bakteriální vzorek uchováván pro metodu MALDI-TOF MS i několik týdnů až měsíců. Vzorky byly poté dále zpracovány podle protokolu metody založené na inaktivaci ethanolem v kombinaci s extrakcí kyselinou mravenčí a acetonitrem na VŠCHT.

Uchování vzorku a izolace DNA pro budoucí analýzy

V rámci pokusu byly vzorky také připravovány a uchovávány pro další budoucí analýzy a testování, kdy byla část narostlé kultury (3 ml) převedena do 5-ti mililitrové kryozkumavky, doplněna o Bifipuf s glycerolem a zamrzena. Další 1 ml bakteriální kultury byl použit pro izolaci DNA.

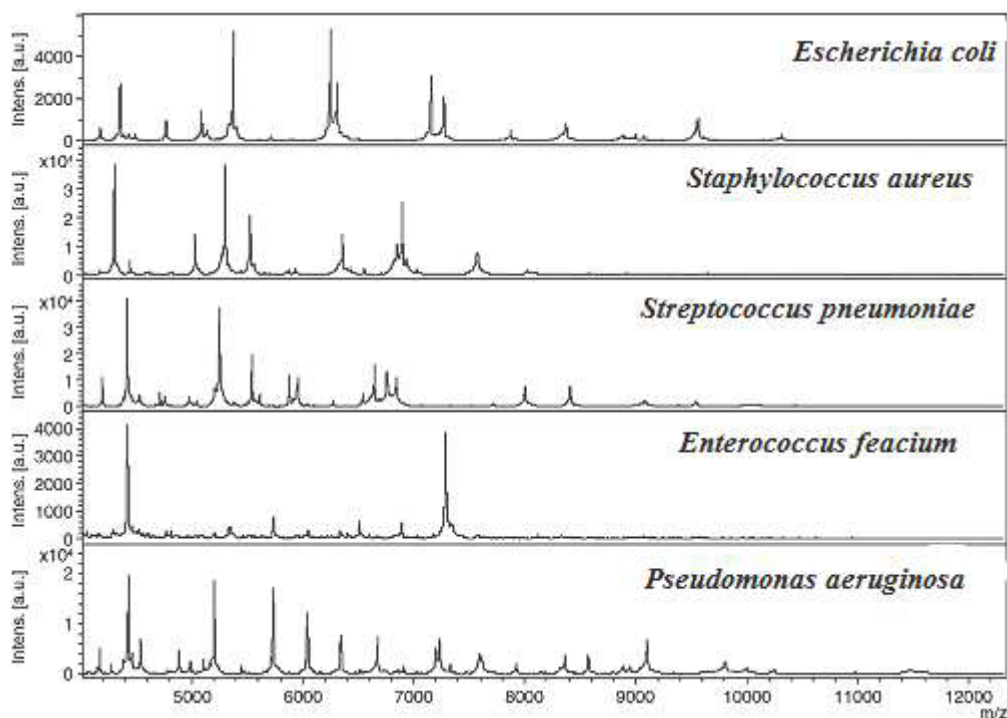
Izolace DNA byla prováděna na základě podkladu od firmy Applied Biosystéme za použití kitu PrepMan® Ultra. Do uzavíratelné zkumavky (Eppendorff) o objemu 1,5 ml byl asepticky převeden 1ml čerstvě narostlé mikroskopicky zkontrolované bakteriální kultury. Obsah zkumavky byl odstředován při 14 500 otáčkách po dobu 3 minut. Supernatant byl slit a bylo přidáno 60 μ l přípravku Prepman Ultra. Zkumavka byla vložena do termobloku vyhřátého na 99° C, kde byla ponechána po dobu 10 minut. Zchlazený vzorek na pokojovou teplotu byl stáčen 3 minuty při 14 500 otáčkách. Vzorek se opět rozdělil na pevnou část a supernatant, ze kterého bylo odpipetováno 50 μ l do nové uzavíratelné zkumavky a vzorek uschován v mrazáku při -20° C pro další výzkum.

5.5. Výstupní data analýzy MALDI-TOF MS

Vlastní analýza byla provedena na Vysoké škole chemicko technologické v Praze na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF Biflex IV (Bruker), instalovaném v ústavu biochemie a mikrobiologie. Z každého vzorku bylo po analýze vygenerováno hmotnostní

spektrum, které určuje jedinečné proteinové složení neznámého vzorku. Každý vrcholek píku vyjadřuje mikrobiální protein charakteristický pro daný mikroorganismus viz. obrázek č. 5. Identifikace vzorků byla provedena pomocí počítačového srovnání píkového grafu neznámého vzorku s databází referenčních spekter, již dříve analyzovaných vzorků (MALDI Biotyper).

Obrázek č. 5.: Hmotnostní spektra, ukázka podle (Carbonelle et al. 2011)



6. Výsledky

Celkem byly kvantifikovány a identifikovány bakterie ze stolice 21 dárců, z nichž se vyhotovilo 210 vzorků vhodných pro identifikaci pomocí metody MALDI-TOF MS.

I přes opakované testy se 6 vzorků nepodařilo na přístroji MALDI-TOF MS určit. Tyto chyby přisuzujeme chybné přípravě vzorku či neúplné databázi MALDI Biotyper, se kterou se výsledky porovnávaly.

U vzorků od konvenčně se stravujících osob narostly, i přes použití selektivního média Rogosa agar, používaného pro laktobacily, dva druhy, které svojí morfologií při mikroskopické kontrole neodpovídaly laktobacilům. Po provedení hmotnostní spektrometrie byly tyto kolonie identifikovány jako druhy *Pediococcus acidilactici*, který narostl u jednoho dárce a *Pediococcus pentosaceus*, který narostl u tří dárců. Dále pak na tomto agaru narostly u jednoho dárce tři kolonie, které se nepodařilo pomocí MALDI-TOF MS identifikovat. U selektivního média WSPMup, použitého pro bifidobakterie byly u šesti dárců identifikovány kolonie, které při mikroskopické kontrole odpovídaly bifidobakteriím. Byl u nich rovněž proveden test na F6PPK enzym s pozitivním výsledkem, nepodařily se však pomocí MALDI-TOF MS identifikovat na úrovni tohoto rodu. U tohoto agaru nebyly detekovány žádné cizí kolonie.

U vzorků od osob s vegetariánskou stravou také narostla i přes použití selektivního agaru Rogosa jedna kolonie, která se morfologicky lišila od laktobacilů. Po provedení hmotnostní spektrometrie byla tato kolonie identifikována jako enterokok. Jednalo se o *Enterococcus faecium*, který narostl u jednoho dárce. Na tomto agaru nevyrostla žádná kolonie, kterou by se nepodařilo identifikovat. U selektivního média WSPMup narostly dvě kolonie s negativním F6PPK testem. Po hmotnostní spektrometrii byly identifikovány jedna jako zástupce rodu propionibakterií a druhá rodu clostridií. Jednalo se o *Propionibacterium acnes* a u kojence byl identifikován rod *Clostridium perfringens*. U tří dárců byly identifikovány kolonie, které při mikroskopické kontrole odpovídaly bifidobakteriím. Byl u nich rovněž proveden test na F6PPK enzym s pozitivním výsledkem, nepodařily se však pomocí MALDI-TOF MS identifikovat na úrovni rodu. U tohoto agaru nenarostly žádné další kolonie, které by se nepodařilo identifikovat.

U vzorku od osoby stravující se veganskou stravou také narostly na selektivním médiu Rogosa agar dvě neznámé kolonie. Metodou MALDI TOF MS byly identifikovány jako druh *Pediococcus pentosaceus* a *Streptococcus galolyticus*. Jeden vzorek z tohoto média se nezdařilo identifikovat. U selektivního média WSPMup, použitého pro bifidobakterie byly identifikovány všechny kolonie. Nebyly zde detekovány žádné cizí kolonie.

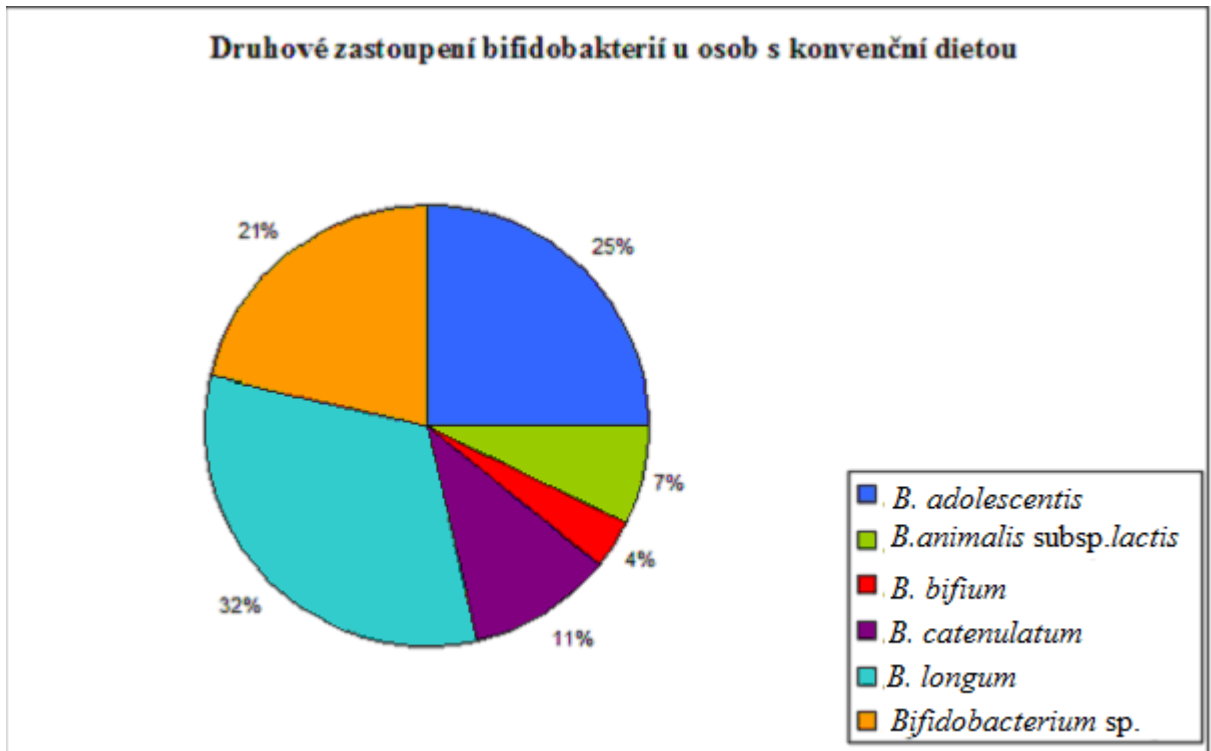
Získané hodnoty počtů bifidobakterií a laktobacilů v závislosti na dietě byly porovnány a statisticky vyhodnoceny pomocí dvouvýběrového t-testu v programu STATISTICA 12.

6.1. Výskyt bifidobakterií

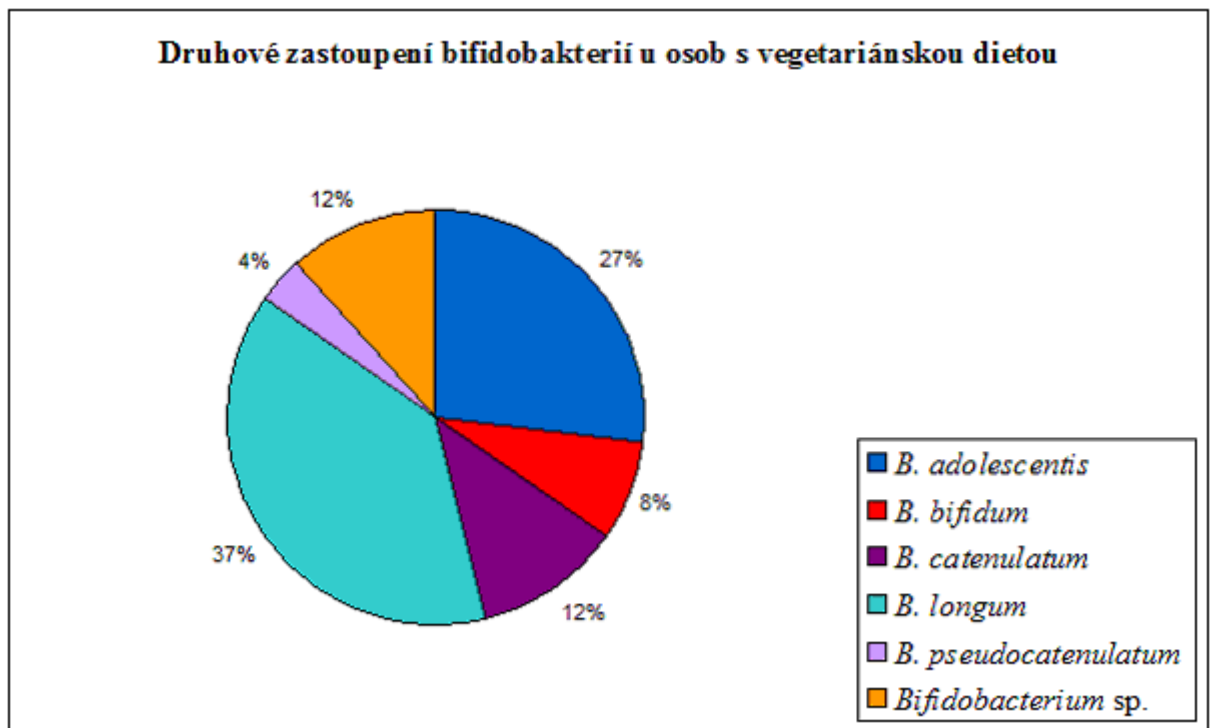
Ve stolici lidí na konvenční dietě (10 dárců) byly bifidobakterie po kultivaci na selektivním médiu WSPMup detekovány v počtu $9,36 \pm 0,57$ log KTJ/ g stolice na rozdíl od vegetariánů (9 dárců), u kterých byl touto metodou detekován počet $9,55 \pm 0,28$ log KTJ/ g stolice. Pro zajímavost byl do studie zařazen také kojeneček kojenečkou matkou stravující se vegetariánskou stravou, u něhož byly zjištěny bifidobakterie v počtech $10,25$ log KTJ/ g stolice. U vegana (1 dárců) bylo detekováno $10,20$ log KTJ/ g stolice.

Pro přehlednost jsou druhy bifidobakterií vyskytujících se u osob s komerční dietou uvedeny v grafu č. 1, druhy bifidobakterií vyskytujících se u osob s vegetariánskou dietou v grafu č. 2 a druhy bifidobakterií vyskytujících se u osob s veganskou dietou v grafu č. 3.

Graf č. 1.: Druhové zastoupení bifidobakterií u osob s konvenční dietou.



Graf č. 2.: Druhové zastoupení bifidobakterií u osob s vegetariánskou dietou.



Graf č. 3.: Druhové zastoupení bifidobakterií u osoby s veganskou dietou.

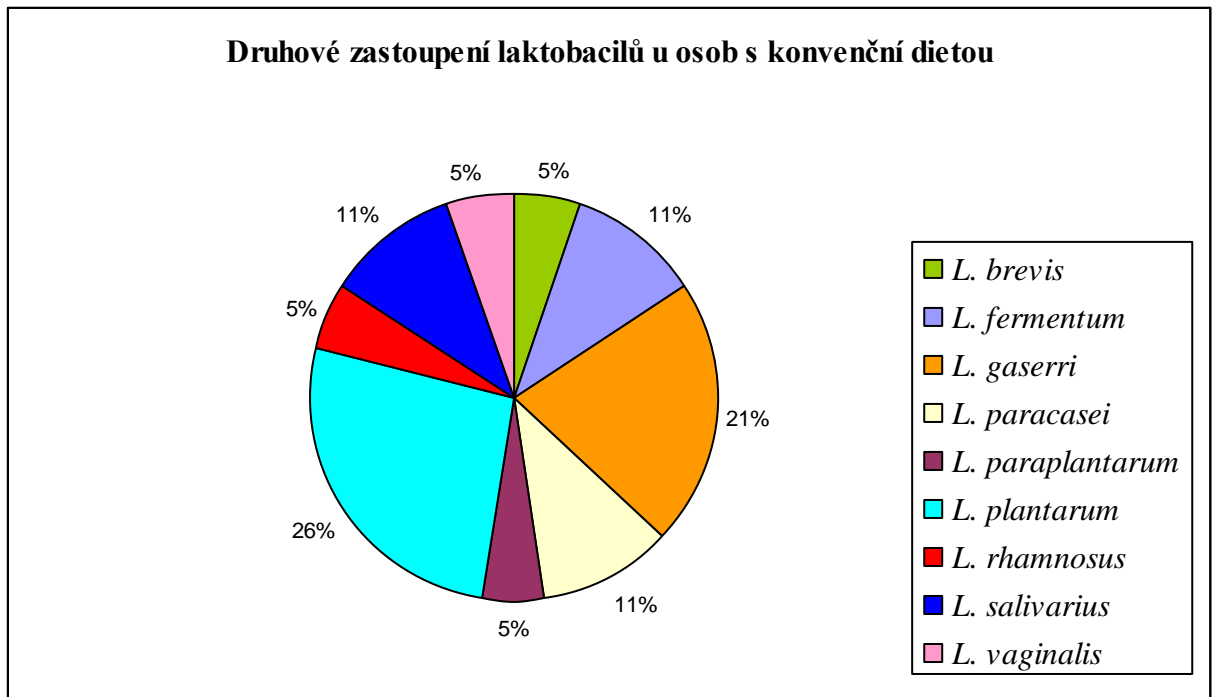


6.2. Výskyt laktobacilů

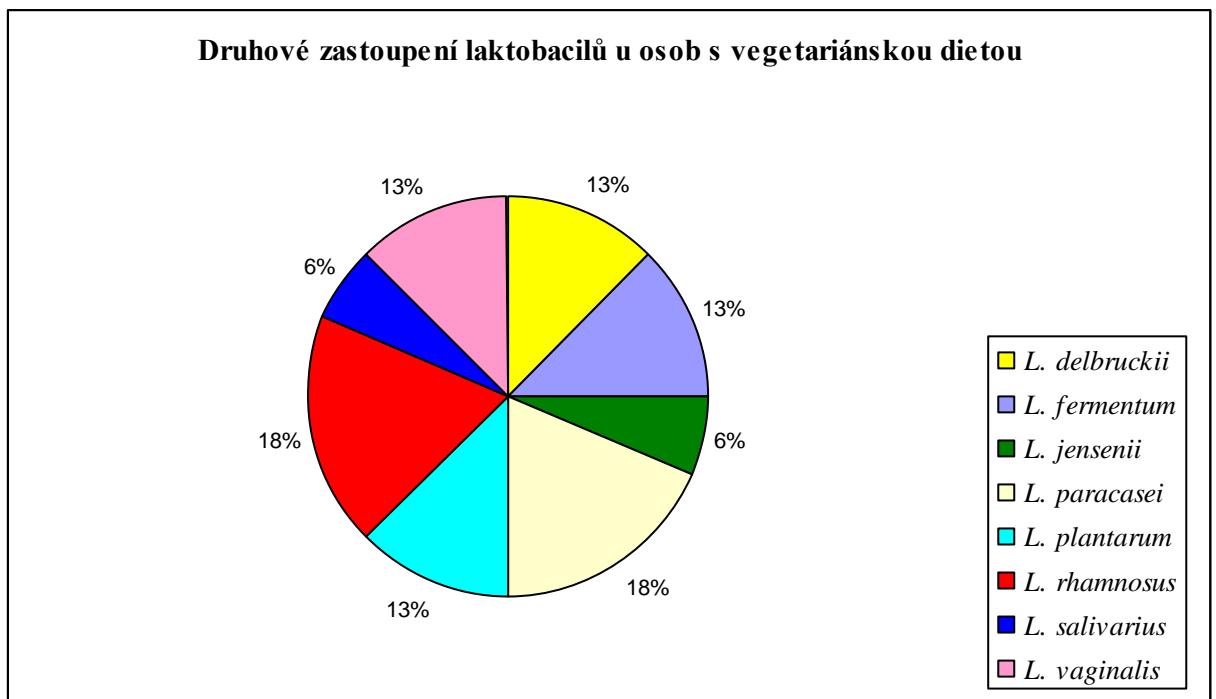
Ve stolici dárců na konvenční dietě (10 dárců) byly laktobacily kultivovány pomocí selektivního agaru Rogosa. V těchto vzorcích byl počet laktobacilů stanoven na $5,00 \pm 1,17$ log KTJ/ g stolice. U vegetariánů (9 dárců) byl touto metodou detekován počet $4,59 \pm 1,13$ log KTJ/ g stolice. U kojence kojeného matkou stravující se vegetariánskou stravou byl zjištěný počet laktobacilů $8,11$ log KTJ/ g stolice. U vegana (1 dárci) bylo detekováno $5,24$ log KTJ/ g stolice.

Druhy laktobacilů vyskytujících se u osob s konvenční dietou lze nalézt v grafu č. 4, druhy laktobacilů vyskytujících se u osob s vegetariánskou dietou jsou uvedeny v grafu č. 5, druhy laktobacilů vyskytujících se u osob s veganskou dietou pak v grafu č. 6.

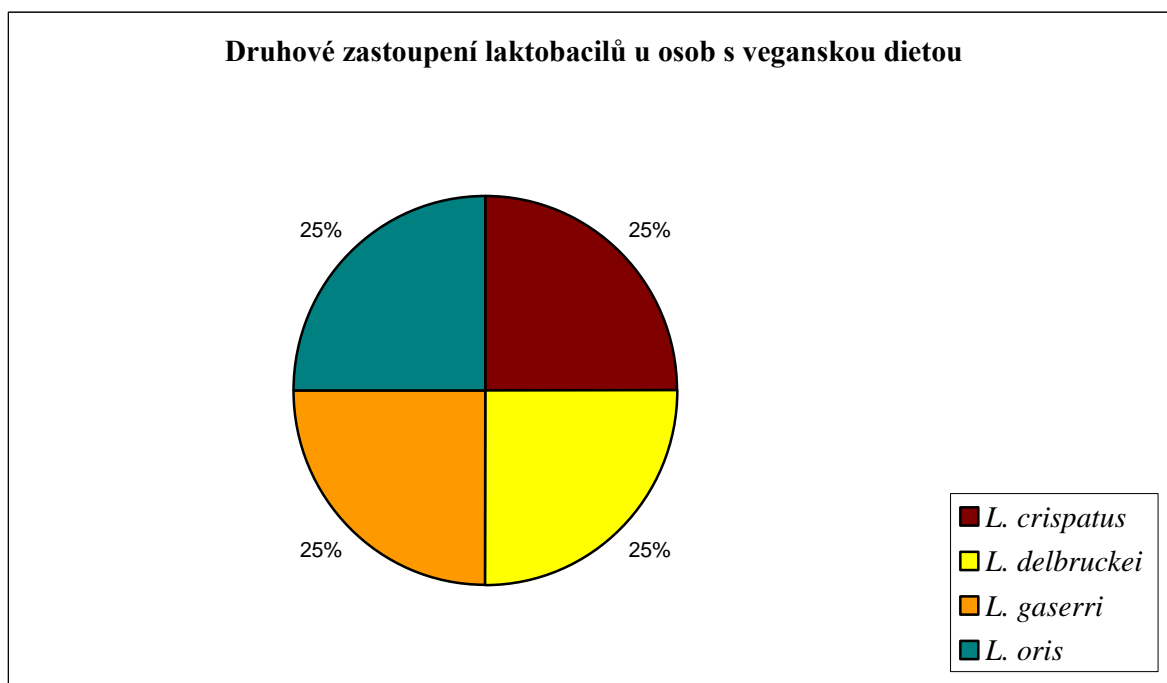
Graf č. 4.: Druhové zastoupení laktobacilů u osob s konvenční dietou



Graf č. 5.: Druhové zastoupení laktobacilů u osob s vegetariánskou dietou.



Graf č. 6.: Druhové zastoupení laktobacilů u osob s veganskou dietou



Získaná data z analýzy MALDI-TOF MS byla rozpracována na jednotlivé tabulky. Druhové zastoupení bakterií s příslušným počtem identifikovaných vzorků u jednotlivých osob je uvedeno v následujících tabulkách. Tabulka číslo 3: dárce s konvenční dietou, tabulka číslo 4: dárce s vegetariánskou dietou, tabulka číslo 5: výsledky od kojence krmeného mateřským mlékem od vegetariánské matky a nakonec, v tabulce č. 6, jsou uvedeny identifikace vzorků od dárce s veganskou dietou.

Tabulka č. 3.: Souhrn výsledků o osob s konvenční dietou

Konvenční dieta	Pohlaví - věk	Použité médium	Identifikovaný druh
Vzorek č. 1	žena – 28 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (6) <i>B. longum</i> (4)
		Rogosa	<i>L. salivarius</i> (10)
Vzorek č. 2	žena - 29 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (4) <i>B. longum</i> (3) <i>Bifidobacterium</i> sp . (3)
		Rogosa	<i>L. paracasei</i> (9) <i>L. fermentum</i> (1)
Vzorek č. 3	Muž - 50 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (7) <i>B. bifidum</i> (1) <i>B. longum</i> (1) <i>Bifidobacterium</i> sp . (1)

		Rogosa	<i>L. plantarum</i> (7) <i>L. gaserri</i> (3)
Vzorek č. 4	žena – 21	WSPMup	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (10)
		Rogosa	<i>L. plantarum</i> (7) <i>L. paraplantarum</i> (1) <i>L. brevis</i> (2)
Vzorek č. 5	Muž- 7 let	WSPMup	<i>B. longum</i> (7) <i>B. catenulatum</i> (1) <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (1) <i>Bifidobacterium</i> sp . (1)
		Rogosa	<i>L. fermentum</i> (5) <i>L. rhamnosus</i> (2) <i>L. gaserri</i> (2) <i>L. plantarum</i> (1)
Vzorek č. 6	žena – 24 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (1) <i>B. longum</i> (4) <i>B. catenulatum</i> (4) <i>Bifidobacterium</i> sp . (1)
		Rogosa	<i>L. gaserri</i> (4) <i>Pediococcus acidilactici</i> (6)
Vzorek č. 7	Muž- 24 let	WSPMup	<i>B. longum</i> (10)
		Rogosa	<i>L. salivarius</i> (2) <i>L. vaginalis</i> (2) <i>L. plantarum</i> (1) <i>L. gaserri</i> (1) <i>Pediococcus pentosaceus</i> (1) neidentifikováno (3)
Vzorek č. 8	žena - 36 let	WSPMup	<i>B. longum</i> (9) <i>B. adolescentis</i> (1)
		Rogosa	<i>L. plantarum</i> (8) <i>Pediococcus pentosaceus</i> (2)
Vzorek č. 9	žena - 36 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (5) <i>B. longum</i> (1) <i>Bifidobacterium</i> sp. (4)
		Rogosa	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (10)
Vzorek č. 10	žena - 26 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (5) <i>B. longum</i> (3) <i>B. catenulatum</i> (1) <i>Bifidobacterium</i> sp . (1)
		Rogosa	<i>L. paracasei</i> (10)

Tabulka č. 4.: Souhrn výsledků o osob s vegetariánskou dietou

Vegetariánská dieta	Pohlaví – věk	Použité médium	Identifikovaný druh
Vzorek č. 1	žena - 32 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (3) <i>B. longum</i> (1) <i>Bifidobacterium</i> sp. (6)
		Rogosa	<i>L. delbruckii</i> (2) <i>L. paracasei</i> (8)
Vzorek č. 2 (rodina)	žena - 34 let	WSPMup	<i>B. longum</i> (2) <i>B. adolescentis</i> (6) <i>Bifidobacterium</i> sp. (1) <i>Propionibacterium acnes</i> (1)
		Rogosa	<i>L. rhamnosus</i> (6) <i>L. vaginalis</i> (4)
Vzorek č. 3 (rodina)	žena - 7 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (5) <i>B. longum</i> (4) <i>B. catenulatum</i> (1)
		Rogosa	<i>L. plantarum</i> (10)
Vzorek č. 4 (rodina)	Muž - 39 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (5) <i>B. longum</i> (5)
		Rogosa	<i>L. paracasei</i> (8) <i>L. vaginalis</i> (2)
Vzorek č. 5	žena - 27 let	WSPMup	<i>B. longum</i> (10)
		Rogosa	<i>L. plantarum</i> (4) <i>L. delbruckii</i> (2) <i>L. fermentum</i> (2) <i>L. paracasei</i> (2)
Vzorek č. 6	žena - 36 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (5) <i>B. longum</i> (3) <i>B. bifidum</i> (1) <i>B. catenulatum</i> (1)
		Rogosa	<i>L. jensenii</i> (4) <i>Enterococcus faecium</i> (6)
Vzorek č. 7	žena - 21 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (5) <i>B. longum</i> (3) <i>B. catenulatum</i> (1) <i>Bifidobacterium</i> sp. (1)
		Rogosa	<i>L. salivarius</i> (10)
Vzorek č. 8	žena - 33 let	WSPMup	<i>B. longum</i> (9) <i>B. pseudocatenulatum</i> (1)
		Rogosa	<i>L. rhamnosus</i> (10)
Vzorek č. 9	žena - 32 let	WSPMup	<i>B. longum</i> (5) <i>B. bifidum</i> (5)
		Rogosa	<i>L. fermentum</i> (5) <i>L. rhamnosus</i> (5)

Tabulka č. 5.: Souhrn výsledků u kojence krmeného mateřským mlékem od vegetariánské matky

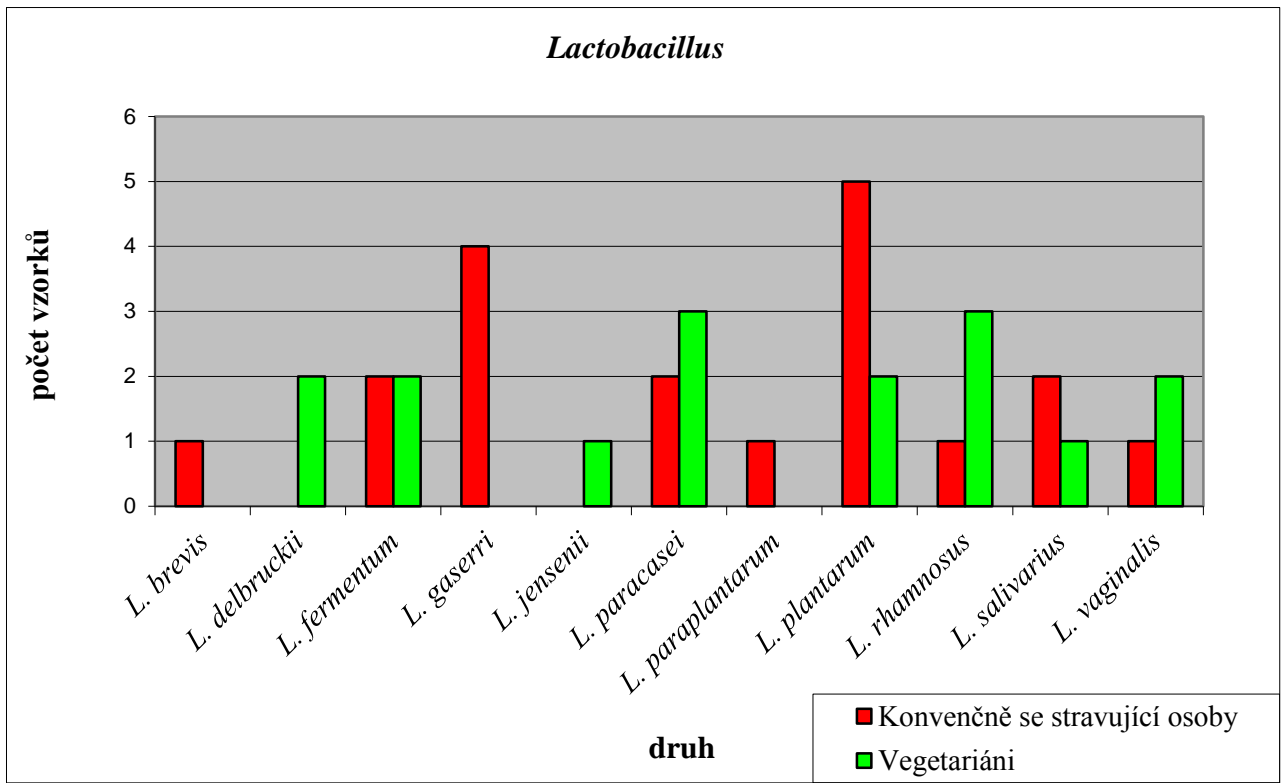
Kojenec od vegetariánské matky	Pohlaví – věk	Použité médium	Identifikovaný druh
Vzorek č. 1 (rodina)	Muž - 2 měsíce	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (5) <i>B. longum</i> (2) <i>Clostridium perfringens</i> (3)
		Rogosa	<i>L. vaginalis</i> (10)

Tabulka č. 6.: Souhrn výsledků u osoby s veganskou dietou

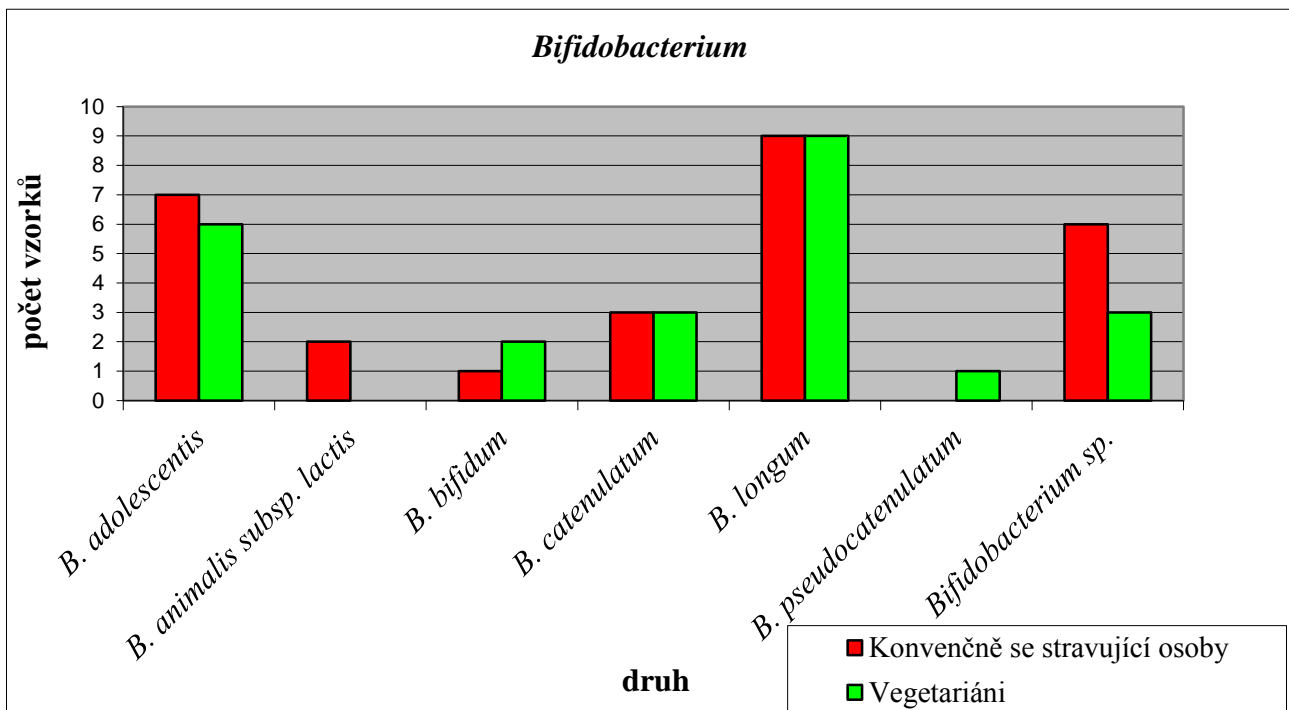
Veganská dieta	Pohlaví – věk	Použité médium	Identifikovaný druh
Vzorek č. 1	žena – 30 let	WSPMup	<i>B. adolescentis</i> (5) <i>B. longum</i> (5)
		Rogosa	<i>L. crispatus</i> (1) <i>L. gaserri</i> (1) <i>L. oris</i> (1) <i>L. delbruckei</i> (1) <i>Pediococcus pentosaceus</i> (2) <i>Streptococcus galolyticus</i> (1) neidentifikováno (3)

Pro zpřehlednění výsledků srovnání laktobacilů a bifidobakterií u osob s konvenční a vegetariánskou stravou jsou uvedeny grafy 7 a 8. Z těchto grafů vyplývá, že vegetariánská strava neměla prokazatelně významný vliv na vyšší kvantitativní nebo kvalitativní druhovou diverzitu. Některé druhy jako jsou například *Lactobacillus brevis*, *L. gaserri*, *L. paraplantarum* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* se byly izolovány pouze u konvenčně se stravujících osob. Na druhou stranu u vegetariánů byly identifikovány některé druhy, které nebyly identifikovány u konvenčně se stravujících osob. Jednalo se o druhy *Lactobacillus delbruckii*, *L. jensenii* a *Bifidobacterium pseudocatenulatum*.

Graf č. 7.: Srovnání druhů laktobacilů kultivovaných na agaru Rogosa ze vzorků stolic dárců s konvenční a vegetariánskou dietou.



Graf č. 8.: Srovnání druhů bifidobakterií kultivovaných na WSPMup agaru ze vzorků stolic dárců s konvenční a vegetariánskou dietou.



7. Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo stanovení kvantitativního zastoupení a druhové diverzity bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka v závislosti na dietě. Pro detekci bifidobakterií a laktobacilů v stolicích dárců s konvenční, vegetariánskou a veganskou dietou byla použita metoda kultivace na selektivních médiích s následnou identifikací kolonií metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS. Vzorky byly odebrány od 18 dospělých dobrovolných dárců věku 21-50 let, dvou dětí ve věku 7 let a jednoho kojence ve věku 2 měsíců, krmeného mateřským mlékem od vegetariánské matky.

Názory na vliv vegetariánské stavy s předpokládaným vyšším množstvím vlákniny na kvantitativní zastoupení bifidobakterií a laktobacilů ve střevě nejsou jednotné. Zbořil et al. (2005) ve své práci poukazuje na domněnku, že bakteriální zastoupení normální střevní mikroflóry záleží z velké míry u jednotlivých osob na stravovacích zvyklostech, přičemž dominantní úlohu hraje množství vlákniny ve stravě. Předpokládá, že dlouhodobí konzumenti vyššího množství vlákniny mají významně odlišné kvantitativní poměry v digestivním mikrokosystému s vyšším podílem bifidobakterií a laktobacilů.

V roce 2008 byly vydány výsledky kontrolované studie publikované Costabile et al. (2008), kdy jedné části dobrovolníků byla podávána snídaně obsahující pšeničnou vlákninu ve formě pšeničných snídaňových cereálií. Před začátkem a po ukončení podávání bylo vyhodnoceno množství bifidobakterií a laktobacilů. Srovnání výsledků ukázalo, že po pšeničné vláknině byl ve vzorcích zvýšený počet bifidobakterií a laktobacilů.

Na druhé straně Zimmer et al. (2012) prováděli rozsáhlou studii, v níž se snažili mimo jiné o odlišení fekální mikroflóry vegetariánů a konvenčně se stravujících osob. Došel k výsledku, že vegetariáni měli ve svých vzorcích významně nižší počet bifidobakterií než konvenčně se stravující osoby. K podobnému výsledku jako Zimmer et al., došel již v roce 1975 Reddy et al. (1975) s výzkumem zaměřujícím se na fekální mikroflóru. Tento výzkum dokazoval významné snížení bifidobakterií a laktobacilů v období konzumace stravy bez masa a masných výrobků, které byly nahrazené rostlinnými produkty.

V kapitole 5.1. jsou uvedeny výsledky kvantitativního zastoupení bifidobakterií. Z výsledků vyplývá, že bifidobakterie byly detekovány u osob s konvenční stravou v počtu $9,36 \pm 0,57 \log \text{KTJ/g}$ stolice a u osob s vegetariánskou stravou v počtu $9,55 \pm 0,28 \log \text{KTJ/g}$ stolice. Rozdíl mezi konvenčně se stravujícími osobami a vegetariány činil $0,19 \log \text{KTJ/g}$ stolice ve prospěch vegetariánů. Tento rozdíl nebyl shledán statisticky významným.

Výsledky kapitoly 5.2. poukazují na kvantitativní zastoupení laktobacilů. Z výsledků vyplývá, že ve vzorcích konvenčně se stravujících osob byl počet laktobacilů stanoven na $5,00 \pm 1,17 \log \text{ KTJ/ g stolice}$. U vegetariánů byl detekován počet $4,59 \pm 1,13 \log \text{ KTJ/ g stolice}$. Rozdíl mezi konvenčně se stravujícími osobami a vegetariány činil $0,41 \log \text{ KTJ/ g stolice}$ ve prospěch konvenčně se stravujícího osob a opět zde nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

Naším výzkumem se tedy nepotvrdil předpoklad Zbořila et al. (2005) a Costabile et al. (2008) o vyšším podílu bifidobakterií a laktobacilů u osob s konzumací vyššího množství vlákniny ve stravě. Nepotvrdil se však ani výzkum Zimmera et al. (2012) a Reddy et al. (1975) o významně nižším počtu bifidobakterií u vegetariánsky se stravujících osob.

Jedním z možných odůvodnění odlišných výsledků při porovnání naší práce a výše uvedených prací může být v množství dárců. Zimmer et al. (2012) pracoval se 144 vegetariány a stejným počtem konvenčně se stravujících osob. Naše skupina čítala 10 osob s konvenční stravou a 9 osob s vegetariánskou stravou. I přes tento fakt se výsledky autorů pracujícího s větším počtem dárců rozcházejí. Z výsledků vyplývá, že zastoupení laktobacilů bylo velmi variabilní. Jedno z možných vysvětlení je, že zde může mít velký vliv aktuální dieta. Pro verifikaci výsledků by bylo zapotřebí provést opakované odběry a analýzy.

Díky specifické preferenci jednotlivých bakterií ke složení substrátu jsme předpokládaly u vegetariánů s potenciálně vyšším množstvím vlákniny ve stravě také vyšší druhovou diverzitu těchto dvou rodů. Graf 7 a 8 ovšem poukazuje na to, že kvalitativní rozdíly mezi vegetariány a konvenčně se stravujícími osobami nejsou tak významné. K totožnému závěru došla i Hybernová et al. (2014), kdy ve svém rozsáhlém výzkumu identifikovali u vegetariánů druhy *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Bifidobacterium breve*. U konvenčně se stravujících osob identifikovali *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus catenaforma* *Bifidobacterium breve*.

V roce 1899 izoloval Henry Tissier jako první bifidobakterie ze stolice kojenců. S pokračujícím výzkumem bifidobakterií byl tento rod izolován i z dalších ekologických nik. U člověka byl identifikován v gastrointestinálním traktu či v dutině ústní. Mezi další ekologické niky, kde můžeme nalézt tento rod, patří gastrointestinální trakt zvířat a hmyzu.

Dále pak odpadní vody, kde se tyto bakterie nachází v důsledku sekundární kontaminace (Russell et al., 2011).

V střevě člověka má rod *Bifidobacterium* nezastupitelnou úlohu. Ventura et al. (2004) uvádí, že největší kvantitativní zastoupení ve střevním traktu dospělých osob činí devět druhů bifidobakterií. Jedná se o druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. gallicum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, a *B. pseudocatenulatum*. V našem případě byly ze vzorků stolic izolované druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*. Jedná se tedy o druhy běžně přítomné v trávicím traktu dospělých jedinců. Druh *B. longum* jsme s jistotou identifikovali pouze na druhové úrovni. Nemůžeme tedy potvrdit, zda se jednalo o poddruh *B. longum* subsp. *longum*, a nebo *B. longum* subsp. *infantis*. Žádný z izolátů bifidobakterií nebyl izolován jako druh *B. angulatum*, *B. breve* a *B. gallicum*, které jsou běžně přítomny ve střevním traktu.

U bifidobakterií se vyskytl 1 druh, který byl identifikován jen u konvenčně se stravujících osob. Jednalo se o druh, *B. animalis* subsp. *lactis*. U vegetariánů byl vyizolován druh *B. pseudocatenulatum*, který nebyl vyizolován u konvenčně se stravujících osob. Nicméně je třeba zmínit, že druh *B. animalis* subsp. *lactis* je druh, který se v trávicím traktu člověka vyskytuje přechodně, jelikož je široce rozšířeným probiotickým druhem bifidobakterií, jež je přidáván do mléčných výrobků či doplňků stravy.

V roce 1901 byl panem Beijerinckem poprvé popsán rod *Lactobacillus* (Görner a Valík, 2004). Již roku 1912 ruský vědec Ilja Mečnikov upozornil na význam rodu *Lactobacillus*, který má schopnost kolonizovat zažívací trakt a pozitivně působit na zdraví hostitele (Rožy et al., 2012). Některé z druhů *Lactobacillus* nalézáme jen v jedné či na několika málo ekologických nikách, zatímco jiné druhy jsou méně specializované a vyskytují se ve více nikách (Jardine, 2009). Přítomnost *Lactobacillus* se podařilo prokázat ve fermentovaných rostlinných a živočišných materiálech, půdě, trávicím traktu zvířat a lidí (Sungsoo Cho a Finocchiaro, 2010). V lidském těle se dále nacházejí ve vagině a dutině ústní (Görner et Valík, 2004). Nejdůležitější funkci hraje rod *Lactobacillus* ve střevě. Ze vzorků lidské stolice jsou běžně izolovány druhy *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* subsp. *salicinius* a *L. salivarius* subsp. *salivarius* (Song et al., 2000). V našem případě byly ze vzorků stolice izolované druhy *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*,

L. gaserri, *L. jensenii*, *L. paracasei*, *L. paraplantarum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* a *L. vaginalis*. Všechny námi vyizolované druhy s výjimkou 3 druhů řadíme do běžné střevní mikroflóry.

Mezi bakterie běžně neosidlující střevní mikroflóru řadíme *L. brevis*, *L. paraplantarum* a *L. vaginalis*. Druh *L. brevis* se může v lidském trávicím traktu usídlit pomocí stravy bohaté na fermentované potraviny a probiotické doplňky (Dal Bello et al., 2003). Druh *L. paraplantarum* se vyskytuje v lidském trávicím traktu, ale ne v takovém kvantitativním množství, aby byl přiřazen k běžné střevní mikroflóře (Marie-Christine, 1996). Druh *L. vaginalis*, jak již název napovídá, nalzáme v početném zastoupení ve vzorcích z vagíny (Görner et Valík, 2004). Do našich izolátů se mohl u ženy dostat sekundární kontaminací.

Druh *L. delbruckii* jsme s jistotou identifikovali pouze na druhové úrovni. Nemůžeme tedy potvrdit, zda se jednalo o poddruh *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* či *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, druh *L. paracasei* jsme také identifikovali na druhové úrovni. Nemůžeme tedy potvrdit, zda se jednalo o poddruh *L. paracasei* subsp. *paracasei* nebo *L. paracasei* subsp. *tolerans* jako poslední byl na druhové úrovni identifikován druh *L. salivarius*. Nemůžeme tedy potvrdit, zda se jedná o poddruh *L. salivarius* subsp. *salicinius* či *L. salivarius* subsp. *salivarius*.

Žádný z izolátů laktobacillů nebyl izolován jako druh *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. reuteri*, které jsou běžně přítomny ve střevním traktu.

U laktobacilů se vyskytly 3 druhy, jež byly identifikovány pouze u osob s konvenční stravou. Jednalo se o druhy *Lactobacillus brevis*, *L. gaserri* a *L. paraplantarum*. U vegetariánů byly vyizolovány 2 druhy, jež nebyly nalezeny u osob s konvenční stravou. Jednalo se o druhy *Lactobacillus delbruckii* a *L. jensenii*.

Zajímavé je také srovnání druhového zastoupení bifidobakterií a laktobacilů u vegetariánské rodiny. U matky byly identifikovány druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum*, *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus rhamnosus* a *L. vaginalis*, u kojence byly izolovány druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum* a *Lactobacillus vaginalis*. Z výsledků vyplývá, že kojeneček má ve svém trávicím traktu totožné laktobacily a bifidobakterie jako matka. U otce této rodiny byly identifikovány druhy *B. adolescentis*, *B. longum*, *L. paracasei*, a *L. vaginalis*. U sedmileté dívky byly izolovány druhy *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. catenulatum* a *L. plantarum*. Z výsledků vyplývá, že bakterie jsou ve velké většině shodné u všech členů rodiny.

8. Závěr

Domnívali jsme se, že izoláty od vegetariánů a vegana budou díky předpokládanému vyššímu obsahu vlákniny ve stravě obsahovat vyšší počet bifidobakterií a laktobacilů v rozmanitější škále druhů. Zjistily jsme však, že kvantitativní rozdíly mezi jednotlivými skupinami jsou statisticky nevýznamné.

Zajímavější rozdíly se vyskytly u druhového zastoupení jednotlivých bifidobakterií a laktobacilů. Ze vzorků od dárců s vegetariánskou a veganskou stravou byly vyizolovány 4 druhy laktobacilů, které nebyly vyizolovány u konvenčně se stravujících osob, šlo o druhy *Lactobacillus delbruckii*, *L. jensenii*, *L. crispatus* a *L. oris*. Z rodu *Bifidobacterium* byl vyizolován 1 druh. Konkrétně se jednalo o druh *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Naproti tomu některé druhy, jako například *Lactobacillus brevis*, *L. paraplantarum* či *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, jsme vyizolovali pouze u konvenčně se stravujících osob. Je však třeba brát v úvahu, že počet dárců byl jen 10 na konvenční dietě a 10 vegetariánů/vegan a analýza vzorku stolice byla jednorázová, což může mít značný vliv na výsledek.

Ze zjištěných údajů však vyplývá, že druhové zastoupení bifidobakterií je poměrně stabilní v závislosti na dietě. Zastoupení laktobacilů bylo mnohem variabilnější a jednalo se o rozdíly závislé na dietě jedince a ne skupiny.

Jelikož byly v rámci testování získané izoláty uchovány pro možné budoucí testování, nabízí se zde celá řada jak molekulárně-genetických tak biochemických testů, které mohou prozradit více o substrátových preferencích těchto bakterií a vlivu diety na jejich kolonizaci trávicího traktu.

9. Použitá literatura

Anonim. Druhá identifikace mikroorganismů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF [online]. Státní veterinární ústav Jihlava. [cit. 2014-02-01]. Dostupné z <http://www.svujihlava.cz/229-maldi-tof.html%29> .

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Marvil. Praha. 560 s. ISBN: 8023802976.

Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. P. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiology Reviews [online]. July 2006. [cit. 2014-06-14]. Dostupné z <http://femsre.oxfordjournals.org/content/30/4/487.long>.

Bizzini, A., Greub, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clinical Microbiology and Infection [online]. 2010. [cit. 2015-02-01]. Dostupné z <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X1460553X>.

Bunešová, V., Musilová, Š., Geigerova, M., Pechar, R., Rada, V. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. Journal of Microbiological Methods [online]. 2014. 109 (2015). [cit. 2015-03-16]. Dostupné z https://www.email.cz/download/i/upyjqAWRS92WH8R6KEC9zL7gTMrR118neBOSmgP9PrHiNdGnrEROjoVYjyIRZBsurHCnOhg/Comparison%20of%20mupirocin-based%20media%20for%20selective%20enumeration%20of%20bifidobacteria%20in%20probiotic%20supplements_VB_2015%20-%20kopie.pdf.

Cain, T. C., Lubman, D. M., Weber, W. J., Verte, A. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry [online]. Prosinec 1994. 8 (12). [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.1290081224/abstract>.

Costabile, A., Kliner, A., Fava, F., Napolitano, A., Fogliano, V., Leonard, C., Gibbon, G. R., Tuohy, K. M. Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. British Journal of Nutrition

[online]. 2008. 99 (01). [cit. 2015-27-02]. Dostupné z <http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FBJN%2FBJN99_01%2FS0007114507793923a.pdf&code=ca7a3ffb24bad7853a840b894cced959>.

Dal Bello, F., Walter, J., Hammes, W.P., Hertel, C. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microbial Ecology* [online]. 2003. 45 (4). [cit. 2015-03-16]. Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00248-003-2001-z>>.

Dekker, J. P., Branda, J. A. MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter* [online]. 2011. 33 (12). [cit. 2015-02-01]. Dostupné z <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.05.003>>.

Dušková, M., Kameník, J., Karpíšková, R. 2011. Význam laktobacilů v masných výrobcích. *Maso*. 22 (4). 12-16.

Friedecký, D., Lemr, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2012. 3. [cit. 2015-02-01]. Dostupné z <<http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>>.

Giraffa, G., Chanishvili, N., Widyastuti, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology* [online]. 2010. 161 (6). [cit. 2015-02-02]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250810000549>>.

Görner, F., Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin : princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Malé centrum. Bratislava. 528 s. ISBN: 8096706497.

Gray, J. 2006. Dietary fibre Definition, Analysis, Physiology and Health. ILSI Europe. Belgie. 36s. ISBN: 907863703X.

Grygárková, S. Vlákna. CELOSTNIMEDICINA.CZ [online]. Červen 2008. [cit. 2015-02-02]. Dostupné z <<http://www.celostnimedicina.cz/vlasknina.htm>>.

Ho, Y. P., Reddy, P. M. Advances in mass spectrometry for the identification of pathogens. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. May 2011. 30 (6). [cit. 2015-02-04]. Dostupné z <http://www.readcube.com/articles/10.1002%2Fmas.20320>.

Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persóna, C. C., Voorhees, K. J., Lay, J. O. Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spektrometry. *Rapid Communications in Mass Spektrometry* [online]. 1996. 10. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z http://www.readcube.com/articles/10.1002%2F%28SICI%291097-0231%2819960731%2910%3A10%3C1227%3A%3AAID-RCM659%3E3.0.CO%3B2-6?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1.

Hull, M.W., Chow, A.W. An approach to oral infections and their management. *Current Infectious Disease Reports* [online]. 2005. 7 (1). [cit. 2014-02-04]. Dostupné z <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11908-005-0019-8#page-2>.

Hybernová, E., Birošová, L., Naftová, K., Štofirová, J., Šaková, N., Olejníková, P., Kaliňáková, B. Testing of selected probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from vegetarians and meat-eaters faeces. *Acta Chimica Slovaca* [online]. 2014. 7 (1). [cit. 2015-03-09]. Dostupné z <http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCcQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.degruyter.com%2Fdg%2Fviewarticle.fullcontentlink%3Apdfeventlink%2F%24002fj%24002facs.2014.7.issue-1%24002facs-2014-0008%24002facs-2014-0008.pdf%3Ft%3Aac%3Dj%24002facs.2014.7.issue-1%24002facs-2014-0008%24002facs-2014-0008.xml&ei=3CD-VOiXM-vXygP8hIDIDg&usq=AFQjCNHX7iuVIUHx0mesvDSAuoB2UWC6JQ&bvm=bv.87611401.d.bGQ>.

Jardine, S. 2009. *Prebiotics and Probiotics*, 2nd Edition. Leatherhead Food International. United Kingdom Surrey. 152 p. ISBN 978-1-905224-52-4.

Kadlčík, V., Kodíček, M., Hassman, M. Využití hmotnostní spektrometrie na principu MALDI – TOF pro studium prostorové struktury proteinů. *Chemické listy* [online]. Duben 2002. [cit. 2015-02-03]. Dostupné z http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2002_07_06.pdf.

- Kalač, P. 2008. Soudobý pohled na vlákninu potravy. *Výživa a potraviny*. 63 (6). 160-162.
- Kohout, P. Probiotika, historie a současnost. *Medicína po promoci* [online]. Únor 2010. [cit. 2014-09-10]. Dostupné z <http://www.tribune.cz/clanek/17621>.
- Krejsek, J., Kundlová, M., Koláčková, M. Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflora a individuální imunitní reaktivita. *Pediatric pro praxi* [online]. Březen 2007. 8 (3). [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2007/03/07.pdf>.
- Kunová, V. 2004. *Zdravá výživa*. 1 vydání. Grada. Praha. 136 s. ISBN: 8024707365.
- Lewis, J. K., Wei, J., Siuzdak, G. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry* [online]. 2000. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z http://masspec.scripps.edu/publications/public_pdf/64_art.pdf.
- Mai, V., Draganov, P.V. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World Journal of Gastroenterology* [online]. Januar 2009. 15 (1). [cit. 2014-09-10]. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2653298/>.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* [online]. March 2006. 16 (3). [cit. 2014-09-10]. Dostupné z http://ac.els-cdn.com/S0958694605000816/1-s2.0-S0958694605000816-main.pdf?_tid=a77a00f0-b1d7-11e4-b4c9-00000aabb0f26&acdnat=1423650231_33f140ee038aa583362c7539a265bee5.
- Marie-Christine, C., Jean-Claudie, H., Françoise, B. Lactobacillus paraplantarum sp. nov., a New Species Related to Lactobacillus plantarum. *INTERNATIONAL JOURNAL OF*

SYSTEMATIC BACTERIOLOGY [online]. April 1996. 46 (2). [cit. 2014-09-10]. Dostupné z <http://ijs.sgmjournals.org/content/46/2/595.long>.

Murray, R. P., Rosenthal, S. K., Pfaller, A. M. 2007. Medical Mikrobiology 7th ed. Elsevier/Saunders. Philadelphia. 826 p. ISBN: 9780323086929.

Nditange, S., Li J. Bifidobacterium in Human GI Tract: Screening, Isolation, Survival and Growth Kinetics in Simulated Gastrointestinal Conditions. INTECH [online]. January 2013. [cit. 2015 - 02 - 03]. Dostupné z <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/bifidobacterium-in-human-gi-tract-screening-isolation-survival-and-growth-kinetics-in-simulated-gast>.

Nevoral, J. PREBIOTIKA, PROBIOTIKA A SYNBIOTIKA. Pediatrie pro praxi [online]. Únor 2005. 6 (2). [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://www.solen.sk/pdf/Nevoral.pdf>.

Nevoral, J. Prebiotika a probiotika v pediatrii. Pediatrie pro praxi [online]. Březen 2012. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://www.pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2012/03/07.pdf>.

Nováková, E. Střevní mikroflóra a trávicí soustava [online]. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://www.menupodlegenu.cz/strevni-mikroflora-a-travici-soustava/>

Ojetti, V., Gigante, G., Ainiora, M. E., Fiore, F., Barbaro, F., Gasbarrini, A. Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. Digestive and Liver Disease Supplements [online]. 2009. 3. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z http://ac.els-cdn.com/S1594580409600176/1-s2.0-S1594580409600176-main.pdf?_tid=63a69c8c-b1da-11e4-97b9-00000aacb361&acdnat=1423651406_04b0983a86a39ecadac7cc521cb98151.

Pei, Z., Bini, E. J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F., Blaser, M. J. Bacterial biota in the human distal esophagus. The National Academy of Sciences [online]. 2003. 101 (12). [cit. 2014-06-13]. Dostupné z <http://www.pnas.org/content/101/12/4250.full>.

Pozler, O. Význam vlákniny v potravě s ohledem na dětský věk. Výživa a potraviny [online]. 2009. 5. [cit. 2014-06-13]. Dostupné z <http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCAQFjAA>

[http%3A%2F%2Fvyzivadeti.cz%2Fwp-content%2Fuploads%2F2013%2F05%2Fresource-41.doc&ei=qDTbVPuFPIOEPfa7gLAM&usg=AFQjCNGJkt8vyTgu5rsqh3BK09NDfW62GQ&bvm=bv.85761416,d.ZWU](http://www.vyzivadeti.cz/wp-content/uploads/2013/05/resource-41.doc&ei=qDTbVPuFPIOEPfa7gLAM&usg=AFQjCNGJkt8vyTgu5rsqh3BK09NDfW62GQ&bvm=bv.85761416,d.ZWU)>.

Radosz-Komoniewska, H., Bek, T., Józwiak, J., Martirosian, G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. Juni 2005. 11 (8). [cit. 2014-06-13]. Dostupné z <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2005.01207.x/pdf>>.

Reddy, B. S., Weisburger, J. H., Wynder, E. L. Effects of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on fecal microflora and steroids in man. *Journal of Nutrition* [online]. July 1975. 105 (7). [cit. 2015-02-27]. Dostupné z <http://jn.nutrition.org/content/105/7/878.long>>.

Roży, A., Jaguś, P., Chorostowska-Wynimko, J. Probiotics in the prevention and treatment of allergic diseases. *Pneumonologia Alergologia Polska* [online]. 2012. 80 (1). [cit. 2015-02-27]. Dostupné z <http://czasopisma.viamedica.pl/pap/article/view/27617>>.

Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Mikrobiology* [online]. Septembr 2011. 149 (1). [cit. 2015-02-27]. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763022>>.

Scardovi, V., Biavaty, B., Moore, W. E. C. Electrophoretic Patterns of Proteins in the Genus *Bifidobacterium* and Proposal of Four New Species. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* [online]. July 1982. 32 (3). [cit. 2015-02-01]. Dostupné z <http://ijs.sgmjournals.org/content/32/3/358.full.pdf+html>>.

Sedláček, I. 2007. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita. Brno. 270 s. ISBN: 8021042079.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M., Raoult, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrixassistedlaser

desorption ionization time-of-flight mass spektrometry. PubMed [online]. August 2009. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <<http://cid.oxfordjournals.org/content/49/4/543.full.pdf>>.

Scharlau, D., Borowicki, A., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Miene, C., Munjal, U., Stein, K., Gleis, M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. Mutation Research/Reviews in Mutation Research [online]. July–August 2009. 682 (1). [cit. 2014-06-13]. Dostupné z <http://ac.els-cdn.com/S1383574209000386/1-s2.0-S1383574209000386-main.pdf?_tid=5a7fcf14-b1e1-11e4-a65a-00000aacb360&acdnat=1423654397_4e451203e6a77b6d33c346a0d732387d>.

Song, Y. L., Kato, N., Liu, Ch.X., Matsumiya, Y., Kato, H., Watanabe, K. Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S–23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. Journals [online]. June 2000. 187 (2). [cit. 2015-02-27]. Dostupné z <<http://femsle.oxfordjournals.org/content/187/2/167.long>>.

Sungsoo Cho, S., Finocchiaro, E. T. 2010. Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications. CRC Press. Boca Raton. 435 p. ISBN: 1420062131.

Švestka, T. MIKROFLÓRA TRÁVICÍHO TRAKTU A PROBIOTIKA. Pediatrie pro Praxi [online]. Srpen 2007. [cit. 2015-02-03]. Dostupné z <<http://www.pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2007/04/06.pdf>>.

Taichmanová, Z. MALDI -TOF , VITEK 2 - nové vybavení Laboratoře klinické mikrobiologie. New Spadia [online]. Březen 2013. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://www.spadia.cz/news/2013/201303_News_13.pdf>.

Theel, E. S. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. MAYO CLINIC [online]. January 2013 [cit.2014-02-04]. Dostupné z <<http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2013/01-maldi-tof-mass-spectrometry/index.html>>.

Tláskal, P. Trávicí trakt. Zdraví E 15 [online]. Prosinec 2010. 21. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-pacientske-listy/travici-trakt-456346>.

Topley, W. W. C., Wilson, S. 2005. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 10th ed. Hodder Arnold. London. 1544 p. ISB: 0340885653.

Velišek, J. 2002. Chemie potravin 1.2. upravené vyd. Osis. Tábor. 344 s. ISBN: 8086659003.

Ventura, M., Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., Zink, R. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. Antonie van Leeuwenhoek [online]. October 2004. 86 (3). [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://link.springer.com/article/10.1023/B:ANTO.0000047930.11029.ec#page-1>.

Vlková, E., Medková, J., Rada, V. Comprasion of Four Metods for Identification of Bifidobacteria to the Genus Level. Czech Journal of Food Science [online]. 2002. 20 (5). [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/50910.pdf>.

Zbořil, V. 2005. Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. Grada Publishing. Praha. 153 s. ISBN: 8024705842.

Zimmer, J., Lange, B., Frick, J. S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., Rusch, K., Klosterhalhalfen, S., Enck, P. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. European Journal of Clinical Nutrition [online]. 2012. 66. [cit. 2015-02-27]. Dostupné z <http://www.svb.org.br/publicacoes/trabalhos-academicos/file/Artigo%20|%20A%20vegan%20or%20vegetarian%20diet%20substantially%20alters%20the%20human%20colonic%20faecal%20microbiota%20|%20J%20Zimmer%252Epdf>.

Použité obrázky:

Anonim. «Хорошие» бактерии в составе LACTOBEX® [online]. Lactobex. 2013. [cit. 2015 - 2 - 03]. Dostupné z <<http://www.lactobex.lv/ru/content/khoroshie-bakterii-v-sostave-lactobex>>.

Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., Ferroni, A., Gutmann, L., Nassif, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* [online]. January 2011. 44 (1). [cit. 2015-02-13]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000991201000305X>>.

Shigwedha, N., Jia, L. Bifidobacterium in Human GI Tract: Screening, Isolation, Survival and Growth Kinetics in Simulated Gastrointestinal Conditions. InTech [online]. 2013. [cit. 2015 - 2 - 03]. Dostupné z <<http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/bifidobacterium-in-human-gi-tract-screening-isolation-survival-and-growth-kinetics-in-simulated-gast>>.

Shnell, M. Friendly tenants in the human gut: The genome of *B. longum*. Geonome News Network [online]. October 2002. [cit. 2015 - 2 - 03]. Dostupné z <http://www.genomenewsnetwork.org/articles/10_02/bifido.shtml>.

Theel, E. S. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. MAYO CLINIC [online]. January 2013 [cit.2014-02-04]. Dostupné z <<http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2013/01-maldi-tof-mass-spectrometry/index.html>>.