

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie výživy a dietetiky



Druhová diverzita bifidobakterií hostitelů s různou dietou

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lada Kratochvílová

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

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma druhová diverzita bifidobakterií hostitelů s různou dietou vypracovala samostatně pod vedením Ing. Věry Bunešové, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č.111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne

Podpis autora

Poděkování

Mé poděkování patří Ing. Věře Bunešové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat kolegyni z laboratoře Bc. Lucii Kaňové a dárčům vzorků, bez nichž by sepsání této diplomové práce nebylo možné.

Souhrn

Ve své diplomové práci se zabývám druhovou diverzitou bifidobakterií hostitelů s různou dietou. Pro tuto práci byly použity výsledky detekce bifidobakterií pomocí kultivačně závislé metody MALDI-TOF MS z mé bakalářské práce, která se týkala druhové diverzity bifidobakterií a laktobacilů v trávicím traktu člověka v závislosti na dietě.

Vzorky stolice totožné se vzorky použitými v mé bakalářské práci byly identifikovány pomocí kultivačně nezávislé metody PCR. Předpokládali jsme rozdíl v detekovaném druhovém zastoupení bifidobakterií u konvenčně se stravujících osob a vegetariánů a to nejen díky dietě, ale především díky rozdílné metodě identifikace.

Pomocí identifikace PCR byly detekovány druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. animalis* subsp. *lactis*. Většina těchto druhů je typická pro mikrobiotu dospělého jedince. Na základě výsledků identifikace bylo stanoveno, že jak u vegetariánů tak i u konvenčně se stravujících se osob převládaly druhy *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis* a *B. catenulatum/pseudocatenulatum*.

Při zpracování údajů získaných pomocí metody PCR bylo zjištěno, že konvenčně se stravující osoby a vegetariáni měli z 91% totožnou mikrobiotu trávicího traktu.

Po porovnání identifikace pomocí kultivačně nezávislé metody PCR odpovídá identifikace z velké části výsledkům získaným kultivačně nezávislou metodou MALDI-TOF MS. Nicméně při použití metody PCR byly častěji identifikovány druhy, jako jsou například *B. bifidum* a skupina *B. catenulatum* (*B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*). Ani jedním z použitých přístupů se vzorcích nepodařilo detekovat druh *B. breve*, který je typický pro lidskou mikrobiotu.

Ze zjištěných údajů vyplývá, že druhové zastoupení bifidobakterií je poměrně stabilní v závislosti na dietě. Jak v trávicím traktu lidí konzumující konvenční dietu tak i u vegetariánů byly detekovány druhy bifidobakterií typické pro mikrobiotu dospělého jedince.

Kultivačně nezávislá metoda PCR se ukázala jako citlivější. Toto poukazuje na nedostatky kultivačních metod. Bylo by tedy vhodné zaměřit se na specifitu druhů jako je *B. angulatum* a *B. dentium* s cílem podpoření detekce těchto hůře kultivovatelných druhů.

Klíčová slova: bifidobakterie, druhová diverzita, identifikace, DNA, PCR

Summary

In my diploma thesis I am dealing with bifidobacterial diversity of hosts with different diets. For this work I used the results of culture dependent detection of bifidobacteria and MALDI-TOF MS identification obtained during the processing of my bachelor thesis, which was focused on “Species diversity of bifidobacteria and lactobacilli in gastrointestinal tract of humans depending on the diet”.

The samples of the stool, which were identical with the samples used in my bachelor thesis, were identified by culture independent method PCR. We presumed a bifidobacterial species variability of persons on conventional diet and vegetarians. Not only due the diets, but mainly because different identification methods, which were used.

Using the PCR identification there were detected species such as *Bifidobacterium adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, and *B. animalis* subsp. *lactis*.

Most of these species are typical for microbiota of adults. Based on these identification results was determined, that predominant species, for vegetarians and also for persons on conventional diet, are *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis* and *B. catenulatum/pseudocatenulatum*.

During the processing of data obtained with the help of the PCR method the results have shown, that the persons on conventional diet and the vegetarians had a 91% identical bifidobacteria and lactobacilli in the gastrointestinal tract.

After the comparison of identification using the culture independent method PCR it was mostly identical with the end results obtained by using the culture independent method MALDI-TOF MS. Nevertheless by using PCR there were, more often, identified species which are for example *B. bifidum* and group *B. catenulatum* (*B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*). Not with any of the used approaches was it possible in samples to detect *B. breve* specie typical for microbiota of a human.

From the findings of the data it seems that the representation of *Bifidobacterium* species is relatively stable depending on the diet. Both in the gastrointestinal tract of the persons with conventional diet as well as with the vegetarians there were detected bifidobacterial species typical for adults.

Culture independent method PCR has shown to be more sensitive. This is pointing to the deficiency of culture methods. There can be helpful to focus on the species such as *B. angulatum* and *B. dentium* with the goal to support detection of these less cultivable species by cultivation on selective media.

Keywords: bifidobacteria, species diversity, identification, DNA, PCR

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Hypotéza.....	12
3. Cíle diplomové práce.....	13
Cíl teoretické části.....	13
Cíl praktické části.....	13
4. Literární rešerše.....	14
4.1. Mikroflóra trávicího traktu člověka.....	14
4.1.1. Kvantitativní a kvalitativní složení mikroflóry v jednotlivých částech trávicího ústrojí.....	15
4.2. Vliv výživy na rozmanitost bakteriálního zastoupení v trávicím traktu.....	18
4.2.1. Západní strava.....	18
4.2.2. Vliv vlákniny na mikrobiální diverzitu.....	19
4.3. Vlákna.....	19
4.4. Význam mikroflóry trávicího traktu.....	21
4.5. Bifidobakterie.....	22
4.5.1. Zařazení.....	23
4.5.2. Vlastnosti.....	23
4.5.3. Růst.....	24
4.5.4. Výskyt.....	24
4.5.5. Význam bifidobakterií v trávicím traktu člověka.....	25
4.5.6. Bifidobakterie izolované z lidských izolátů.....	26
4.6. Metody detekce mikroorganismů v trávicím traktu člověka.....	29
4.6.1. Kultivačně závislé metody identifikace.....	29
4.6.2. Kultivačně nezávislé metody identifikace.....	30
4.6.3. Metody detekce bifidobakterií v TT člověka.....	30
4.6.4. Postup metody testu F6PPK.....	31

4.7. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	31
4.7.1. Identifikace bakterií pomocí hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF MS.....	32
4.7.2. Identifikace bifidobakterií pomocí MALDI-TOF.....	32
4.7.3. Princip metody.....	33
4.8. Identifikace bakterií pomocí PCR.....	34
4.8.1. Metoda PCR	35
Úvodní denaturace.....	35
Denaturace.....	35
Hybridizace.....	35
Elongace.....	36
Závěrečná elongace.....	36
Pausa.....	36
Vizualizace.....	36
4.8.2. Identifikace bifidobakterií pomocí PCR.....	37
4.9. PCR v reálném čase (RT PCR) spojená s reverzní transkripcí.....	37
4.10. DGGE.....	38
4.12.NGS.....	38
5. Materiály a metody.....	40
5.1. Původ a charakterizace vzorků.....	40
5.2. Izolace bakterií ze selektivních agarů použité pro identifikaci MALDI-TOF MS.....	41
5.3. Identifikace bifidobakterií na úroveň rodu.....	42
5.4. Identifikace metodou MALDI-TOF MS.....	42
5.5. Izolace bakteriální DNA ze vzorků stolice.....	43
5.6. Rodově a druhově specifická PCR.....	44
5.6.1. Příprava PCR reakce.....	44
5.6.2. Reakce PCR.....	46
5.7. Vizualizace PCR produktu.....	47

6. Výsledky.....	49
6.1. Bifidobakterie detekované pomocí kultivačně závislé metody - MALDI-TOF MS.....	49
6.2. Výsledky identifikace pomocí kultivačně nezávislé metody – PCR.....	51
7. Diskuze.....	57
8. Závěr.....	63
9. Příloha.....	64
10. Použitá literatura.....	65

1. Úvod

Mikrobiota trávicího traktu člověka je v různých částech kvantitativně i kvalitativně velmi variabilní. Tuto variabilitu ovlivňuje široká škála faktorů. Mezi tyto faktory patří například věk, zdravotní stav či použití antibiotik. Jeden 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 jedinci kvůli etickým, sensorickým či náboženským důvodům vyřadí ze svého jídelníčku maso či všechny živočišné produkty a konzumují jen rostlinné produkty. Tyto rostlinné produkty mají zpravidla daleko vyšší obsah vlákniny než živočišné produkty. Díky substrátovým preferencím jednotlivých rodů a druhů bakterií se dá očekávat, že změna jídelníčku a tím změna substrátu povede ke změně složení mikrobioty v trávicím traktu.

Mezi neaktivnější část trávicího traktu, co se mikrobioty týče, patří tenké a tlusté střevo. V tomto prostředí žije mnoho bakterií, které mají na zdraví hostitele jak pozitivní, tak negativní vliv. Tato mikrobiota má nezastupitelnou roli v trávení tráveniny, produkci vitamínů a v neposlední řadě chrání svou přítomností povrch střeva před napadením potenciálními patogeny. Mezi pozitivní bakterie ve střevě řadíme bakterie rodu *Bifidobacterium*.

Rod *Bifidobacterium* je přirozenou součástí gastrointestinálního traktu lidí, teplokrevných zvířat ale i hmyzu se sociálním způsobem života jako jsou například včely či čmeláci. U člověka se tento rod se vyskytuje prakticky ve všech částech trávicího traktu, ústní dutinou počínaje, konečníkem konče. Nejdůležitější roli však mají v ekosystému tlustého střeva.

První osídlení bifidobakteriemi probíhá podle nejnovějších výzkumů již v prenatálním věku pomocí přenosu bakterií přes placentu. Největší množství bifidobakterií se však do novorozence dostane při porodu. V novém prostředí se tento rod během 2 až 3 dnů natrvalo usadí a u kojenců krmených mateřským mlékem se stává dominantní složkou tlustého střeva. Jejich velkou výhodou oproti ostatním bakteriím mléčného kvašení je produkce laktátu a acetátu ve vhodném poměru 2:3 což má zásadní vliv na potlačení patogenních a potenciálně patogenních bakterií. Další důležitá vlastnost připisovaná bifidobakterií je schopnost zutilizovat nejen jednoduché cukry ale i komplexní sacharidy, které jsou významnou složkou diety. Jelikož se substrátové preference jednotlivých rodů *Bifidobacterium* liší, lze

předpokládat rozdílné zastoupení rodů u jedinců s rozdílnou dietou jako je například vegetariánství či konvenční dieta.

K sledování druhového zastoupení mikrobioty lze využít celé řady metod. V posledních letech se výzkum čím dál tím víc snaží soustředit na rozvoj molekulární biologie s cílem správné identifikace, popisu a charakterizace bakterií. Jedněmi z nejčastěji používaných metod se staly FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), MALDI-TOF (hmotnostní spektrometrie), sekvenování 16S rDNA a PCR (polymerázová řetězová reakce).

Metoda PCR je přesnou, citlivou a nenáročnou metodou, využívající amplifikaci specifického úseku DNA. Tato metoda podobně jako metoda MALDI-TOF umožňuje detekci mikroorganismů v různých vzorcích, jako jsou například mléčné výrobky či stolice.

2. Hypotéza

Bifidobakterie představují významnou komenzální skupinu mikrobioty trávicího traktu. Substrátové preference a vlastnosti jednotlivých druhů těchto bakterií jsou rozdílné a tudíž můžeme očekávat rozdílné druhové zastoupení u hostitele v závislosti na jeho dietě. Dalším významným faktorem pro analýzu druhového zastoupení je zda pro detekci bifidobakterií použijeme kultivačně závislé či kultivačně nezávislé metody identifikace, jelikož některé druhy mohou být hůře kultivovatelné. Lze tedy očekávat, že výsledky druhového zastoupení se budou lišit v závislosti na použité metodě.

3. Cíle diplomové práce

Cíl teoretické části

Cílem teoretické části diplomové práce je shrnout dosavadní poznatky o mikrobiotě trávicího traktu člověka se zaměřením na rod *Bifidobacterium*. Dále pak vyhledat dostupné informace o výzkumech zaměřujících se na vliv diety a mikrobiotu se zaměřením na bifidobakterie v trávicím traktu člověka u osob s konvenční a vegetariánskou dietou.

Cíl praktické části

Cílem praktické části diplomové práce bylo získat informace o kvantitativním druhovém zastoupení bifidobakterií ze vzorků konvenčně se stravujících osob a vegetariánů pomocí PCR analýzy a porovnat informace o kvantitativním a druhovém zastoupení bifidobakterií ve shodných vzorcích získané pomocí metody MALDI-TOF MS z mé bakalářské práce.

4. Literární řešerše

4.1. Mikroflóra trávicího traktu člověka

Mikrobiota gastrointestinálního traktu (GIT) člověka se skládá z komplexních populací, které zahrnují mnoho různých druhů aerobních i anaerobních bakterií, plísni, prvoků, virů a mnoho dalších mikroorganismů (Dragana et al., 2016). Vztah mezi mikrobiotou a hostitelem není pouze komenzální, ale spíše symbiotický (Pagliari et al., 2015).

Za normálních okolností je mikrobiota zdravého jedince poměrně stabilní, jak po kvantitativní tak i kvalitativní straně (Maukonen and Saarcla 2014).

Metody sekvenční analýzy ribozomální RNA a DNA ukazují, že počet mikrobiálních kmenů obsažených ve střevní mikroflóře může dosahovat až 40 000 (Mai and Draganov, 2009). Tyto bakterie mohou vážit až 2 kg a celkový počet se odhaduje až na desítky bilionů mikroorganismů. To znamená, že všichni lidé mají na povrchu sliznic trávicího traktu 20 krát více buněk, než je celkový počet lidských buněk (Pagliari et al., 2015) a 100 krát více genů, než je v celém lidském genomu (Mai and Draganov, 2009). Tyto bakterie tvoří až 60 % hmotnosti stolice (Krejsek et al., 2007).

Mikroflóra trávicího traktu se v průběhu života vyvíjí a mění. Teprve před několika lety ukázaly studie, že plod v děloze matky není aseptický, ale že již v prenatálním věku je trávicí trakt osidlován bakteriemi přenesenými přes placentu matky. Druhotná kolonizace probíhá v případě přirozeného porodu, kdy se do trávicího traktu novorozence často dostávají bakterie z porodního kanálu a perianální oblasti matky (Toh and Vercoe, 2015). Další možnost infikování trávicího traktu kojence je po napití se mleziva s případnými nečistotami z povrchu bradavky. Při první kolonizaci se usídí v trávicím traktu novorozence kolem 1000 druhů mikroorganismů, z nichž je většina anaerobních (Yu-Jie, 2015). Následný vývoj mikroflóry je zcela individuální a závisí na skladbě potravy, pH, lécích, teplotě, vnějších podmínkách, stáří organismu, interakci mezi mikroorganismy a mnoha dalších faktorech (Krejsek et al., 2007). Zhruba ve 2-3 letech se ustaluje mikrobiota dítěte v podobě plně vyvinuté mikrobioty dospělého jedince.

I přesto, že je mikrobiota trávicího traktu velmi stálá, neustále jde o otevřený ekosystém. Tento ekosystém je neustále atakován novými bakteriemi a ostatními mikroorganismy přijímanými potravou. Mnohé z těchto bakterií se mohou přechodně začlenit

a mít vliv na funkci a složení mikrobioty. Přechodná mikrobiota je vysoce dynamický systém (Derrien and Vlieg, 2015).

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 jícn, 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). V tomto unikátním ekosystému žije odhadem až 1000 - 1 200 různých mikrobiálních druhů (Holscher et al., 2015; Maukonen and Saarla 2014).

Dutina ústní

Dutina ústní představuje dokonalý vstup pro bakterie a ostatní mikroorganismy. Kolonizace úst začíná při porodu a to nejčastěji laktobacily a streptokoky (Papaioannou et al., 2009). V ústní dutině jich žije cca 10^{11} na gram tkáně, což je podobné množství jako bakterií v tlustém střevě (Bednář et al., 1996). Toto množství se dá zařadit do cca 600 různých mikrobiálních druhů. Podstatná část bakterií žije v plaku zubů. Z bakterií zde můžeme nalézt početnou anaerobní mikroflóru skládající se z rodů *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacteriu*, *Treponema*, *Wolinela*, *Arachnie*, *Spirochetaes*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces* a *Fusobacterium* (Murray et al., 2007; Papaioannou et al., 2009). Z aerobních bakterií zde můžeme nalézt zástupce rodů *Streptococcus*, *Haemophilus* a *Neisseria* (Murray et al., 2007).

Hltan a jícn

V těchto částech žije poměrně malý počet bakterií. Kvantitativně lze počet bakterií vyjádřit na 10^2 - 10^4 bakterií (Bednář et al., 1996). Mikrobiota v jícnu většinou pochází přenosem bakterií při polykání či dávení. Malý počet bakterií je nejspíše dán vertikální polohou orgánu a rychlosti procházení potravy (Ianiro et al., 2015). Ze zástupců zde můžeme najít kmeny a rody *Firmicutes*, *Lactobacillus*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Streptococcus*, *Fusobacteria* a sporulující *Bacillus* (Ianiro et al., 2015, Pei et al., 2003; Shigwedha and Jia, 2013).

Žaludek

Žaludek byl považován za sterilní orgán díky své schopnosti produkovat kyselinu chlorovodíkovou o velmi vysoké kyselosti (pH 2-4). Tato kyselina funguje jako nespecifická imunita (Nardone and Compare, 2015). I přes toto nehostinné prostředí zde žijí některé druhy laktobacilů, stafylokoků, koliformních bakterií a kvasinek (Švestka, 2007). V 1 mililitru 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). Ze zdravého žaludku byly dále izolovány zástupce různých kmenů bakterií, jako jsou například *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacterium*, *Proteobacteria*. Na úrovni rodů zde byly identifikovány *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia* a *Haemophilus* (Nardone and Compare, 2015).

Tenké střevo

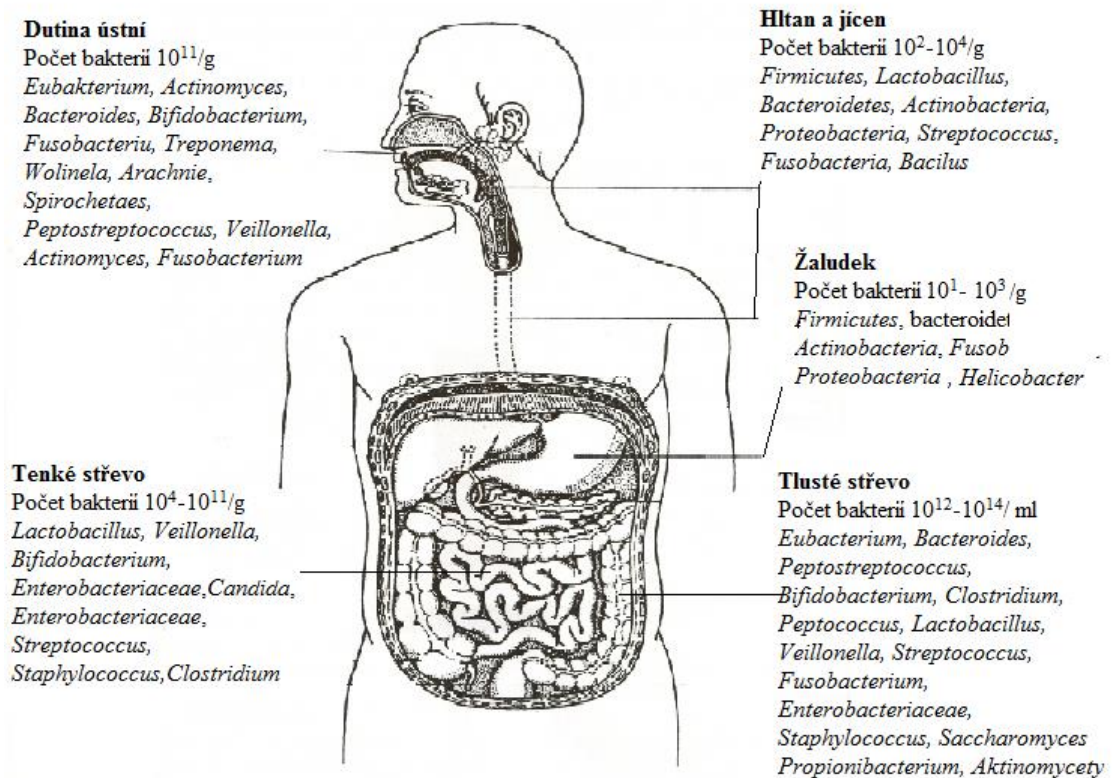
Tenké střevo se dělí na tři části - dvanáctník, lačník a kyčelník. V jednotlivých oddílech je velmi různorodé kvantitativní i kvalitativní zastoupení mikrobioty. V dvanáctníku se nachází jen velmi malá koncentrace bakterií, odhadovaná na 10^4 . Tato skutečnost je dána především kyselou tráveninou přicházející z žaludku a zásaditými žlučnickovými šťávami přicházejícími v tomto místě do střeva (Derrien and Vlieg, 2015; Bednář et al., 1996). V další části (lačníku) se nachází již větší zastoupení bakterií s největším zastoupením rodů *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacterium*, *Staphylococcus* a *Candida*. Kyčelník nejčastěji osidlují *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Candida* a *Clostridium* (Derrien and Vlieg, 2015; Zbořil, 2005). Distálním směrem přibývá bakterií. V okolí ileocekální chlopně dosahuje koncentrace bakterií již 10^8 až 10^{11} na gram tráveniny (Jeffrey et al., 2015).

Tlusté střevo

Informace o složení mikrobioty tlustého střeva poskytují především izoláty stolic dárců a molekulární studie. V této části trávicího traktu se vyskytuje kvalitativně a kvantitativně nejvíce zastoupená mikroflóra (Graf et al., 2015). Na základě molekulárních

studií lze předpokládat, že zde žije více než 1 200 druhů bakterií, z níž hlavní mikroflóru představuje cca 30-40 nejběžnějších druhů (Maukonen and Saarcla 2014; 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 rody *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* a *Saccharomyces* (Švestka, 2007). Dále pak *Propionibacterium* a *Aktinomyces* (Zbořil, 2005). Toto osídlení fermentuje sacharidy a produkuje 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; Derrien and Vlieg, 2015).

Obrázek č. 1.: Rozložení mikrobů v trávicím traktu člověka (Holík et al., 2006), upraveno



4.2. Vliv výživy na rozmanitost bakteriálního zastoupení v trávicím traktu

Jako nejčastější typ diety je u mnoha lidí preferována konvenční dieta, skládající se z jak z rostlinné tak živočišné stravy, zastoupené v různém poměru. Někteří lidé se však mohou rozhodnout, ať už z etického, sensorického, náboženského, finančního či zdravotního důvodu vyřadit ze svého jídelníčku živočišné výrobky. Podle zastoupení živočišných produktů se 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	Vejte, mléko
Laktovegetariáni	Maso, ryby, vejce	Mléko
Ovovegetariáni	Maso, ryby, mléko	Vejte
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).

4.2.1 Západní strava

Pojem konvenční dieta je v zemích Střední Evropy blízce provázána se západní stravou. Typickým problémem západní stravy je obvykle velmi vysoké množství trans nasycených mastných kyselin, tuků, rafinovaných cukrů a zároveň nízké přijímání vlákniny v podobě ovoce, zeleniny, luštěnin a celozrnných výrobků. Tyto rozdíly jsou stanoveny jako

rozdíly běžně konzumované stravy a stravy doporučené Světovou zdravotnickou organizací (WHO) (Graf et al., 2015).

4.2.2. Vliv vlákniny na mikrobiální diverzitu

Zjištění, že dietní zvyklosti trávníka mají vliv na mikroflóru trávicího traktu je záležitostí dlouhodobě známou. 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). Ve studiích není často jasně definovaný rozdíl mezi vegetariánskou a konvenční stravou. Rozdíl mezi těmito stravami spočívá v tom, že vegetariáni nemají ve svém jídelníčku maso a masné výrobky (Graf et al. 2015). Maso a masné výrobky jsou nahrazeny rostlinnou stravou, ve které je, na rozdíl od živočišné stravy, vysoký obsah vlákniny (Zbořil, 2005). Laktoovovegetariáni jakožto i ostatní druhy vegetariánů konzumují ve své stravě bohaté na rostlinné produkty až 55 gramů vlákniny za den. Konvenčně se stravující osoby konzumující typickou západní stravu s nedostatkem rostlinných produktů konzumují kolem 25 gramů vlákniny za den (Nováková, n. d.).

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

4.3. Vláknina

Definice vlákniny není jednotná a je neustále diskutována a drobně měněna. Poprvé byl termín vláknina použit roku 1953. Ovšem až roku 1972 byla ustanovena první definice vlákniny (Kalač, 2008). Velmi často používaná je definice uvedená v Codexu Alimentarius, která definuje vlákninu jako sacharidové polymery s třemi a více monomerními jednotkami,

kteří nejsou tráveny a vstřebávány v tenkém střevě lidského organismu. Do této skupiny se zahrnuje lignin a ostatní sacharidové složky (Graf et al., 2015). Vlákninu 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, rezistentní škrob, 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 (Kalač, 2008). Při fermentaci všech druhů vlákniny vznikají krátké mastné kyseliny, jako jsou například kyselina octová, propionová, máselná a mléčná, přičemž každý druh bakterie metabolizuje tyto kyseliny v jiném poměru (Zbořil, 2005). Pro dospělé osoby je doporučen příjem vlákniny okolo 28-36 gramů na den (Mehta et al., 2015).

V minulosti byla rozdělena vláknina dle rozpustnosti ve vodě a schopnosti tvořit gely na rozpustnou a nerozpustnou. Toto dělení se používá dodnes.

Rozpustná vláknina

Tato frakce vlákniny je součástí některých druhů ovoce jako jsou například jablka či banány, listové a kořenové zeleniny ořechů, obilnin (oves, žito, ječmen), luštěnin či mateřského mléka (Anonim, 2002). Rozpustná vláknina, jak již její název napovídá, má schopnost vstřebávat vodu a zvětšovat svůj objem (Pozler, 2009). Tím změkčuje stolici a zvětšuje objem tráveniny. Také na sebe dokáže navázat cholesterol, který tím pomáhá vylučovat z těla (Grygárková, 2008). Mezi další výhody patří fakt, že navozuje pocit sytosti a zároveň snižuje vstřebávání sacharidů a tuků z potravy. Mezi hlavní složky rozpustné vlákniny patří pektin, inulin, gummy (guarová guma, konjaková guma, xantanová guma atd.) rozpustné hemicelulózy, rezistentní škroby a slizy (Anonim, 2002). 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).

Nerozpustná vláknina

Tato frakce vlákniny se nachází ve většině rostlinných produktů jako je například ovoce (především v jejich slupkách), zelenina, houby, celozrnné obiloviny, otruby, luštěniny a ostatní rostlinné produkty (Mehta et al., 2015). Jak již název napovídá, nerozpustná vláknina se ve vodě nerozpouští a nezvětšuje svůj objem (Velíšek, 2002). Po zkonsumování prochází nerozpustná vláknina v nestráveném stavu. Lidské tělo jí totiž nedokáže svými enzymy rozštěpit a tím ani vstřebat. Tento druh vlákniny na sebe dokáže navázat toxiny a rakovinotvorné látky a podporuje jejich vylučování (Grygárková, 2008). Nemá vliv na kyselost žaludečního obsahu (Anonim, 2002). Zároveň příznivě ovlivňuje dobu, kterou potrava putuje trávicím traktem a v neposlední řadě zlepšuje střevní peristaltiku. Mezi její nevýhody se může řadit zhoršení vstřebávání vitamínů a minerálů při zvýšeném množství této vlákniny ve stravě. Mezi hlavní složky nerozpustné vlákniny patří celulóza, hemicelulóza, beta-glukany, chitin, chitosany, vosky a lignin (Velíšek, 2002). Doporučené množství nerozpustné vlákniny je 70-80% z celkového množství přijímané vlákniny (Mehta et al., 2015).

4.4. 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 se díky sníženému množství kyslíku usídlují fakultativně anaerobní bakterie, mezi něž patří například rody *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Propionibacterium*. V dolní části střeva pak díky úplné absenci kyslíku nalézáme striktně anaerobní bakterie, jako jsou například rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia* a *Peptococcus* (Mills et al., 2015; Zbořil, 2005). Tato mikroflóra zde plní nejdůležitější funkci a to proces trávení. Kromě tohoto procesu dokáže tato mikrobiota zkvasit jinak nestravitelné substráty, tvořit přirozenou ochranu vůči patogenním mikroorganismům, produkovat vitamíny skupiny K, B a biotin, produkovat hormony upravující ukládání tuků v těle a indukovat sekreci antimikrobiálních peptidů (Pagliari et al., 2015). V neposlední řadě tato mikrobiota zlepšuje trávení bílkovin, štěpení mléčného cukru laktózy a štěpení lipidů. V tlustém střevě mikroflóra částečně rozkládá polysacharidy, které nebyly rozloženy v tenkém střevě a odbourává nestrávené složky potravy s obsahem dusíku (Tláskal, 2010). Hraje významnou roli v syntéze

některých mikronutrientů. Příznivě také ovlivňuje vstřebatelnost vápníku a regulaci hladiny cholesterolu (Nováková, n. d.). Při fermentaci vlákniny se tvoří mastné kyseliny s krátkým řetězcem, jako je například acetát, který se snadno absorbuje do jater, propionát, který je substrátem pro jaterní buňky a butyrát, který je vhodným substrátem pro buňky. Mastné kyseliny v neposlední řadě zabraňují růstu potenciálních patogenních organismů, snižují počet mutací a riziko rakoviny (Maukonen and Saarcla 2014; Scharlau et al., 2009). V neposlední řadě se fermentací tvoří plyny H₂, CO₂, CH₄ a H₂S (Graf et al., 2015).

4.5. Bifidobakterie

Jako první popsal charakteristické ypsilonové bakterie roku 1900 pan Tissier ve vzorku ze stolice kojenců. Tyto bakterie pojmenoval jako *Bacillus bifidus*. Od tohoto roku proběhla řada změn v pojmenování a zařazení těchto bakterií až konečně roku 1974 se tyto bakterie dočkaly svého zařazení do samostatného rodu *Bifidobacterium*, který se používá dodnes (Biavati et al., 2000).

K jedněm z prvních bakterií, schopným natrvalo osidlovat trávicí trakt kojenců krmených mateřským mlékem, patří bifidobakterie, kdy tvoří až 91% střevní mikroflóry (Narayanan et al., 2015). U dětí krmených umělou výživou tvoří až 75% střevní mikroflóry (Requena et al., 2002). Vysokému zastoupení bifidobakterií je přisuzován včasný a pozitivní rozvoj imunitního systému dítěte (Rodríguez et al., 2015). U dospělého člověka klesá díky jeho změně životního stylu počet těchto bakterií na zhruba 25% z celkové mikroflóry trávicího traktu (Krejsek et al., 2007). V současné době je známo 48 druhů bifidobakterií (Duranti et al., 2016), nicméně počet nově popsanych druhů stále stoupá.

4.5.1. Zařazení

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

(Sedláček, 2007)

4.5.2. Vlastnosti

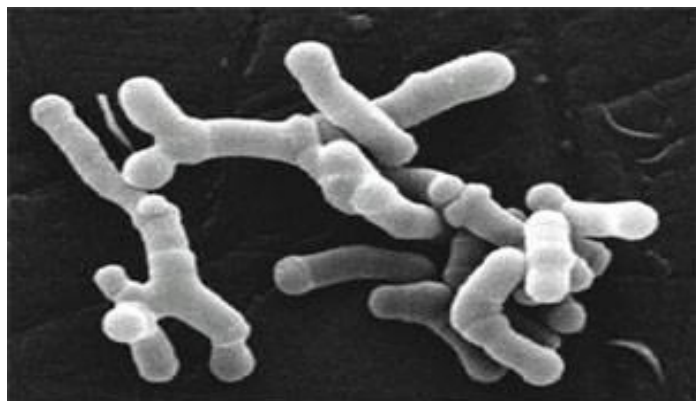
Morfologie rodu *Bifidobacterium* je poměrně proměnlivá. Bakterie lze popsat jako nepravidelné, větvené bakterie ve tvaru paliček či tyčinek o různých délkách (Görner et Valík, 2004). Velikosti tyčinek či paliček se většinou pohybují kolem 0,5-0,8 x 2,0-8,0 µm (Ventura et al., 2004). Rostou jednotlivě, v řetízcích, hvězdicích, palisádách či nepravidelném uspořádání. Obvykle bývají zahnuté či vypouklé. Často se větví či seskupují do tvaru písmene V nebo Y. Tvary bakterií jsou výrazně ovlivněny látkami obsaženými v živném médiu, jako jsou například N-acetylglukosamin, alanin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, serin a Ca²⁺ (Rakická et al., 2015, Ventura et al., 2004). Nemají schopnost pohybu. Kolonie rostoucí na polotuhých médiích jsou hladké, vypouklé, smetanově bílé, lesklé, měkké konzistence s hladkými okraji (Görner et Valík, 2004). Tento rod je nesporulující, anaerobní, kataláza negativní (Narayanan et al., 2015). Charakteristickým enzymem je fruktóza-6-fosfát-fosfoketoláza, kterou dokáží bakterie katalyzovat fermentací hexózu za vzniku acetylfosfátu a erytrózo-4-fosfátu. Tento enzym slouží jako taxonomický test pro identifikaci bifidobakterií, nedokáže ale rozlišit jednotlivé druhy (Vlková et al., 2002).

Dvě molekuly hexózy dokáží přeměnit na 3 moly acetátu a 2 moly laktátu. Jako vedlejší metabolity tvoří kyselinu mravenčí, jantarovou a etanol (Görner et Valík, 2004,

Rakická et al., 2015). CO₂, kyselina máselná ani propionová se netvoří (Ventura et al., 2004). Typický představitel *Bifidobacterium* je na obrázku č. 2

Buněčná stěna má typické vlastnosti pro grampozitivní bakterie. Je složena ze silné peptinoglykanové vrstvy jež obsahuje polysacharidy, kyselinu teichoovou a bílkoviny. Právě tyto aminokyseliny obsažené v bílkovinách jsou druhově odlišné a liší se i mezi jednotlivými kmeny (Biavati et al., 2000).

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



4.5.3. Růst

Rozpětí teplot, za kterých dokáží bifidobakterie růst je poměrně široké. Jako minimální teploty, pod kterými bifidobakterií nerostou, jsou uváděny teploty 25-28 °C. Teplotní maximum, nad kterým bakterie nerostou, jsou teploty 43-45 °C. Růstové optimum se nachází v běžné teplotě savčího těla, ve kterém běžně bifidobakterií rostou. Jde tedy teploty 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 8,5. Některé druhy tolerují přítomnost O₂ za podmínky spolu přítomnosti 10% CO₂ (Rakická et al., 2015).

4.5.4. Výskyt

Zástupce rodu *Bifidobacterium* nalézáme, více či méně, v mnohých úsecích gastrointestinálního systému savců jako je například dutina ústní či tenké a tlusté střevo (Duranti et al., 2016). U kojenců jsou tyto bakterie v trávicím traktu dokonce dominantní (Ventura et al., 2004).

V říši hmyzu můžeme naléznout bakterie rodu *Bifidobacterium* v trávicím traktu hmyzu se sociálním způsobem života, jako jsou například včely medonosné (Ventura et al., 2004). V důsledku sekundární kontaminace se mohou tyto bakterie nalézat i v odpadních vodách a materiálech znečištěných fekáliemi (Görner et Valík, 2004).

4.5.5. Význam bifidobakterií v trávicím traktu člověka

Rod *Bifidobacterium* má v trávicím traktu nezastupitelnou úlohu. V místě osídlení produkuje kyselinu mléčnou, listovou a octovou, syntetizuje vitaminy B₁, B₆, B₁₂, K a některé aminokyseliny. Díky produkci těchto látek mají tyto bakterie imunostimulační účinky. Dále mají bifidobakterie anticholesterolový a antimutagenní účinek (Nevoral, 2005; Zbořil, 2005).

Další důležitou rolí je adherence na povrch sliznice v místě možné adherence patogenů, využívání potenciálních nutrientů patogenů, snižování pH střevního obsahu. Tyto bakterie rovněž slouží jako prevence zácpy, průjmu a dalších střevních onemocnění, zlepšují schopnost tolerovat laktosu a ovlivňují metabolismus bakterií a produkci toxinů (Nevoral 2005, Ward et al., 2005). Mezi další pozitiva bifidobakterií patří fakt, že dokážou omezit růst bakteriálních druhů s vyšší enzymatickou kapacitou k produkci indoxyl sulfátu a para cresylsulfátu, jako jsou například ruminokoky či klostridie (Rossi et al., 2016). V neposlední řadě produkují z fermentovatelných sacharidů laktát a acetát poměru 2:3, které inhibují růst potenciálně patogenních buněk. Laktát produkují bakterie v L+ izomeru a tudíž je snadno metabolizovatelný pro dětský organismus. Acetát, který produkují bakterie ve větším množství, má silnější antagonistický účinek na patogenní mikroorganismy a to především na gramnegativní bakterie (Görner et Valík, 2004; Rakická et al., 2015). Díky těmto vlastnostem se často používají tyto bakterie jako jedna z hlavních složek probiotik či vícedruhových potravinových doplňků. Nejčastěji se používá 7 druhů, a to *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium thermophilum* a *Bifidobacterium breve* (Bunešová et al., 2014; Rakická et al., 2015). Za povšimnutí stojí fakt, že děti s alergiemi mají ve svém trávicím traktu daleko menší počet bifidobakterií a enterokoků v porovnání se zdravými dětmi (Krejsek et al., 2007).

Další možnost příjmu bifidobakterií do trávicího traktu je konzumace kysaných mléčných výrobků, jogurtů či kysané zeleniny. Pro kysání mléčných výrobků se nejčastěji

používá kmen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12® společně s ostatními bakteriemi mléčného kysání (Görner et Valík, 2004).

Společně s potravou se mohou do těla dostávat sacharidy, jako je například arabinoxylanový oligosacharid, který má prokazatelně příznivý růst na bifidobakteriích (Maukonen and Saarcla 2014). Druh *Bifidobacterium adolescentis* dokáže fermentovat z fruktooligosacharidů (FOS) a škrobu butyrát a tím umožňuje růst dalším bakteriím, které jen na FOS a škrobu nedokáží růst. Některé bakterie jako jsou například *Roseburia intestinalis* a *Anaerostipes caccae* jsou schopné růst jen za přítomnosti *B. longum* a zároveň přítomnosti FOS v živném médiu. Tímto bifidobakteriích přispívají k rozmanitosti střevní mikrobioty (Maukonen and Saarcla 2014).

4.5.6. Bifidobakterie izolované z lidských izolátů

Roku 1900 poprvé sledoval a popsal pan Tissier bifidobakterie ve vzorcích stolice kojeneho dítěte (Biavati et al., 2000). Od tohoto roku se začalo objevovat mnoho dalších nových výskytů bifidobakteriích. V dnešní době víme, že díky specifickým substrátovým požadavkům můžeme nalézt druhy bifidobakteriích, které se specializují na život v tlustém střevě kojenců, dospělých osob, různých druhů zvířat či jiných částech gastrointestinálního traktu (Ventura et al., 2004). Přehled bifidobakteriích izolovaných z trávicího traktu člověka se nachází v tabulce číslo 2.

Typickou stravou kojenců je mateřské mléko či umělá mléčná výživa. Tato strava obsahuje širokou škálu oligosacharidů, které podporují růst a aktivitu specifických bakteriálních druhů zejména však bifidobakteriích. U kojenců krmených mateřským mlékem jsou kromě probiotických oligosacharidů mateřského mléka do těla také společně s mlékem dodávány bakterie obsažené v mléce a povrchu bradavky. Mimo jiné patří mezi tyto bakterie také bakterie rodu *Bifidobacterium* zastoupené druhy *B. adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *Bifidobacterium dentium*, *B. longum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Je zřejmé, že tato přijímaná mikrobiota má přímý vliv na mikrobiotu trávicího traktu kojence (Jost et al., 2016).

Různé druhy bifidobakteriích mají různou schopnost využít oligosacharidy obsažené v mateřském mléce. Například *B. adolescentis* nemá téměř žádnou schopnost degradovat oligosacharidy mateřského mléka, proto tuto bakterii nacházíme především ve střevě dospělých osob či dětí krmených tuhou stravou typickou pro dospělé osoby. Na druhou stranu

B. breve, *B. infantis* a *B. longum* mají velmi silnou schopnost utilizovat mateřské oligosacharidy a proto jsou častěji izolované z tlustého střeva kojenců (Jost et al., 2016). Typické bifidobakterie nacházené ve střevě kojených i nekojených dětí jsou druhy *B. breve*, *B. infantis* a *B. longum* (Jost et al., 2016, Grześkowiak et al., 2015).

Za povšimnutí stojí druh *Bifidobacterium kashiwanohense*, který byl poprvé izolován ze stolice zdravého 1,5 letého japonského kojence (Morita et al., 2011). Další izolace tohoto druhu proběhla až roku 2015 ze 3 vzorků anemických keňských kojenců. Tuto izolaci prováděla paní Vazquez-Gutierrez, podle níž tento druh odráží rozdělení druhů mezi evropskými a africkými kojenci (Vazquez et al., 2015). Tento druh je nyní zkoumán kvůli své schopnosti efektivně využívat železo (Hidetoshi et al., 2015).

Mezi typické bifidobakterie izolované ze střeva dospělého člověka patří druhy *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *Bifidobacterium gallicum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, a *B. pseudocatenulatum* (Ventura et al., 2004).

Druh *B. adolescentis* je v poslední době často zkoumán, kvůli své prospěšné schopnosti metabolizovat stravu s vysokým množstvím glykanů. Zejména pak škrobu, amylopektinu, pullulanu, maltotriose a maltodextrinu. Zároveň však jako jeden z mála zástupců nedokáže využívat mucin, N-acetil-D-glukosamin a fruktosu (Duranti et al., 2016).

Roku 2014 byla popsána doposud poslední bifidobakterie izolovaná z trávicího traktu člověka. Konkrétně pak z výkalu dvou týdenního kojence. Jedná se o druh *Bifidobacterium faecale*. Nejvyšší sekvenční podobnost má tento druh s druhem *B. adolescentis* a to 98,4 % (Choi et al., 2014).

Tabulka č. 2: Bifidobakterie izolované z lidských vzorků

Bifidobakterie izolované z lidských izolátů				
Název	Popsal/ Objevil	Místo nálezu	Číslo DSMZ	
<i>Bifidobacterium adolescenti</i>	G. Reuter, 1963	Střevo dospělých	DSM-20083	
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Scardovi and Crociani, 1974	Lidský výkal	DSM-20098	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Tissier 1900/Orla-Jensen 1924	Stolice kojeného dítěte	DSM-20456	
<i>Bifidobacterium breve</i>	Reuter 1963	Střevo kojence	DSM-20213	
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Scardovi and Crociani 1974	Střevo kojence	DSM-16992	
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Scardovi and Crociani 1975	Zubní kaz	DSM-20436	
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Lauer 1990	Střevo dospělých	DSM-20093	
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	Merita et al. 2011	Střevo 1,5 ročního kojence	DSM-21854	
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Reuter 1963/Mattarelli et al. 2008	Střevo kojence	DSM-20088	
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	Reuter 1963	Střevo dospělých	DSM-20219	

<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Scardovi et al. 1979	Stolice kojeného dítěte	DSM-20438	
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Hoyles et al. 2002	Lidská krev	DSM-13734	
<i>Parascardovia denticolens</i>	Crociani et al. 1996/ Jian and Dong 2002	Zubní kaz	DSM-10105	Dříve: <i>Bifidobacterium denticolens</i>
<i>Scardovia inopinata</i>	Crociani et al. 1996/Jian and Dong 2002 emend. Downes et al. 2011	Zubní kaz	DSM-10107	Dříve: <i>Bifidobacterium inopinatum</i>

Převzato a upraveno z: www.dsmz.de

4.6. Metody detekce mikroorganismů v trávicím traktu člověka

V minulosti byla identifikace a taxonomické zařazení založeno hlavně na fenotypových a biologických testech. Mezi tyto testy patřilo například mikroskopická morfologie buněk, fermentace sacharidů a jiných substrátů či elektrolytická pohyblivost enzymů. Tyto metody byly časově a materiálově náročné a přinášely nejasné výsledky. V současné době jsou preferované molekulárně biologické metody. Po jejich zavedení došlo k objasnění mnoha neshod, zpřesnění a zkvalitnění výsledků (Ventura et al., 2004).

V dnešní době patří mezi nejpoužívanější metody identifikace mikrobioty FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), 16S rDNA, 16S rRNA, DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza), metagenomika, PCR (polymerázová řetězová reakce) a MALDI-TOF. Posledními dvěmi metodami se budu v této diplomové práci zabývat podrobněji, jelikož byly použity k detekci vzorků bifidobakterií v praktické části.

Metody se dají rozdělit do dvou skupin v závislosti na potřebě či absenci kultivace bakterií na metody kultivačně závislé a kultivačně nezávislé.

4.6.1. Kultivačně závislé metody identifikace

Mezi základní postupy kultivačně závislých metod patří kultivace a následné získání čisté kultury. Kultivace probíhá za optimálních teplotních, živinových a kyslíkových podmínek, které jsou pro organismy rozdílné. Po získání čisté kultury a její DNA mohou

následovat identifikace pomocí testů založených na fenotypovém projevu bakterie, biochemické testy, testy detekce přítomných enzymů, určení proteinového profilu, profilu masných kyselin, nebo sekvenování 16S rRNA (Pearce et al., 2003).

Mezi hlavní výhody kultivačních metod patří jejich dobrá specifita, laboratorní a finanční nenáročnost. Nevýhoda těchto testů spočívá především v jejich extrémní časové náročnosti, spotřebě materiálu, pracnosti, nižší citlivosti a nekultivovatelnosti určitých druhů bakterií (Reddacliff et al., 2003).

4.6.2. Kultivačně nezávislé metody identifikace

První výzkumy využívající kultivačně nezávislé metody se objevily v 90. letech (Cocolin et al., 2013). Od této doby jejich význam roste v důsledku zjištění, že velká část bakterií je nekultivovatelných (Ellis et al., 2003). Jak již název napovídá, tyto metody nepoužívají k identifikaci čistou kulturu, nýbrž odebrané buňky ze vzorku, čímž odpadá možná ztráta části genetické informace (Cocolin et al., 2013). Mezi nejvýznamnější zástupce těchto metod patří PCR, DGGE, FISH, metagenomika, metaproteomika (Su et al., 2012).

Mezi hlavní výhody patří možnost identifikovat těžko kultivovatelné či nekultivovatelné bakterie a nulový čas potřebný pro kultivaci bakterií. Nevýhoda těchto testů je materiálová a finanční náročnost spojená s vysokou spotřebou chemikálií (Reddacliff et al., 2003).

4.6.3. Metody detekce bifidobakterií v TT člověka

Mezi základní, rychlý a laboratorně nenáročný biochemický test používaný pro identifikaci bifidobakterií na úrovni rodu je stanovení přítomnosti enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy. Tento enzym vzniká při fermentaci hexóz především u bakterií rodu *Bifidobacterium*.

Principem testu nazývaného F6PPK je reakce, při níž z fruktózo-6-fosfátu vzniká acetylfosfát. Vznik acetylfosfátu se detekuje červenofialovým zbarvením chalátů železa (Scardovi, 1982; Vlková et al., 2002).

4.6.4. 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. 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).

4.7. Hmotnostní spektrometrie MALDI–TOF MS

První studie o identifikaci mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie se datuje roku 1975, kdy jí poprvé použil Anhalt a Fenselau pro chemotaxonomii mikroorganismů (Alusta, 2015). Díky tomuto úspěchu začal od roku 1975 probíhat výzkum zacílený na zdokonalení metody. Po 19 letech se roku 1994 zdařila touto metodou úspěšná analýza bakterií z lyzátu buněk (Cain et al., 1994). Největší úspěch však zažila tato metoda roku 1996, kdy byla poprvé použita pro analýzu celé bakteriální buňky (Alusta, 2015).

Roku 2009 publikoval Seng a kolektiv práci pojednávající 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 jsou připisovány nesprávné interpretaci výsledků či chybným záznamům (Seng et al., 2009).

4.7.1. Identifikace bakterií pomocí hmotnostní spektrofotometrie

MALDI-TOF MS

MALDI- TOF MS má v dnešní vědě rozsáhlé možnosti použití (Alusta, 2015). Tím se stala nezbytnou součástí při zkoumání a identifikaci biopolymerů, syntetických polymerů, farmaceutik, nízkomolekulárních organických i anorganických látek, plísní, kvasinek a především bakterií (Holland et al., 1996; Seng et al., 2009; Theel, 2013). Jedna z největších výhod této metody je bezesporu rychlost získání výsledků. Mellmanovi a kol. se podařilo ve svém výzkumu zkrátit čas identifikace mikroorganismů na méně než 10 minut. Mezi další přednosti patří potřeba relativně malého množství vzorku (Alusta, 2015).

Identifikace MALDI-TOF MS lze provádět pomocí dvou přístrojů. Jedná se o MALDI Biotyper od firmy Bruker a SHIMADZU (Shimadzu Corporation). Studie poukazují na fakt, že lepší bakteriální identifikace je dosaženo použitím přístroje Bruker- 94 % správných výsledků, oproti Shimadzu - 88 % správných výsledků ze 720 izolovaných vzorků. (Emonet et al. 2010).

4.7.2. Identifikace bifidobakterií pomocí MALDI-TOF MS

Rychlá a spolehlivá identifikace pomocí metody MALDI-TOF MS, zvláště pak na přístroji Bruker, se ukázal jako vhodná možnost identifikace bakterií trávicího traktu jako je například rod *Bifidobacterium* (Alusta, 2015; Emonet et al., 2010). Tuto možnost zkoumal roku 2015 pan Chaplin et al. ve své práci druhové diverzity bifidobakterií ve střevní mikroflóře studované pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, prováděných na 93 zdravých osobách ve věku od 1 měsíce do 57 let. V této práci uvádí, že 93% vyizolovaných kmenů z fekálních vzorků dokázala MALDI-TOF MS úspěšně identifikovat na úrovni druhu. Dále poukazuje na fakt, že vždy minimálně dva z kmenů každého druhu byly překontrolovány pomocí metody 16S rRNA sekvenováním fragmentu genu. Ve všech případech byly výsledky překontrolovaných vzorků shodné s identifikací MALDI-TOF MS (Chaplin et al., 2015).

Pro tyto přednosti si tuto metodu vybral roku 2016 Khonsari et al. pro srovnávací studii bifidobakterií ve střevě dětí a dospělých osob. Khonsari et al. došel k výsledku, že MALDI-TOF MS dokázala, identifikovala všechny izoláty až na úrovni druhu .

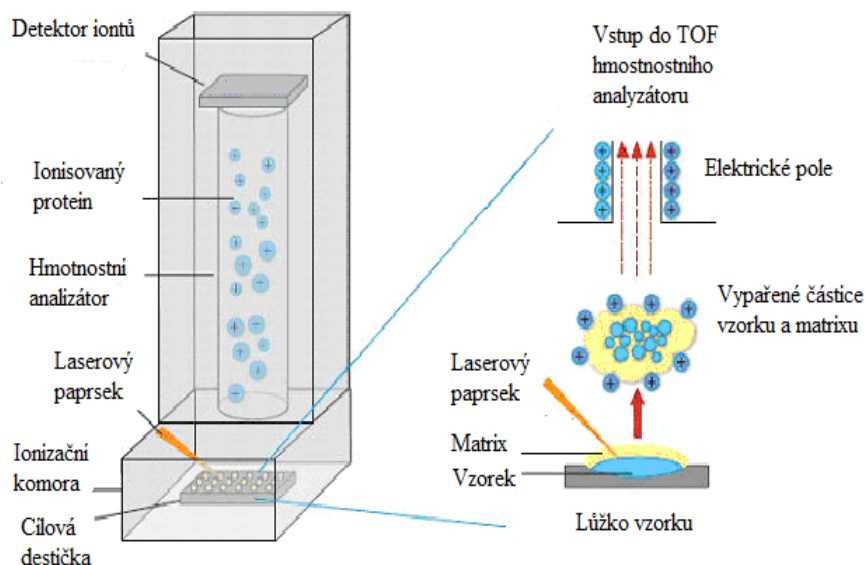
4.7.3. Princip metody

Zkoumaný vzorek se smísí s matricí (kyselina skořicová či benzoová) v poměru 1:10000 a přenesení se na hliníkovou či nerezovou destičku s kruhovými zářezy (Ho et Reddy, 2011). Tato matrice má schopnost dobré absorpce UV záření (Spalding et al. 2016). Destička je následně vysušena při pokojové teplotě a umístěna do analyzátoru, kde je vytvořeno vakuum a tím potřebný podtlak pro vykrytalizování vzorku (Friedecký et Lemr, 2012; Spalding et al. 2016). Z laseru se vyšle puls paprsku zaměřený na jednotlivé terčíky. Toto záření způsobí zahřátí a následnou sublimaci matrice, která přechází do plynné fáze a strhává s sebou molekuly analytu (Kadlčík et al., 2002; Friedecký et Lemr, 2012). Ionizované molekuly následně vstupují do trubice s vakuem. Díky tomuto prostředí se mohou molekuly pohybovat rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Lehčí částice či částice s vyšším nábojem se pohybují rychleji než molekuly s vyšší hmotností či nižším nábojem (Spalding et al. 2016). 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).

Píkový graf je porovnáván 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 provádí v konečné fázi laborant (Seng et al., 2009).

Úspěšnost metody MALDI-TOF MS se pohybuje se okolo 95 % správně určených vzorků na druhové či rodové úrovni. Chyby, které se vyskytují, jsou většinou připsány na vrub nesprávným záznamům v databázi, chybnému rozhodnutí laboranta či nesprávné přípravě vzorků (Seng et al., 2009).

Obrázek číslo 3: Princip metody MALDI-TOF



4.8. Identifikace bakterií pomocí PCR

Roku 1983 pan Kary Mullis vynalezl a uvedl do praxe polymerázovou řetězovou reakci (PCR) spočívající v enzymatické amplifikaci DNA in vitro syntézou v mnoha tepelných fázích. Tento vynález byl natolik významný pro vědeckou práci, že za něj obdržel roku 1993 Nobelovou cenu (Gupta et al. 2016). PCR patří v současné době k často využívaným metodám ve všech odvětví vědy, jako jsou například archeologie, izolace genů či aplikovaný genetický výzkum. S velkým úspěchem se také tato metoda používá při identifikaci mikrobioty v níž umožňuje PCR rychlou a citlivou identifikaci (Bartůňková, 2005; Saddam et al., 2015). Její hlavní výhodou je možnost identifikace pomalu rostoucích, špatně kultivovatelných či nekultivovatelných bakterií. Další velkou výhodou je možnost automatizace všech složek PCR, což umožňuje pracovat i s vysoce patogenními mikroorganismy či virovými částicemi s nulovým ohrožením personálu laboratoře (Saddam et al., 2015). Metodu PCR lze rozdělit na dvě části. První je izolace DNA ze zkoumaného vzorku. Tento krok je velmi významný a na jeho správném provedení závisí mnohdy úspěšnost či neúspěšnost dalších kroků. Druhá část je vlastní PCR a vyhodnocení výsledků.

4.8.1. Metoda PCR

Proces amplifikace spočívá ve střídavém zahřátí a ochlazení vzorku. Teplota a počet cyklů závisí na rodové příslušnosti zkoumaného vzorku. V zásadě lze amplifikaci rozdělit na 3 opakující se cykly a to denaturaci, hybridizaci a elongaci. Dále pak na 2 cykly probíhající v amplifikaci jen jednou, mezi něž patří úvodní denaturace a závěrečná elongace (Šmarda, 2010).

Úvodní denaturace

Úvodní denaturace probíhá za stejných teplot jako denaturace (cca 95 °C) ale na rozdíl od ní probíhá mnohem delší dobu (cca 3-5 minut). Dostatečně dlouhá úvodní denaturace zajistí dokonalé rozpletení mateřské DNA. V ostatních krocích denaturace stačí již krátké doby, protože je ve směsi přítomna již nově vzniklá templátová DNA, která bývá kratší a snáze denaturovatelná (Filippetti et al. 1999, Murri et al. 2013).

Denaturace

Denaturace DNA je prováděna pomocí vysoké teploty, pohybující se okolo 94 °C-96 °C po dobu 0,5 až 1 minuty v závislosti na použitém primeru a druhu bakterie (Bartůňková, 2005, Šmarda 2010). Působením těchto teplot vede k rozpadu vodíkových můstků a tím rozvolnění DNA na dva řetězce ssDNA (Šmarda, 2010). Reakce je založena na schopnosti DNA denaturovat při zvýšené teplotě a opětovné renaturaci po snížení teploty za zachování komplementarity bází (Bartůňková, 2005).

Hybridizace

Další fáze spočívá v ochlazení vzorku na teplotu pohybující se kolem 30 až 65 °C po dobu 30 sekund až 1 minuty. Tato doba se může dle druhu bakterie měnit. Při této teplotě probíhá nasednutí primerů na 3' konce DNA (Bartůňková, 2005). Teplota hybridizace je klíčová pro správné provedení PCR. Při zvolení příliš nízké teploty mohou primery nasedat i na sekvence, které k nim nejsou komplementární či jsou komplementární jen z části, a tím může docházet k tvorbě nespecifických produktů. Při zvolení příliš vysoké teploty se primery málo hybridizují a produkty se nevytvoří v dostatečné množství (Šmarda, 2010). Primery jsou synteticky připravené jednovláknité oligonukleotidy s komplementární sekvencí k sekvenci DNA na 3' konci obou vláken. Jejich délka činí zhruba 20 nukleotidů (Bartůňková, 2005).

Elongace

Poslední opakovaná fáze je syntéza nových řetězců probíhajících při teplotě pohybující se okolo 65-75 °C a době 30 sekund až 1 minuty dle druhu bakterie. Oligonukleotidy přisedlé ve fázi hybridizace slouží nyní jako templát pro polymerázu. V tomto kroku se tvoří dvojnásobné množství produktu oproti výchozímu stavu (Šmarda, 2010). Nejčastěji používaná polymeráza je Taq, která prodlužuje vlákno DNA od 5' konce ke 3' konci při optimální teplotě 72 °C (Bartůňková, 2005). Při této teplotě dokáže k primeru přidat rychlostí 150 bází za sekundu. Při teplotě nad 90 °C, která je potřebná v dalším cyklu k denaturaci, není tento enzym aktivní, ale sám dokáže dostatečně odolávat denaturaci (Šmarda, 2010). Po prvním cyklu se počet řetězců DNA ve směsi zdvojnásobí. Tyto 3 cykly se několikrát opakují. Počet řetězců při opakování cyklu přibývá exponenciálně. Po 30 cyklech se z 1 DNA vytvoří zhruba 10^9 amplikonů (kopie mateřské DNA) (Šmarda, 2010). Velikost amplikonů se pohybuje v desítkách či tisících páru bází (bp) (Bartůňková, 2005).

Závěrečná elongace

Závěrečná elongace zajišťuje plné dosyntetizování produktů. Probíhá při teplotě okolo 72 °C a doba trvání je okolo 4 minut (Guihéneuf et, al. 2015).

Pausa

Při pause se zchlazuje vzorek na teplotu 4 °C. V takto zchlazeném vzorku již neprobíhají žádné reakce (Guihéneuf et, al. 2015).

Vizualizace

Detekce nesyntetizovaného produktu po ukončení cyklů spočívá v jeho obarvení látkou, která dokáže fluoreskovat pod UV zářením. Mezi tyto látky patří například ethidium bromid. Gel Red či SYBR green. Po obarvení DNA se produkt společně s kontrolním vzorkem umístí na agarózový či akrylamidový gel kde dochází k elektroforéze. Gel s molekulami DNA se vloží do UV komory a vizualizují se pomocí UV světla. Pozitivní reakce se projeví světélkujícími proužky v oblasti totožných s oblastmi kontrolních vzorků. Pozitivní reakce vypovídá pouze o přítomnosti testovaného mikroorganismu. Nevypovídá nic o počátečním množství mikroorganismu v testovaném vzorku (Demnerová, 2012).

4.8.2. Identifikace bifidobakterií pomocí PCR

Rod bifidobakterium patří mezi anaerobní bakterie, čímž se řadí mezi nesnadno kultivovatelné (Rakická et al., 2015). Bylo tedy zapotřebí navrhnout kultivačně nezávislou metodu, která by tento druh dokázala identifikovat. Jako vhodný druh kultivačně nezávislé metody vhodné pro bifidobakterie se ukázala metoda PCR (Su et al., 2012).

Pro každý druh či skupinu bifidobakterií je potřeba mít druhově či skupinově specifický primer s příslušnou teplotou, při které daný primer funguje. Přehled primerů a teplot použitých pro tuto práci je uveden v tabulce číslo 4 v kapitole materiál a metody na straně 42.

Metodu identifikace pomocí PCR si zvolil například pan Walker et al., který vydal roku 2015 studii s názvem profilování 16S rRNA genu střevní mikroflóry kojence je silně ovlivněna zpracování vzorku a PCR primer výběru. Tato práce se zabývá porovnání výkalů dvou kojenců se zaměřením na porovnání různých amplifikačních primerů na množství specifických bakteriálních taxonů. Práce poukazuje na fakt, že směsný primer byl schopný identifikovat v průměru o 30% více bifidobakterií než specifický primer. Dále klade důraz na použití vhodných teplot (Walker et al., 2015).

4.9. PCR v reálném čase (RT PCR)- spojená s reverzní transkripcí

S touto variantou PCR se také můžeme setkat pod názvem qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce). Jak již název napovídá RT PCR měří amplifikaci v reálném čase na rozdíl od klasické PCR u níž se výsledky shromažďují po ukončení reakce.

Tato varianta PCR je použitelná pokud je zapotřebí amplifikovat mRNA. Prvním krokem je, stejně jako u klasické PCR, izolace genetické informace v podobě mRNA ze vzorku. Následuje krok, v němž se převede mRNA na cDNA pomocí reverzní transkriptázi. Poté pokračuje běžná PCR (Sriprapun, 2014). RT PCR je metoda podstatně náročnější než klasická PCR založená na amplifikaci DNA. Její obtížnost nespočívá ve složitosti přepisu RNA do cDNA ale v rychlé degradaci vzorku účinkem ribonukleás, které se běžně vyskytují jako kontaminanty vzorků, pomůcek i chemikálií. Ribonukleázy jsou navíc termostabilní a odolné vůči některým denaturačním činidlům (Šmarda, 2010).

4.10. DGGE

Denaturační gradientová gelová elektroforéza patří mezi kultivačně nezávislou metodu (Sherif et al., 2014). Tato skutečnost předurčuje metodu jako vhodnou pro zkoumání střevní mikrobioty, kde je až 60% bakterií velmi těžko kultivovatelných díky svým nárokům na prostředí a živiny, či dokonce nekultivovatelných (Ferrocino et al., 2015).

Metoda je založena na principu rychlosti denaturace vodíkových můstků. DNA se bude lépe oddělovat v místech mezi adeninem a thyminem z důvodu spojení těchto dvou bází pouze dvěmi vodíkovými můstky. Zatím co báze cytosinu a guaninu budou stabilnější z důvodu spojení těchto bází třemi vodíkovými můstky, k jejichž rozpojení je potřeba větší energie.

DNA ze vzorku se vloží na polyakrylamidový gel se zvyšujícím se množstvím denaturačního činidla skládajícího se z močoviny a formaldehydu. Gel se následně vloží do elektrického pole, v němž putuje DNA rychlostí úměrnou její hmotnosti až do chvíle rozpojování bází. Takto rozvolněná DNA se na gelu přestane de facto pohybovat a na gelu se ustálí DNA jako bend. Dle vzdálenosti od startu se usuzuje na složení DNA. Citlivost se blíží 100% (Sherif et al., 2014).

7.6. NGS

Pyrosekvenování patří od roku 2005, kdy byl uveden na trh první komerčně dostupný analyzátor k vyhledávané metodě ke genotypizaci bakterií (Koubková et al., 2014). Mezi další důležité využití patří odlišení patogenních a nepatogenních bakterií v rámci jednoho bakteriálního druhu (Ahmadian et al., 2006).

Proces pyrosekvenování začíná neštěpením DNA na dvouvláknové fragmenty. Na tyto fragmenty se připojí koncově specifické adaptory (A a B adaptory) sloužící v dalších krocích k purifikaci, amplifikaci a vlastní sekvenci. Na B adaptor se naváže biotin, který slouží k imobilizaci fragmentů na streptavidinem pokrytých magnetických kuliček. Dvouvláknové fragmenty jsou denaturovány. Takto vzniklé jednořetězcové fragmenty jsou připraveny k hybridizaci ke speciálním kuličkám DNA s komplementární sekvencí DNA sloužících jako primer pro následnou amplifikaci (Koubková et al., 2014).

Podmínky při hybridizaci jsou navrženy tak aby na jednu DNA kuličku byl navázán pouze jeden DNA fragment. Každá kulička je uzavřena v olejové emulzi s vodou, kde probíhá

nezávislá amplifikace jednoho fragmentu. Po skončení jsou kuličky uvolněny z emulze, přičemž každý nese cca 10 miliónů identických kopií původní DNA. Následuje promytí kuliček, kdy se zachovají pouze kuličky s amplifikovanou DNA. Na zbylé kuličky se přichytí sekvenční primer a směs se nanese do jamek na pikotitrační destičky, které jsou navrženy tak aby do nich zapadla pouze jedna DNA kulička. Tato destička je rozdělena do čtyř vrstev kam se centrifugací nanesou další druhy kuliček a zbytek reakční směsi důležité pro pyrosekvenci (Koubková et al., 2014).

V reakční směsi se nachází mateřská DNA ze vzorku, 4 enzymy (DNA polymeráza, sulfurylázy, luciferázy a apyrázy) a enzymatické substráty (adenosin fosfosulfát, d-luciferin). Nukleotidy se do směsi přidávají postupně jeden po druhém (Ahmadian et al., 2006). Při kompletování komplementárního nukleotidu DNA polymerázou se uvolňuje pyrofosfát, který je převáděn na ATP což za pomoci dalších ve směsi přítomných enzymů emituje viditelné světlo podle něhož je usuzováno na složení a délku DNA (Koubková et al., 2014).

Mezi hlavní výhody patří možnost proskenování velice krátkých úseku o délce pouhých 20 nukleotidů, rychlost a vysoká efektivnost (Ahmadian et al., 2006).

5. Materiál a metody

5.1. Původ a charakterizace vzorků

Roku 2013 bylo osloveno 21 dárců, od kterých byly získány vzorky stolice. Dárci byli rozděleni dle stravovacích návyků do dvou skupin. Jedna skupina čítala 10 osob stravujících se konvenční dietou s obsahem masa a masných produktů, z nichž bylo 9 dospělých osob a jedno dítě ve věku 7 let. Druhá skupina čítala také 10 dárců s lakto-vegetariánskou stravou, z nichž bylo 8 dospělých osob, jedno dítě ve věku 7 let s vegetariánskou stravou a jeden kojeneček ve věku 2 měsíců krmený mateřským mlékem od vegetariánské matky. Druhá skupina zahrnovala také jednoho dárce s veganskou stravou. Doba trvání diety byl u každé osoby hlášen delší než dva roky. 6 měsíců před odběrem vzorku nepožila žádná osoba antibiotika, probiotické či prebiotické doplňky stravy, krom běžných potravin jako jsou například kysané mléčné produkty či kysaná zelenina. Podrobnější informace o dárcích jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Vlastní rozbor stolice dárců a kultivace na selektivních médiích byl proveden studentkou České zemědělské univerzity Evou Mráčkovou. Pro potřeby práce byly použity bakteriální izoláty a informace o kvantitativním zastoupení u skupin bifidobakterií a lactobacilů. Tyto vzorky se zkoumaly pomocí kultivačně závislé metody MALDI-TOF MS. Vzorky byly následně uschovány ve zmraženém stavu pro další zkoumání.

Roku 2015 bylo vybráno z 21 zmražených vzorků 20 vzorků, které byly podrobeny zkoumání pomocí kultivačně nezávislé metody PCR. Vybrané vzorky jsou označeny v tabulce číslo 2 podbarvením.

Tabulka č. 3 : 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 použité pro identifikaci

MALDI-TOF MS

Na selektivním agaru WSPMup podle Bunešová (2012) používaného pro bifidobakterie byl naočkovan rozředěný vzorek. Petriho misky s naočkovaným agarem byly vloženy za anaerobních podmínek na 48 hodin do termostatu nastaveného na 37 °C. Po uplynutí stanovené doby byl patrný nárůst kolonií, ze kterých byla potřeba vyizolovat čisté kultury.

Z jednotlivých kolonií byly vyžíhanou kličkou odebrány vzorky kolonií tak, aby se zamezilo odebrání živného média. Vzorky byly následně z kličky převedeny do bujónu

Wilkins Chalgren (Oxoid) doplněný o sojový pepton (5 g/l), L-cysteine (0,5 g/l) a Tween 80 (1 ml/l). Zkumavky byly vloženy opět do termostatu na 24 hodin při 37 °C.

Z narostlé kultury byl za aseptických podmínek odebrán vzorek, který byl podroben morfolologické kontrole pomocí mikroskopu.

5.3. Identifikace bifidobakterií na úrovni rodu

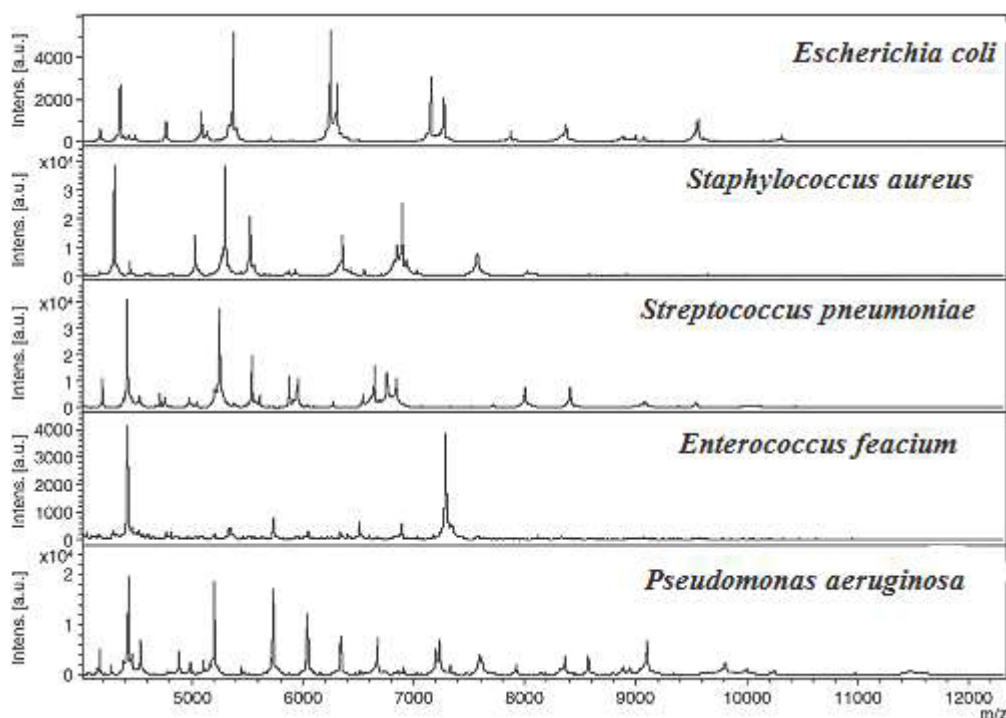
Jedním z běžných biochemických testů používaných pro identifikaci bifidobakterií je prokázání přítomnosti enzymu vznikajícího při fermentaci hexóz fruktózo-6-fosfát fosfoketolázou v buněčném extraktu. Principem testu nazývaného F6PPK je reakce, při níž z fruktózo-6-fosfátu vzniká acetylfosfát. Vznik acetylfosfátu se detekuje červenofialovým zbarvením chalátů železa (Scardovi, 1982). Tímto testem byly získané izoláty (200 vzorků; 10 izolátů z každého dárce) identifikovány jako rod *Bifidobacterium*. Podrobný postup metody je uveden v příloze č. 1.

5.4. Identifikace metodou MALDI-TOF MS

1 ml čerstvě narostlých čistých kmenů z bujónu byl po mikroskopické identifikaci asepticky převeden do uzavíratelné Eppendorff zkumavky o objemu 1,5 ml. Vzorek byl vložen do centrifugy a odstřeďován 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. Vzorky byly dále zpracovány podle protokolu metody založené na inaktivaci ethanolem v kombinaci s extrakcí kyselinou mravenčí a acetonitrilem na VŠCHT. Podrobný postup přípravy vzorku pro vlastní analýzu je uveden v příloze č. 2.

Analýza probíhala na přístroji MALDI-TOF Biflex IV (Bruker), instalovaném v Ústavu biochemie a mikrobiologie na Vysoké škole chemickotechnologické v Praze. Po analýze bylo z každého vzorku vygenerováno hmotnostní spektrum v podobě píkového grafu, které určuje jedinečné proteinové složení neznámého vzorku. Každý vrcholek píku vyjadřuje mikrobiální protein charakteristický pro daný mikroorganismus. Identifikace vzorků byla provedena pomocí počítačového srovnání píkového grafu neznámého vzorku s databází referenčních spekter, již dříve analyzovaných vzorků (MALDI Biotyper). Ukázka píkového grafu je na obrázku č. 5.

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



Výše uvedené analýzy byly provedeny během předchozích experimentů na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky a jsou součástí mé bakalářské práce. Výsledky sloužily i pro publikování vědeckého článku BIFIDOBACTERIA, LACTOBACILLI AND SHORT CHAIN FATTY ACIDS OF VEGETARIANS AND OMNIVORES (Bunešová et al., 2017).

5.5. Izolace bakteriální DNA ze vzorků stolice

Ze vzorku stolice dárce bylo naváženo a kvantitativně převedeno 500 mg vzorku do 2 ml zkumavky Lising Matrix E. K obsahu bylo připipetováno 978 μL SP (Sodium Phosphate) roztoku a 122 μL MT roztoku. Vzniklá směs byla homogenizována v přístroji FastPrep® po dobu 80 sekund při rychlosti 5.0. Homogenizovaná směs byla vložena do centrifugy a centrifugována při 14 000 otáčkách po dobu 10 minut.

Do nové 2 ml mikrocentrifugační zkumavky byl kvantitativně přelit vzniklý supernatant a přidáno 250 μL roztoku PPS (Protein Precipitation Solution). Směs byla promísena 10x otočením dnem vzhůru a stočena v centrifuze nastavené na 14 000 otáček po dobu 10 minut. Poté byl přepipetován supernatant do 15 ml zkumavek, k němuž bylo přidáno 1000 μL Binding Matrix. Znovu byl obsah promísen otáčením zkumavek dnem vzhůru po dobu 2 minut. Následně byl obsah nechán sedimentovat po dobu 10 minut.

Po uplynutí stanovené doby bylo odstraněno 800 μL supernatantu z vrchní části. Usazená peleta byla rozmíchána ve zbylém supernatantu a bylo odebráno 650 μL , které bylo převedeno do zkumavek se SPIN filtrem. Zkumavky byly vloženy do centrifugy a centrifugovány po dobu 1 minuty při 14 000 otáčkách. Supernatant separovaný pod filtrem byl slit do odpadu.

Peleta usazená ve filtru byla rozpuštěná v 500 μL roztoku SWES-M. Zkumavky byly opět stočeny v centrifuze po dobu 1 minuty při 14 000 otáčkách. Seperovaný supernatant pod filtrem byl odstraněn. Pro dokonalé stočení byl vzorek ještě jednou centrifugován při 14 000 otáčkách po dobu 2 minut, a naposledy byl odstraněn supernatant. Zkumavky byly otevřeny a ponechány 5 minut na vzduchu při pokojové teplotě pro odpaření zbylého ethanolu.

Po odpaření byla peleta rozmíchána ve 100 μL destilované vody a opět stočena v centrifuze po dobu 1 minuty při 14 000 otáčkách. SPIN filtr byl odstraněn. V tekutině na dně zkumavky zůstala DNA vhodná pro PCR analýzy.

Takto připravené vzorky můžeme uchovat v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zdroj: příbalová informace <http://www.mgp.cz>

5.6. Rodově a druhově specifická PCR

Pro detekci a druhové zastoupení bifidobakterií v testovaných vzorcích stolice byla použita PCR s použitím rodově specifického a druhově/ poddruhově specifických primerů. K analýze byla použita vyizolovaná totální bakteriální DNA ze stolice dárce.

5.6.1 Příprava PCR reakce

Níže je uvedena reakční směs všech komponent potřebných pro PCR reakci před rozdělením do jednotlivých reakcí. Výpočet množství směsi probíhá součtem jednotlivých komponent a znásobením počtem jednotlivých reakcí plus jedna reakce navíc. Tato směs se připravuje v nadbytku kvůli následujícím ztrátám při použití, jako je například ulpívání na stěnách zařízení. Složení směsi a množství komponent pro jednu reakci je uvedeno v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Komponenty PCR směsi

Komponent	Množství
PCR Mix	12,5 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Sterilní voda	9,5 µl

PCR Mastermix a sterilní PCR voda zůstává u všech reakcí stejná. Mění se pouze druh primeru 1 a 2. Pro každý rod/ druh bakterie se používá jiná dvojice primerů. Jejich přehled je v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Přehled primerů

Název bakterie	Název primru	Složení primru	°C	Bp
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bif 162	GGGTGGTAATGCCGGATG	59	523
	Bif 662	CCACCGTTACACCGGGAA		
<i>B. adolescentis</i> group	BiADO-1	CTCCAGTTGGATGCATGTC	58	279
	BiADO-2	CGAAGGCTTGCTCCCAGT		
<i>B. angulatum</i>	BiANG-1	CAGTCCATCGCATGGTGGT	60	275
	BiANG-2	GAAGGCTTGCTCCCCAAC		
<i>B. bifidum</i>	BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	59	278
	BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCCAAA		
<i>B. breve</i>	BiBRE-1	CCGGATGCTCCATCACAC	57	288
	BiBRE-2	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT		
<i>B. catenulatum</i> <i>B. pseudocatenulatum</i>	BiCATg-1	CGGATGCTCCGACTCCT	59	285
	BiCATg-2	CGAAGGCTTGCTCCCGAT		
<i>B. dentium</i>	BiDEN-1	ATCCCGGGGGTTCGCCT	59	387
	BiDEN-2	GAAGGGCTTGCTCCCGA		
<i>B. gallicum</i>	BGAL-1	TAATACCGGATGTTCCGCTC	59	303
	BGAL-2	ACACAGGACCCGGAAAAAGG		
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	BiLON-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	59	831
	BiLON-2	GGGAAGCCGTATCTCTACGA		

<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	BiINF-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	59	828
	BiINF-2	GGAAACCCCATCTCTGGGAT		
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	LW-1	GCACGGTTTCGGCCGTG	55	567
	LW-2	GGGAAACCGTGTCTCCAC		

Hotová PCR směs se rozpipetuje do jednotlivých uzavíratelných PCR zkumavek. Do každé takto připravené zkumavky připipetujeme 1 µl DNA z každého testovaného vzorku. Pro kontrolu se připravuje i vzorek z referenčního kmenu bakterie, odpovídající bakterii momentálně zkoumané. Přehled referenčních kmenů je uveden v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Přehled referenčních kmenů bifidobakterií

Kmen bifidobakterie	Sbírkové označení
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 20083
<i>B. angulatum</i>	DSM 20098
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 10104
<i>B. bifidum</i>	DSM 20456
<i>B. breve</i>	DSM 20213
<i>B. catenulatum</i>	DSM 16992
<i>B. dentium</i>	DSM 20436
<i>B. gallicum</i>	DSM 20093
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	DSM 20088
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	DSM 20211
<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSM 20438

5.6.2. Reakce PCR

PCR zkumavky s PCR směsí, primery odpovídajícími detekovanému druhu bakterie a DNA ze vzorku (celkový objem směsi 25 µl) byly vloženy do termocykléru Biometra.

Teplotní programy jsou uvedeny v tabulce číslo 7. V tomto přístroji probíhala úvodní denaturace, opakující se cykly (denaturace, hybridizace, elongace), závěrečná elongace a pauza. Cyklus složený z denaturace, hybridizace a elongace se opakoval u rodu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 30 krát. U všech ostatních druhů probíhal proces 35krát.

Tabulka číslo 7: Teplotní programy

Název bakterie	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>		Ostatní rody <i>Bifidobacterium</i>	
	Teplota (°C)	Doba (min)	Teplota (°C)	Doba (min)
Úvodní denaturace	95	5	95	5
Denaturace	95	0:30	95	0:20
Hybridizace	55	1	x	0:20
Elongace	72	4	72	0:30
Závěrečná elongace	72	7	72	10
Pauza	4	-	4	-

Legenda x:

58 °C- *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. kashiwanohense*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*

59 °C- *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *suis*

60°C- *B. angulatum*

64 °C- *B. animalis* subsp. *lactis*

5.7. Vizualizace PCR produktu

Zreagovaný produkt je potřeba separovat, vizualizovat a identifikovat. Pro tuto potřebu byl použit 1% agarózový gel s jamkami pro vnesení vzorku. Agarózový gel byl připraven smísením 1 gramu agarózového prášku (Serva) a 100 ml 0,75x koncentrovaného TAE pufru (Serva). Tato směs byla důkladně promíchána a vložena na 3 minuty do

mikrovlnné trouby nastavené na nejvyšší ohřev. Po uplynutí času byla směs schlazena na 60 °C a připipetováno 5 µl přípravku GelRed (Biotium). Směs byla vlita do nalévací vany do výšky min 8 mm společně s hřebínkem vytvářející jamky. Gel tuhl cca 30 minut. Po uplynutí doby byl vyjmut hřebínek. Gel byl opatrně přesunut do elektroforetické vany s 0,75x koncentrovaným TAE pufrem tak, aby byl zcela ponořen. Do krajní jamky byl nanesen kontrolní vzorek obsahující DNA právě zkoumané bakterie (sbírkový referenční kmen). Do ostatních jamek byly aplikovány testované vzorky v objemu 5 µl. Elektroforetická vana byla zapnuta do elektrického zdroje s konstantním napětím 120 V po dobu 60 minut (elektroforéza Thermo Scientific OWL EASY CAST B2). Vedle vzorků byl aplikován také DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific).

Princip metody spočívá ve využití záporného náboje DNA pocházejících z fosfátových skupin obsažených v DNA. Díky nim je DNA v elektrickém poli přitahován ke kladné elektrodě (anodě).

Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut a umístěn do UV-transluminátoru Bio-Rad. Pod UV zářením se vizualizovaly bendy. Gel byl následně vyfotografován a reakce vyhodnocena.

6. Výsledky

Od roku 2013 do roku 2014 probíhal výzkum, v němž bylo analyzováno 20 vzorků stolice od zdravých lidských dárců (10 vegetariánů, 10 lidí s konvenční dietou) pomocí kultivačně závislé metody MALDI-TOF MS s cílem detekovat druhové zastoupení bifidobakterií a laktobacilů. V roce 2015 byla DNA z těchto 20 ti vzorků stolice podrobena identifikaci pomocí kultivačně nezávislé metody PCR, s použitím druhově specifických primerů pro bifidobakterie, s cílem porovnání druhové diverzity bakterií rodu *Bifidobacterium* u lidí s různou dietou a srovnání identifikace identických vzorků pomocí kultivačně závislých a kultivačně nezávislých metod.

Podrobné informace o dárcích jsou uvedeny v tabulce 3 v kapitole materiály a metody.

6.1. Bifidobakterie detekované pomocí kultivačně závislé metody - MALDI-TOF MS

Pro kultivaci bifidobakterií byl použit selektivní WSPMup agar. Z každého vzorku bylo odebráno 10 kolonií, se snahou vybrat co nejvíce variabilní kolonie, které byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS.

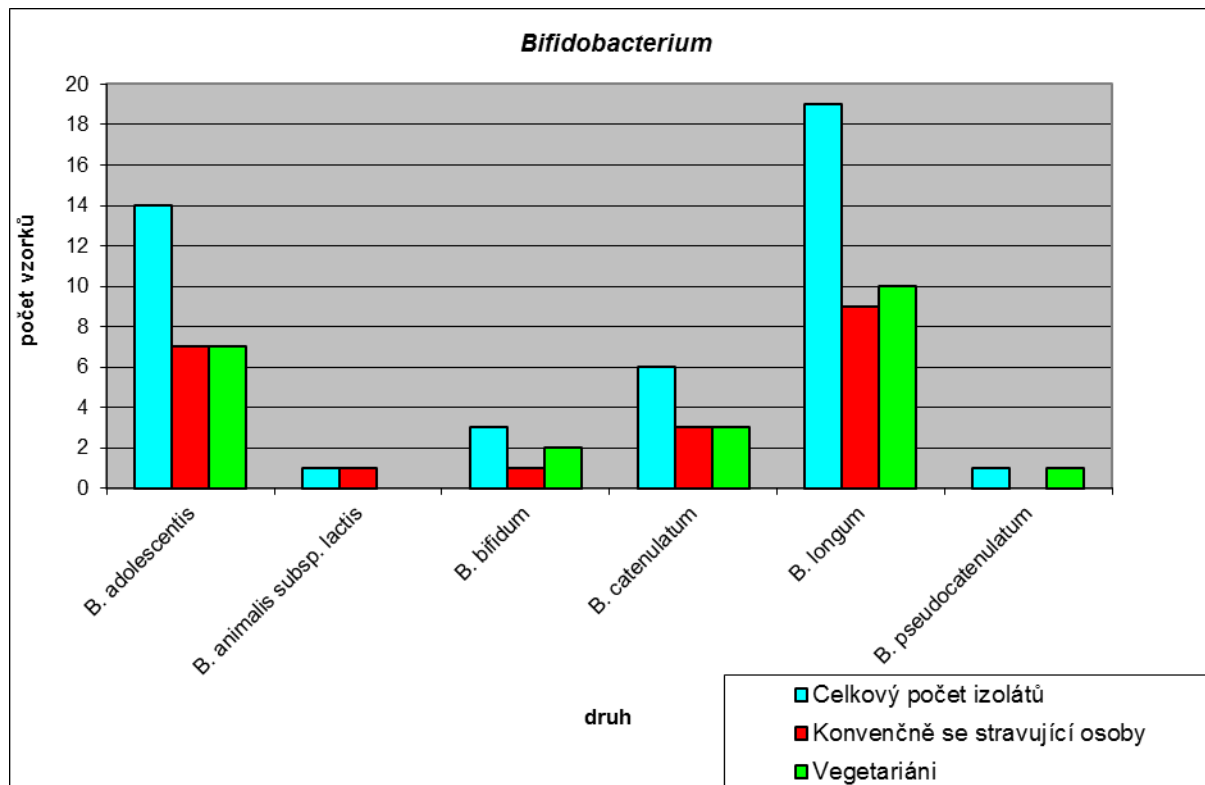
Ve stolici lidí s konvenční dietou (10 dárců) byly na tomto agaru detekovány počty bifidobakterií v množství $9,36 \pm 0,57$ log KTJ/ g stolice na rozdíl od vegetariánů (10 dárců) u kterých byl touto metodou detekován počet $9,91 \pm 0,35$ log KTJ/ g stolice. Tento rozdíl byl shledán statisticky nevýznamný.

Při porovnání bifidobakterií uvedené v grafu číslo 1, vyplývá, že vegetariánská strava neměla podle identifikace MALDI-TOF MS prokazatelně významný vliv na vyšší kvantitativní nebo kvalitativní druhovou diverzitu.

Pomocí kultivačně závislé identifikace byly nejčastěji detekovány druhy *Bifidobacterium adolescentis* a *B. longum* a to jak u vegetariánů, tak u konvenčně se stravujících osob.

Druhy, jako například *B. angulatum*, *B. dentium* či *B. longum* subsp. *infantis* se pomocí této metody nepodařilo identifikovat ani u jedné skupiny.

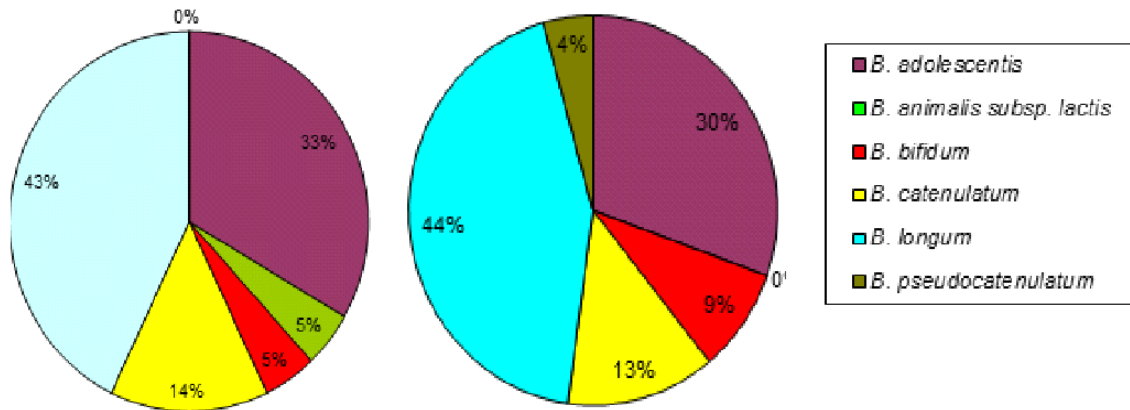
Graf č. 1.: Srovnání druhů bifidobakterií kultivovaných na WSPMup agaru ze vzorků stolic dárců s konvenční a vegetariánskou dietou.



Pro úplnost jsou druhy bifidobakterií vyskytujících se u osob s vegetariánskou a konvenční dietou uvedeny v grafu č. 2.

Graf č. 2.: Druhové zastoupení bifidobakterií u osob s vegetariánskou a konvenční dietou identifikované pomocí MALDI-TOF MS

Druhové zastoupení bifidobakterií u osob s konvenční a vegetariánskou dietou



6.2. Výsledky identifikace pomocí kultivačně nezávislé metody - PCR

Izolovaná totální bakteriální DNA ze stolice dárců byla analyzována metodou PCR s použitím dostupných rodově a druhově specifických primerů. Kdy bylo pomocí rodově specifických primerů Bif 162 a Bif 664 potvrzeno, že vzorky stolice všech dárců jsou pozitivní na přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium*, což se shoduje s výsledky kultivace.

Neshodující se výsledky mezi identifikací MALDI-TOF MS a PCR s druhově specifickými primery jsou v tabulce podbarveny.

Tabulka č. 8.: Srovnání druhů bifidobakterií identifikovaných pomocí MALDI-TOF MS a PCR u vzorků stolic dárců s konvenční a vegetariánskou dietou.

Bifidobakterie identifikované pomocí rodově a druhově specifických primerů

Dárce	MALDI- TOF identifikace z izolátů (n=10) ^a	Bif												
		spp.	BiADOa	BiADOb	BiANG	BiBIF	BiBRE	BiCATg	BiDEN	BiGAL	BiINF	BiLON	LW	
Vegetariánská dieta														
V1	<i>B. adolescentis</i> (5), <i>B. longum</i> (5)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
V2	<i>B. adolescentis</i> (6), <i>B. longum</i> (4)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
V3	<i>B. adolescentis</i> (5), <i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (4)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
V5	<i>B. adolescentis</i> (6), <i>B. longum</i> (4)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
V6	<i>B. longum</i> (10)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
V7	<i>B. adolescentis</i> (5), <i>B. longum</i> (5)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
V8	<i>B. adolescentis</i> (5), <i>B. bifidum</i> (1), <i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (3)	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
V9	<i>B. adolescentis</i> (4), <i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (5)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
V10	<i>B. longum</i> (9), <i>B. pseudocatenulatum</i> (1)	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
V11	<i>B. bifidum</i> (5), <i>B. longum</i> (5)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Konvenční dieta														
M1	<i>B. adolescentis</i> (6), <i>B. longum</i> (4)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
M2	<i>B. adolescentis</i> (4), <i>B. longum</i> (6)	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
M3	<i>B. adolescentis</i> (8), <i>B. bifidum</i> (1), <i>B. longum</i> (1)	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
M4	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (10)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M5	<i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (9)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-

M6	<i>B. adolescentis</i> (1), <i>B. catenulatum</i> (5), <i>B. longum</i> (4)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
M7	<i>B. longum</i> (10)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
M8	<i>B. adolescentis</i> (2), <i>B. longum</i> (8)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
M9	<i>B. adolescentis</i> (7), <i>B. longum</i> (3)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
M10	<i>B. adolescentis</i> (6), <i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (3)	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-

Legenda

M – konvenční dieta, **V**- vegetariánská dieta, **1-11**- číslo izolátu, + - pozitivní test, - - negativní test

Primery

Bif spp. – *Bifidobacterium* spp., **BiADOa**- *B. adolescentis* genotyp A, **BiADOb** –*B. adolescentis* genotyp B, **BiANG** – *B. angulatum*, **BiBIF** – *B. bifidum*, **BiBRE** – *B. breve*, **BiCATg** – *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum*, **BiDEN** – *B. dentium*, **BiGAL** – *B. gallicum*, **BiINF** – *B. longum* subsp. *infantis*, **BiLON** – *B. longum* subsp. *longum*, **LW** – *B. animalis* subsp. *lactis*

Použitá metoda PCR, na rozdíl od metody qPCR, podává pouze kvalitativní informace o vzorku. Srovnání bude tudíž prováděno pouze na kvalitativní úrovni.

Z grafu č. 3 vyplývá, že druhy bifidobakterií identifikované pomocí PCR byly u osob s konvenční a vegetariánskou dietou z 91% totožné. Z tohoto grafu dále vyplývá, že počet identifikací z jednotlivých vzorků je také téměř shodný. Rozdíly jsou pouze u čtyř druhů a to u *B. catenulatum* grup (*B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*), *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. animalis* subsp. *lactis*.

U *B. catenulatum* grup (*B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*) byl u konvenčně se stravujících osob identifikován 5 krát. U osob s vegetariánskou dietou byl identifikován 8 krát. Druh *B. longum* subsp. *infantis* byl u konvenčně stravujících se osob identifikován jednou. U vegetariánsky se stravujících osob nebyl tento druh identifikován. Poddruh *B. longum* subsp. *longum* byl u konvenčně se stravujících osob identifikován 9 krát a u vegetariánsky se stravujících osob 10 krát. *B. animalis* subsp. *lactis* byl u konvenčně se stravujících osob identifikován 2 krát a u vegetariánů byl tento druh identifikován jen jednou.

Tabulka č. 8 ukazuje, že získané výsledky z kultivačně závislé metody MALDI-TOF MS odpovídají z velké části výsledkům získaným z kultivačně nezávislé metody PCR. Nicméně při použití metody PCR byly častěji identifikovány druhy, jako jsou například *B. bifidum* a skupina *B. catenulatum* (*B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*). Ve výsledcích MALDI-TOF MS byl druh *B. bifidum* izolován ze dvou vzorků ze skupiny vegetariánů a jednoho vzorku osoby na konvenční dietě. Výsledky PCR ovšem identifikovali druh *B. bifidum* u osmi vzorků, z nichž

patřily 4 vzorky do skupiny s vegetariánskou dietou a rovněž 4 vzorky do skupiny s konvenční dietou. Podobné výsledky byly zaznamenány také u druhu *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum*. Metoda MALDI-TOF MS identifikovala 7 výskytů těchto dvou vysoce příbuzných druhů. Z toho byly 3 výskyty u osob s konvenční stravou a 4 výskyty u osob s vegetariánskou stravou. Metoda PCR identifikovala 13 výskytů. 5 výskytů u osob s konvenční dietou a 8 výskytů u osob s vegetariánskou dietou.

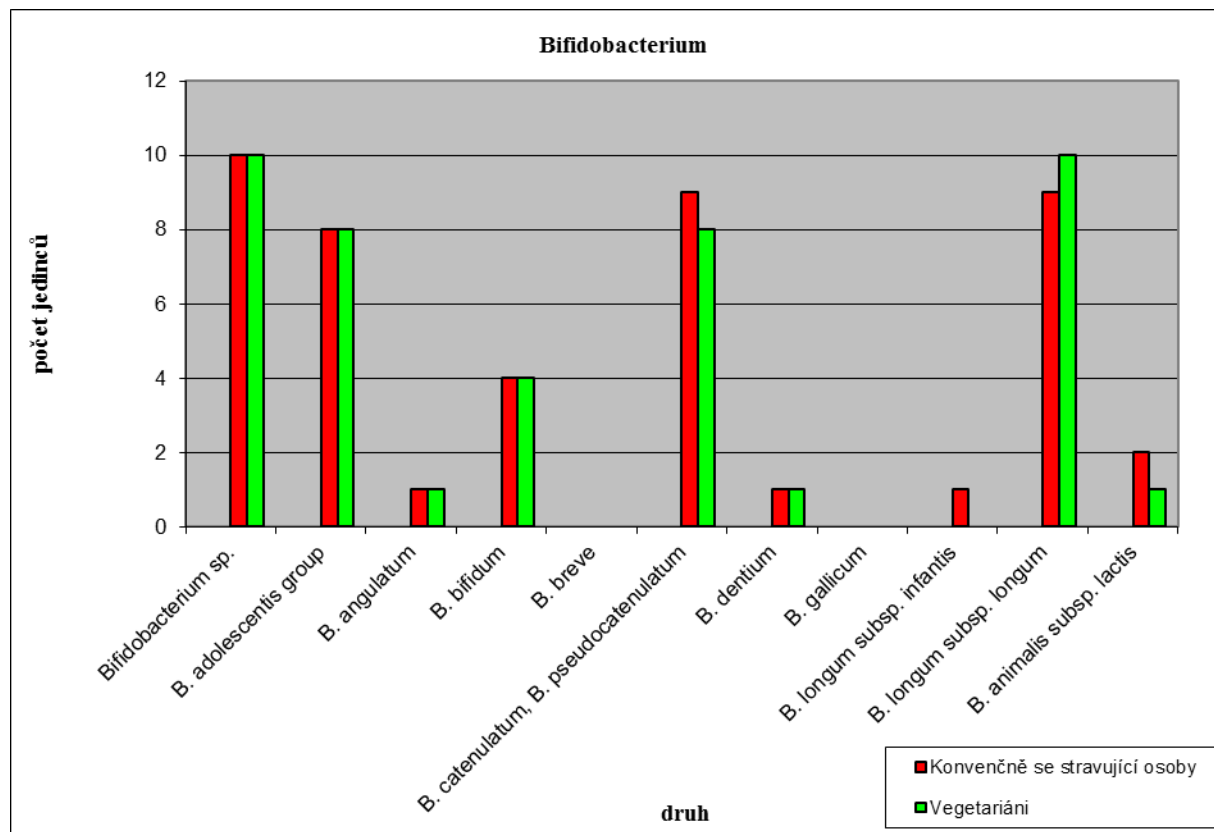
Metoda PCR shodně s metodou MALDI-TOF MS neidentifikovala žádný izolát jako druh *B. breve* a *B. gallicum*. Nicméně, pomocí PCR byly identifikovány druhy *B. angulatum* a *B. dentium*, které nebyly nalezeny při identifikaci získaných izolátů metodou MALDI-TOF MS.

Kmen *B. animalis* subsp. *lactis* byl identifikován pomocí PCR u 2 dárců s konvenční stravou a jednoho dárce s vegetariánskou stravou. Tento druh není považován za typického představitele mikrobioty trávicího traktu člověka. Jedním z možných vysvětlení je konzumace například kysaných mléčných výrobků, které jsou více či méně zastoupeny v obou typech diet.

Izoláty určené pomocí MALDI-TOF MS jako druh *B. longum* byly pomocí specifických primerů PCR zařazeny do poddruhu *B. longum* subsp. *longum*. Nicméně, u dárce M7 na konvenční dietě byla DNA ze stolice dárce pozitivní s primery pro *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis*.

V této studii nebyl zjištěn významný dopad vegetariánské a konvenční stravy na výskyt druhů bifidobakterií. Ve vzorcích obou skupin převažovali běžné druhy bifidobakterií vyskytujících se u dospělých osob, jako jsou *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis* a *B. catenulatum*.

Graf č. 3.: Srovnání druhů bifidobakterií ze vzorků stolic dárců s konvenční a vegetariánskou dietou identifikovaných pomocí metody PCR s použitím rodově a druhově/ poddruhově specifických primerů.



7. Diskuze

Cílem práce bylo porovnat druhové zastoupení bifidobakterií v závislosti na dietě detekované různými metodami. Práce navazuje na výsledky bakalářské práce, která se mimo jiné zabývala detekcí bifidobakterií ve stolici dárců s konvenční a vegetariánskou dietou pomocí kultivace na selektivních médiích s následnou identifikací kolonií metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS. Kdežto v diplomové práci probíhalo stanovení pomocí molekulárně genetických metod s použitím bakteriální DNA vyzolované přímo ze stolice dárce. Analýza probíhala u totožných vzorků jako v bakalářské práci, což umožnilo výsledky získané různými metodami porovnat.

Bifidobakterie jsou významnou komenzální skupinu mikrobioty trávicího traktu, především pak v tenkém a tlustém střevě. Substrátové preference jednotlivých druhů bifidobakterií jsou různé. Můžeme tedy očekávat rozdílné druhové zastoupení u hostitele v závislosti na jeho dietě. Dalším významným faktorem je způsob identifikace. Lze tedy očekávat, že výsledky druhového zastoupení se budou lišit v závislosti na použité metodě.

Názory odborníků na vliv vegetariánské stravy s předpokládaným vyšším množstvím vlákniny na kvantitativní zastoupení mikrobioty ve střevě nejsou jednotné.

U publikovaných studií mikrobioty mezi vegetariány a konvenčně se stravujícími osobami, nejsou většinou jasně definované dietní zastoupení vegetariánské a konvenční diety. Jako nejpodstatnější rozdíl je uváděno, že ve vegetariánské stravě je absence masa a masných výrobků, které je nahrazeno rostlinnou stravou s vyšším obsahem vlákniny (Graf et al., 2015). Množství nestravitelných sacharidů ve stravě může mít zásadní vliv na bakteriální populace a metabolismus mikrobioty střev (Duncan et al. 2006) a proto je očekáváno, že vegetariáni s vyšším množstvím nestravitelných sacharidů budou mít vyšší množství bifidobakterií v trávicím traktu.

Mezi další důležitý fakt, který má podstatný vliv na druhové zastoupení a množství střevní mikrobioty patří délka konzumace zvolené diety. Při srovnání mezi krátkodobou a dlouhodobou konzumací diety jasně vyplývá, že pouze dlouhodobá konzumace má podstatný a dlouhodobý vliv na mikrobiotu trávicího traktu (Ferrocino et al., 2015).

Složení mikrobioty je považováno za stabilní (Jalanka-Tuovinen et al., 2011). Nicméně je známo, že relativní četnost a výskyt určitého druhu může kolísat. Kmeny se dále mohou přizpůsobovat různým sacharidovým strategiím daného jedince (McLaughlin et al., 2015).

V posledních době se shodlo několik studií na faktu, že konzumace různé diety s typickým zastoupením potravin má vliv na množství, složení a aktivitu střevní mikrobioty. Jako hlavní důvod je uváděno rozdílné substrátové složení, aktivita enzymů, vitamínů a v neposlední řadě i kontaminace střevní mikrobioty mikroflórou potravin (Ferrocino et al., 2015).

Výsledky Bunešové et al. (2017) zahrnují výsledky bakalářské práce. Tyto výsledky poukazují na fakt, že nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi počty bifidobakterií mezi konvenčně se stravujícími osobami a vegetariány. Ke stejnému výsledku došli také v roce 2009 Liszt et al. (2009), kteří vydali studii, ve které nenachází žádné významné rozdíly ve složení mikrobioty mezi vegetariány a konvenčně se stravujícími osobami. Nicméně poukazují na vyšší počet *Bacteroides* a snížené množství *Clostridium* klastru u vegetariánsky se stravujících se osob. Je nutno však dodat, že studie byla prováděna na malé skupině vzorku (15 vegetariánů a 14 konvenčně se stravujících osob).

Existují však i práce poukazující jak na vyšší, tak i nižší množství bifidobakterií při porovnání osob s vegetariánskou a konvenční stravou.

Zimmer et al. vydali v roce 2012 rozsáhlou studii v níž zastávají domněnku, poukazující na nižší množství bifidobakterií u osob s vegetariánskou stravou. V této studii se snažili mimo jiné o odlišení fekální mikroflóry vegetariánů a konvenčně se stravujících osob. Došli k výsledku, že vegetariáni měli ve svých vzorcích významně nižší počet bifidobakterií než konvenčně se stravující osoby. K totožnému výsledku došli i roku 2015 Ferrocino et al. (2015), kteří vydávali studii, ve které poukazují na nižší množství *Bacteroides* a *Bifidobacterium* sp. u vegetariánsky se stravujících osob oproti konvenčně se stravujícím osobám. Tento fakt připisují zvýšenému množství vlákniny a nullovému množství živočišných tuků a bílkovin ve stravě.

Také Zbořil et al. (2005), ve své práci poukazují 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. Předpokládají, že dlouhodobí konzumenti vyššího množství vlákniny mají významně odlišné kvantitativní poměry v digestivním mikroekosystému s vyšším podílem bifidobakterií.

V kapitole Bifidobakterie detekované pomocí kultivačně závislé metody - MALDI-TOF MS jsou uvedeny výsledky kvantitativního zastoupení bifidobakterií získaného pomocí

identifikace MALDI-TOF MS. Z výsledků vyplývá, že bifidobakterie byly detekovány u osob s konvenční stravou v počtu $9,36 \pm 0,57$ log KTJ/ g stolice a u osob s vegetariánskou stravou v počtu $9,62 \pm 0,35$ log KTJ/ g stolice. Rozdíl mezi konvenčně se stravujícími osobami a vegetariány činil $0,26$ log KTJ/ g stolice ve prospěch vegetariánů. Tento rozdíl nebyl shledán statisticky významným. K podobnému výsledku došla například i Ruengsomwong et al. (2014). Ta ve své práci z roku 2014 také nenachází žádné významné rozdíly v počtu *Bifidobacterium* sp., čeledi Enterobacteriaceae, *Clostridium* sp., *Eubacterium* sp. a *Lactobacillus* sp. Tato práce byla postavena na 13 vzorcích vegetariánů a konvenčně se stravujících osob pomocí PCR v reálném čase.

Naší prací se nepotvrdila hypotéza Zbořila et al. (2005) o vyšším počtu bifidobakterií u osob s konzumací vyššího množství vlákniny ve stravě. Nepotvrdila se však ani hypotéza Zimmer et al. (2012) a Ferrocino et al. (2015) o významně nižším počtu bifidobakterií u vegetariánsky se stravujících osob. Potvrdila se však hypotéza Liszt et al. (2009) a Ruengsomwong et al. (2014). V této práci, stejně jako poslední dva zmiňovaní autoři, jsme nenalezly významnější rozdíly v počtech bifidobakterií mezi konvenční a vegetariánskou dietou.

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 10 osob s vegetariánskou stravou. I přesto je třeba poukázat, že autoři s vyšším množstvím dárců se ve svých výsledcích rozcházejí.

Ve střevě člověka má rod *Bifidobacterium* nezastupitelnou úlohu. Ve zdravém kojeneckém střevě jsou zastoupeny bifidobakterie v největším množství. Při dospívání organismu jejich množství klesá a ustaluje se stabilní druhové zastoupení. Další významný pokles je zaznamenán u starých osob (Arboleya et al., 2016).

V dospělosti se množství bifidobakterií pohybuje kolem 2-14 % z celé střevní mikrobioty. Zastoupení trvale osídlené mikrobioty je však stabilní (Arboleya et al., 2016). 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*.

Druh *B. gallicum*, který Ventura et al. (2004) uvádí jako běžně se vyskytující druh mikrobioty dospělého člověka, se i přes použití specifických primerů nepodařilo Gaviny et al. (2001) identifikovat.

Díky specifické preferenci jednotlivých bakterií ke složení substrátu jsme předpokládaly u vegetariánů s potenciálně vyšším množstvím vlákniny ve stravě také vyšší druhovou diverzitu. Tabulka číslo 8 ovšem poukazuje na to, že kvalitativní rozdíly mezi vegetariány a konvenčně se stravujícími osobami nejsou tak významné.

V našem případě byly ze vzorků stolic izolované druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. pseudocatenulatum*. Až na druhy *B. animalis* subsp. *lactis* a *B. dentium* se jedná o druhy běžně přítomné v trávicím traktu dospělých jedinců.

Druh *B. animalis* subsp. *lactis* není považován za běžný druh přítomný ve střevní mikrobiotě (Veiga et al., 2014). Může se však jednat o přechodný druh vnesený pomocí konzumace kysaných mléčných výrobků, které obsahují obě diety. Stejně tak *B. dentium* se nepovažuje za běžnou mikrobiotu dospělého člověka.

B. dentium byl poprvé izolován a popsán pány Scardovem a Crocianem roku 1975 z lidského zubního kazu (Scardovi et al., 1996). Jedná se o druh výhradně lidského původu (Nebra et al., 2003). Tento druh je přizpůsoben k výskytu v dutině ústní, kde metabolizuje širokou škálu sacharidů. V plaku zubů nemá pozitivní funkci a je považován za karioeního patogena (Ventura et al. 2009). Do střeva se mohl dostat pomocí setření plaku ze zubů s částmi potravy. Turroni et al., (2009) poukazují na identifikaci *B. dentium* ve střevě člověka, dodává však, že tento druh není dominantní složkou střevní mikrobioty.

Pomocí kultivačně nezávislé metody PCR byly identifikovány druhy *B. angulatum* a *B. dentium*, které nebyly nalezeny při identifikaci získaných izolátů metodou MALDI-TOF MS. To mohlo být zapříčiněno nižším kvantitativním zastoupením tohoto druhu ve vzorku stolice, volbou nevhodného média, kultivačními podmínkami či výběrem kolonií (omezené množství izolátů a subjektivní výběr). Případně kombinací těchto podmínek. Metody kultivačně nezávislé vyhodnotil jako vhodnější pro analýzu mikrobioty trávicího traktu i Petricevic et al. (2012), který ve střevní mikrobiotě našel více druhů pomocí nezávislých kultivačních metod ve srovnání

s kultivací na selektivních médiích. Tento výsledek lze také vysvětlit obtížnější kultivovatelností anaerobní mikrobioty střeva.

Metoda PCR shodně s metodou MALDI-TOF MS neidentifikovala žádný izolát jako druh *B. breve*. K odlišnému závěru došla Hybernová et al. (2014), kdy ve svém rozsáhlém výzkumu jak u vegetariánů tak u konvenčně se stravujících osob druh *B. breve* identifikovala. Shodně s Hybernovou et al. i Turroni et al., (2009) našli tento druh ve střevní mikrobiotě člověka.

Tento druh byl poprvé izolován ze střeva kojence panem Reuterem roku 1963 (Sgorbati et al, 1995). Používá se jako probiotikum do potravinových doplňků a funkčních potravin. Je mu připisován pozitivní vliv na zdraví hostitele v podobě zvýšení bifidobakterií ve střevě, zvýšení celkového množství těkavých mastných kyselin v gastrointestinálním prostředí, snížení močové mutagenity, aktivaci imunitního systému, protiinfekční aktivita, a působení jako protizánětlivý doplněk onemocnění střev (Fujimoto et al., 2010).

Dalším druhem, jenž nebyl izolován ani metodou MALDI-TOF MS ani metodou PCR je druh *B. gallicum*. Ke stejnému výsledku se přiklání také Tannock (2002), který uvádí, že ze 48 vzorků poskytnutých dospělými osobami a 28 vzorků poskytnutých od dětí, nebyl identifikován ani jeden izolát s přítomností *B. gallicum*. Na druhé straně, Venema and Maathuis (2006) uvádějí, že *B. gallicum* je druh vyskytující se v trávicím traktu dospělého člověka. Dodávají však, že zde nejsou zastoupeny v dominantním množství.

Zajímavé je také srovnání druhového zastoupení bifidobakterií u vegetariánské rodiny. U matky byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS a PCR druhy *Bifidobacterium adolescentis* a *B. longum*, u kojence, který byl identifikován jen pomocí MALDI-TOF MS byly izolovány druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum*. Z výsledků vyplývá, že kojeneček má ve svém trávicím traktu totožné druhy bifidobakterií jako matka. U otce této rodiny byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS a PCR druhy *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum* a *B. longum*. U sedmileté dívky náležící k této rodině byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS a PCR druhy *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. longum*. Z výsledků vyplývá, že bakterie jsou ve velké většině shodné u všech členů rodiny. Tento fakt může být zapříčiněn podobnou skladbou konzumovaného jídla.

V této studii jsme nezjistili významný dopad vegetariánské a konvenční stravy na výskyt druhů bifidobakterií. Ve vzorcích stolice u obou skupin byly dominantní druhy *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis* a *B. catenulatum*, což odpovídá dříve publikovaným pracím zabývající se mikrobiotou (Matsuki et al., 2004 a Mullie et al., 2003) u dospělé populace.

Jak kultivačně závislou tak kultivačně nezávislou metodou jsme detekovali převážně běžně se vyskytující druhy mikrobioty trávicího traktu dospělého člověka. Nepodařilo se nám detekovat žádný nový druh. Tento výsledek se dal očekávat, neboť v posledních 5ti letech byly u člověka nalezeny pouze 2 nové druhy a to *B. kashiwanohense*, který byl izolován ze stolice zdravého japonského kojence (Morita et al., 2015) a *B. faecale* izolovaný z výkalů zdravého 2 týdenního kojence. Druh *B. faecale* má nejvyšší sekvenční podobnost s *B. adolescentis* (98,4%) s nímž byl také při prvotní identifikaci zaměňován (Choi et al., 2014).

8. Závěr

Domnívali jsme se, že díky substrátové preferenci jednotlivých druhů bifidobakterií můžeme očekávat rozdílné druhové zastoupení u hostitele v závislosti na konzumované dietě. Dále jsme se domnívali, že významným faktorem ovlivňujícím druhové složení identifikované mikrobioty je způsob identifikace. Očekávali jsme tedy, že výsledky druhového zastoupení bifidobakterií se budou lišit jak v závislosti na konzumaci vegetariánské či konvenční diety, tak na způsobu použité metody kultivace.

Po zpracování výsledků druhového zastoupení jsme zjistili, že kvalitativní zastoupení bakterií mezi jednotlivými dietami je z 91% totožné.

Při porovnání identifikovaných druhů pomocí kultivačně nezávislé metody odpovídá identifikace z velké části výsledkům získaným z kultivačně závislé metody. Nicméně při použití metody PCR byly častěji identifikovány druhy, jako jsou například *B. bifidum* a skupina *B. catenulatum* grup (*B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*). Dále byly detekované druhy jako *B. angulatum* a *B. dentium*, které se nepodařilo kultivačně stanovit. Metoda kultivačně nezávislá byla tedy shledána jako více citlivá, na druhou stranu závislá na spektru použitých druhově specifických primerů.

Také je třeba brát v úvahu, že výsledky této práce vycházejí z použití vzorků od 20ti dárců. Konkrétně na 10 dárcích stravujících se konvenční dietou a 10 dárců stravujících se vegetariánskou dietou, což mohlo mít značný vliv na výsledek. Výhodou však je, že analýza vzorku stolice proběhla s využitím kultivačně závislých i nezávislých metod u týchž vzorků. Díky takto zvolenému postupu jsme mohli ověřit správnost první identifikace a zároveň porovnat kultivačně závislé a nezávislé metody při určení týchž vzorků.

9. Příloha

Příloha číslo 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. Supernatant 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).

Příloha číslo 2: 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 i několik týdnů až měsíců. Vzorky byly poté dále zpracovány podle protokolu metody založené na inaktivaci ethanolem v kombinaci s extrakcí kyselinou mravenčí a acetonitrilem 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 Bifipufir s glycerolem a zamrazena. 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 µl 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 µl do nové uzavíratelné zkumavky a vzorek uschován v mrazáku při -20 °C.

10. Použitá literatura

Ahmadian, A., EHN, M., Hober, S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2006. 11. [cit. 2016-07-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16165119>>.

Alusta, P., Buzatu, D., Williams, A., Cooper, W. M., Tarasenko, O., Dorey, C., Hall, R., Parker, W. R., Wilkes, J. G. Instrumental improvements and sample preparations that enable reproducible, reliable acquisition of mass spectra from whole bacterial cells. *Rapid communications in Mass Spectrometry* [online]. November 2015. 29.21. [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.7299/full>>.

Anonim. V. Adopting Healthful Lifestyle Habits to Lower LDL Cholesterol and Reduce CHD Risk. *American Heart Association* [online]. December 2002. 106. [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <<http://circ.ahajournals.org/content/106/25/3253.full>>.

Arboleya, S., Watkins, C., Stanton, C., Ross, R. P. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Frontiers Microbiology* [online]. August 2016. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990546/>>.

Bartůňková, J. 2005. *Vyšetřovací metody v imunologii*, 1 vydání. 152 s. Grada Publishing. Praha. ISBN: 8024706911.

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

Biavati, B., Vescovo, M., Torriari, S., Bottazzi, V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Mikrobiology* [online]. 2000. 50. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.583.7996&rep=rep1&type=pdf>> .

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 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701214003650>>.

Bunešová, V., Joch, M., Musilová, Š., Rada, V. BIFIDOBACTERIA, LACTOBACILLI, AND SHORT CHAIN FATTY ACIDS OF VEGETARIANS AND OMNIVORES. *Scientia agriculturae bohemica* . 2017. 48. [cit. 2017-03-24].

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 Spektrometry* [online]. Prosinec 1994. 8 (12). [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.1290081224/abstract>>.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. October 2013. 167.1 [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513002316>>.

Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C., Scardovi, V. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., Two New Species Isolated from Human Dental Caries. *Microbiology society* [online]. April 1996. [cit. 2017-01-21]. Dostupné z <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-46-2-564>>.

Demnerová, K. MIKROBIOLOGICKÁ BEZPEČNOST POTRAVIN: SOUČASNÉ STRATEGIE PRO EFEKTIVNÍ KONTROLU. *Chemické listy* [online]. 2012. 106. [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_920-925.pdf>.

Derrien, M., Vlieg, J. E. T. v H. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology* [online]. June 2015. 23.6. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z <[http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(15\)00056-6](http://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(15)00056-6)>.

Duncan, S.H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A. M., Flint, H. J., Lobley, G. E. Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. December 2006. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://aem.asm.org/content/73/4/1073.short>>.

Ellis, R. J., Morgan, P., Weightman, A. J., Fry, J. Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. *Appl. Environ. Microbiol* [online]. June 2003. 69.6 [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <<http://aem.asm.org/content/69/6/3223.short>>.

Emonet, S., Shah, H. N., Cherkaoui, A., Schrenzel, J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clinical microbiology and infections* [online]. November 2010. 16. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2010.03368.x/full>>.

Ferrocino, I., Cagno, D. R., Angelis, D. M., Turrone, S., Vannini, L., Bancalari, E., Rantsiou, K., Cardinali, G., Neviani, E., Cocolin, L. Fecal Microbiota in Healthy Subjects Following Omnivore, Vegetarian and Vegan Diets: Culturable Populations and rRNA DGGE Profiling. *PLOS* [online]. June 2015. [cit. 2016-07-25]. Dostupné z <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128669#abstract0>>.

Filippetti, I., Silvestroni, O., Thomas, M. R., Intriери, C. Diversity assessment of seedlings from self-pollinated Sangiovese grapevines by ampelography and microsatellite DNA analysis. *Journal of Grapevine Research* [online]. 1999. [cit. 2016-07-28]. Dostupné z <<http://pub.jki.bund.de/index.php/VITIS/article/view/4729>>.

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>>.

Fujimoto, J., Tanigawa, K., Kudo, Y., Makino, H., Watanabe, K. Identification and quantification of viable *Bifidobacterium breve* strain Yakult in human faeces by using strain-specific primers

and propidium monoazide. American Society for microbiology [online]. October 2010. [cit. 2017-01-18]. Dostupné z <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2010.04873.x/full>>.

Gaviny, F., Cayuela, Ch., Antoine, J. M., Lecoq, Ch., Lefebvre, B., Membré, J. M., Neut, Ch. Differences in the Distribution of Bifidobacterial and Enterobacterial Species in Human Faecal Microflora of Three Different (Children, Adults, Elderly) Age Groups. Microbial Ecology in Health and Disease [online]. 2001. [cit. 2017-01-15]. Dostupné z <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/089106001750071690?needAccess=true>>.

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

Graf, D., Di Cagno, R., Fák, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., Watzl, B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. Microbial Ecology in Health and Disease [online]. Februar 2015 [cit. 2016-05-25]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318938/>>.

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

Grześkowiak, Ł., Teixeira, T. F. S., Bigonh, S., M., Lobo, G., Salminen, S., Ferreira, C. L. D. L. F. Gut *Bifidobacterium* microbiota in one-month-old Brazilian newborns. Anaerobe [online]. October 2015. 35. [cit. 2016-07-25]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996415300408>>.

Guihéneuf, F., Mimouni, V., Tremblin, G., Ulmann, L. Light Intensity Regulates LC-PUFA Incorporation into Lipids of *Pavlova lutheri* and the Final Desaturase and Elongase Activities Involved in Their Biosynthesis. Journal of agricultural and food chemistry [online]. January 2015. 63. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf504863u>>.

Gupta, S., Gupta, A., Wasim, S., Kotwal, A., Bhat, N. K. A STUDY OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN CEREBROSPINAL FLUID FOR DIAGNOSIS OF TUBERCULOUS MENINGITIS. National Journal of Community Medicine [online]. March 2016. 7.5. [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <http://www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=226712>>.

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 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21557290> >.

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 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8759332>>.

Holscher, H. D., Caporaso, J. G., Hooda, S., Brulc, J. M., Fahey, G. C., Swanson, K. S. Fiber supplementation influences phylogenetic structure and functional capacity of the human intestinal microbiome: follow-up of a randomized controlled trial. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. Januar 2015.101. 1 [cit. 2016-09-3]. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25527750>>.

Hybernová, E., Birošová, L., Naftová, K., Štofírová, 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&usg=AFQjCNHX7iuVIUHx0mesvDSAuoB2UWC6JQ&bv m=bv.87611401,d.bGQ>>.

Chaplin, A. V., Brzhozovskii, T. V., Kafarskaia, L. I., Volodin, N. N., Shkoporov, A. N., Ilina, E. N., Efimov, B. A. Species Diversity of Bifidobacteria in the Intestinal Microbiota Studied Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. Europe PubMed Central [online]. 2015. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://europepmc.org/abstract/med/26710526>>.

Choi, J. H., Lee, K. M., Lee, M. K., Cha, Ch. J., Kim, G. B. *Bifidobacterium faecale* sp. nov., isolated from human faeces. International Journal of Systematic and evolutionary mikrobiology [online]. September 2014. [cit. 2017-01-15]. Dostupné z <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.063479-0>>.

Jalanka-Tuovinen, J., Salonen, A., Nikkila, J., Immonen, O., Kekkonen, R., Lahti, L., Pavla, A., Vos, W. M. Intestinal microbiota in healthy adults: Temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. Plos one [online]. July 2011. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023035>>.

Jost, T., Lacroix, Ch., Braegger, Ch., Chassard, Ch. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. Nutrition Reviews [online]. 2016. 73. [cit. 2016-07-25]. Dostupné z <<http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/content/nutritionreviews/73/7/426.full.pdf>>.

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://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=14471612>>.

Kalač, P. 2008. Soudobý pohled na vlákninu potravy. Výživa a potraviny. 63 (6). 160-162.

Khonsari, S., Suganthy, M., Burczynska, B., Dang, V., Choudhury, M., Pachenari, A. A comparative study of bifidobacteria in human babies and adults. Bioscience of Microbiota Food and Health infections [online]. December 2016. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200263>>.

Koubková, L., Vojtěšek, B., Vyzula, R. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. ResearchGate [online]. 2014. [cit. 2016-07-25]. Dostupné z <<http://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/hledani-clanku/skupina/a/zobrazit/ids/4483/>>.

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/artkey/ped-200703-0007.php>>.

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://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a1621/abstract;jsessionid=0A84CCCA42C8C4847F7FD5E22A1EDEAB.f01t04?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+unavailable+on+Saturday+25th+March+from+07%3A00+GMT+%2F+03%3A00+EDT+%2F+15%3A00+SGT+for+4+hours+for+essential+maintenance.+Apologies+for+the+inconvenience.&userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>>>.

Liszt, K., Zwielehner, J., Handschur, M., Hippie, B., Thales, R., Haslberger, A. G. Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. *Annals of Nutrition Metabolism* [online]. 2009. 54. 4 [cit. 2016-05-26]. Dostupné z <<http://www.karger.com/Article/Abstract/229505>>.

Mai, V., Draganov, P.V. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World Journal of Gastroenterol* [online]. Januar 2009. 15 (1). [cit. 2014-09-10]. Dostupné z <<http://europepmc.org/abstract/med/19115471>>.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of

Human Intestinal Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. January 2004. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://aem.asm.org/content/70/1/167.short>>.

Maukonen, J., Saarela, M. Human gut microbiota: does diet matter? *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. August 2014. [cit. 2016-05-26]. Dostupné z <http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FPNS%2FPNS74_01%2FS0029665114000688a.pdf&code=9f57ee9006d72f2e9a01ec5fab104dcd>.

McLaughlin, H. P., Motherway, M. O., Lakshminarayanan, B., Stanton, C., Ross, R. P., Brulc, J., Menon, R., O'Toole, P. W., Sinderen, D. Carbohydrate catabolic diversity of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. *International Journal of Food Microbiology* [online]. June 2015. 203. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515001361>>.

Mehta, N., Ahlawat, S. S., Sharma, D. P., Dabuj, R. S. Novel trends in development of dietary fiber rich meat products—a critical review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. February 2015. 52. 2 [cit. 2016-09-3]. Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1007/s13197-013-1010-2>>.

Mills, D. A., Lebrilla, C. B., German, J. B., Sela, D. Bifidobacterial gene sequences and their use US 8999705 B2. *The Regents Of The University Of California* [online]. April 2015. 30. 3. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z <<https://www.google.com/patents/US8999705>>.

Morita, H., Nakano, A., Onoda, H., Toh, H., Oshima, K., Takami, H., Murakami, M., Fukuda, S., Takizawa, T., Kuwahara, T., Ohno, H., Tanabe, S., Hattori, M. *Bifidobacterium kashiwanohense* sp. nov., isolated from healthy infant faeces. *Microbiology society* [online]. November 2011. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.024521-0>>.

Morita, H., Toh, H., Nakano, A., Oshima, K., Takagi, M., Suda, W., Tanabe, S., Hattori, M. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium kashiwanohense* JCM 15439^T, Isolated from

Feces from a Healthy Japanese Infant. Genome Announcements [online]. April 2015. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400426/>>.

Mullie, C., Odou, M. F., Singer, E., Romond, M. B., Izard, D. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. FEMS Microbiology Letters [online]. May 2003. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://femsle.oxfordjournals.org/content/222/1/129.abstract>>.

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

Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, J. M., Tinahones, F. J., Cardona, F., Soriguer, F., Queipo-Ortuño, M. I. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. BMC Microbiology [online]. February 2013. [cit. 2016-07-28]. Dostupné z <<http://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-11-46>>.

Narayanan, R., Subramonian, B. S., Vadivoo, V.S. Molecular identification of bifidobacteria from infant faeces. African Journal of Microbiology Research [online]. January 2015. 9. 1. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z <<http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text/4F417D450013>>.

Nebra, Y., Bonjoch, X., Blanch, A. R. Use of Bifidobacterium dentium as an Indicator of the Origin of Fecal Water Pollution. American Society for mikrobiologie [online]. May 2003. [cit. 2017-01-18]. Dostupné z <<http://aem.asm.org/content/69/5/2651.short>>.

Nardone, G., Compare, D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? United European Gastroenterology Journal [online]. January 2015 [cit. 2016-05-25]. Dostupné z <<http://ueg.sagepub.com/content/early/2015/01/06/2050640614566846.full>>.

Nevoral, J. PREBIOTIKA, PROBIOTIKA A SYNBIOTIKA. *Pediatric 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. *Pediatric pro praxi* [online]. Březen 2012. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <<http://www.pediatricpropraxi.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/>>

Pagliari, D., Piccirillo, C. A., Larbi, A., Cianci, R. The Interactions between Innate Immunity and Microbiota in Gastrointestinal Diseases. *Journal of Immunology Research* [online]. 2015. 3 [cit. 2016-05-25]. Dostupné z <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/898297>>.

Papaiouannou, W., Gizani, S., Haffajee, A. D., Quirynen, M., Mamai-Homata, E., Papagiannoulis, L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiology and Immunology* [online]. June 2009. 24. 3 [cit. 2016-05-25]. Dostupné z <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-302X.2008.00493.x/abstract;jsessionid=F6806F15789BEA9F89EE9C09547FE445.f03t02?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>>>.

Pearce, D.A., Gast, C.J., Lawley, B., Ellis-Evans J.C. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. July 2003. 3 [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <<https://femsec.oxfordjournals.org/content/45/1/59>>.

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>>.

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&url=http%3A%2F%2Fvyzivadeti.cz%2Fwp-content%2Fuploads%2F2013%2F05%2Fresource-41.doc&ei=qDTbVPuFPIOEPfa7gLAM&usg=AFQjCNGJkt8vyTgu5rsqh3BK09NDfW62GQ&bv m=bv.85761416,d.ZWU>>.

Radosz-Komoniewska, H., Bek, T., Jóźwiak, 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/full>>.

Reddacliff, L.A., Vadali A., Whittington R.J. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolated from tissues and faeces. Veterinary Microbiologi [online]. September 2003. 95. [cit. 2016-07-10]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12935753>>.

Rakická, M., Marko, A., Šturdík, E., Danihelová, M., Mošovská, S., Juríková, L. Vplyv fermentácie baktériami mliečneho kysnutia na chemickú kompozíciu potravín. Chemické Listy [online]. 2015. 109. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_05_371-376.pdf>.

Rodríguez, E., Peirotén, Á., Landete, J. M., Medina, M., Arqués, J. L. Gut Catalase-Positive Bacteria Cross-Protect Adjacent Bifidobacteria from Oxidative Stress. Microbes and Environments [online]. September 2015. 30. 3. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567566/>>.

Rossi, M., Johnson, D.W., Morrison, M., Pascoe, E.M., Coombes, J.S., Forbes, J.M., Szeto, C.C., McWhinney, B.C., Ungerer, J.P., Campbell, K.L. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. Februar 2016. [cit. 2016-07-25]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772193>>.

Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M. A., Tanaka, R., Watanabe, K., Tannock, G. W. Identification, Detection, and Enumeration of Human *Bifidobacterium* Species by PCR Targeting the Transaldolase Gene. *Appl. Environ. Microbiol* [online]. May 2002. 68.5. [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <<http://aem.asm.org/content/68/5/2420.full>>.

Ruengsomwong, S., Korenori, Y., Sakamoto, N., Wannissorn, B., Nakayama, J., Nitisinprasert, S. Senior Thai Fecal Microbiota Comparison Between Vegetarians and Non-Vegetarians Using PCR-DGGE and Real-Time PCR. *Journal Microbiology and Biotechnology* [online]. April 2014. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <http://www.jmb.or.kr/submission/Journal/024/JMB024-08-02_FDOC_1.pdf>.

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.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-32-3-358>>.

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

Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M., Raoult, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PubMed* [online]. August 2009. [cit. 2014-09-09]. Dostupné z <<http://cid.oxfordjournals.org/content/49/4/543.full.pdf>>.

Sgorbati, B., Biavati, B., Palenzona, D. The genus Bifidobacterium. The Genera of Lactic Acid Bacteria [online]. 1995. [cit. 2017-01-21]. Dostupné z <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5817-0_8>.

Sherif, S.A., Yogi Goswami, E.K., Stefanakos, L., Steinfeld, A. 2014. Handbook of Hydrogen Energy. CRC Press. Boca Raton. 1058 s. Dostupné také z <https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=jGkLBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA249&dq=dgge+denaturation+rate+depends+on+the+number+of+hydrogen&ots=DFGd6wk5Ax&sig=RnqgZNLnUJJziTNAOYMd9BwKLG8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>.

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://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574209000386>>.

Spalding, K., Board, R., Dawson, T., Jenkinson, M. D., Baker, M. A review of novel analytical diagnostics for liquid biopsies: spectroscopic and spectrometric serum profiling of primary and secondary brain tumors. Brain and Behavior [online]. September 2016. [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/brb3.502/full>>.

Sriprapun, M. Principle of PCR and applications [online]. Division of Clinical Microbiology. 2014. [cit. 2016-07-25]. Dostupné z <<http://www.slideshare.net/MetheeSri/principle-of-pcr>>.

Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K. Q., Yang, J. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. February 2012. 93.3 [cit. 2016-06-15]. Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3800-7>>.

Šmarda, J. 2010. Metody molekulární biologie. 1. vydání., 2 dotisk. Masarykova univerzita. Brno. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.

Švestka, T. MIKROFLÓRA TRÁVICÍHO TRAKTU A PROBIOTIKA. *Pediatric pro Praxi* [online]. Srpen 2007. [cit. 2015-02-03]. Dostupné z <<http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2007/04/06.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-tract-456346>>.

Toh, M. C., Allen-Vercoe, E. The human gut microbiota with reference to autism spectrum disorder: considering the whole as more than a sum of its parts. *Microbial Ecology in Health and Disease* [online]. Januar 2015. 26 [cit. 2016-05-25]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310852>>.

Toh, H., Hayashi, J. I., Oshima, K., Nakano, A., Takayama, Y., Takanashi, K., Morita, H., Hattori, M. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium dentium* Strain JCM 1195^T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announcement* [online]. April 2015. 3. 2. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392159/>>.

Turrone, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A., Merusi, P., Cagnasso, P., Bizzarri, B., Angelis, G. L., Shanahan, F., Sinderen, D., Ventura, M. Exploring the Diversity of the Bifidobacterial Population in the Human Intestinal Tract. *American Society for mikrobiology*

[online]. March 2009. [cit. 2017-01-18]. Dostupné z <<http://aem.asm.org/content/75/6/1534.full>>.

Vazquez-Gutierrez, P., Lacroix, Ch., Jaeggi, T., Zeder, Ch., Zimmerman, M. B., Chassard, Ch. Bifidobacteria strains isolated from stools of iron deficient infants can efficiently sequester iron. BMC Microbiology [online]. January 2015. [cit. 2016-07-25]. Dostupné z <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-014-0334-z>>.

Veiga, P., Pons, N., Agrawal, A., Oozeer, R., Guyonnet, D., Brazeilles, R., Faurie, J. M., Vlieg, V. H. J. E. T., Houghton, L. A., Whorwell, P. J., Ehrlich, S. D., Kennedy, S. P. Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. Scientific reports [online]. June 2014. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://www.nature.com/articles/srep06328>>.

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

Venema, K., Maathuis, A. J. H. A PCR-based method for identification of bifidobacteria from the human alimentary tract at the species level. FEMS Microbiol Lett [online]. January 2006. [cit. 2017-01-21]. Dostupné z <<https://academic.oup.com/femsle/article/224/1/143/500327/A-PCR-based-method-for-identification-of>>.

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>>.

Ventura, M., Turrioni, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F., Canchaya, C., Claesson, M. J., He, F., Mantzourani, M., Mulas, L., Ferrarini, A., Gao, B., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Gupta, R. S., Zhang, Z., Beighton, D., Fitzgerald, G. F., O'Toole, P. W., Sinderen, D. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 Genome Sequence Reflects

Its Genetic Adaptation to the Human Oral Cavity. PLOS [online]. December 2009. [cit. 2017-01-18]. Dostupné z <<http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000785>>.

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://agriculturejournals.cz/publicFiles/50910.pdf>>.

Walker, A. W., Martin, J. C., Scott, P., Parkhill, J., Flint, H. J., Scott, K. P. 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice. Microbiome [online]. June 2015. [cit. 2016-08-23]. Dostupné z <<http://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-015-0087-4>>.

Ward, P., Roy, D. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. Lait [online]. Januar 2005. 85. [cit. 2016-07-10]. Dostupné z <<http://lait.dairy-journal.org/articles/lait/abs/2005/01/L05S103/L05S103.html> >.

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.nature.com/ejcn/journal/v66/n1/abs/ejcn2011141a.html>>.

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*. Genome 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/>>.