

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Identifikace, charakterizace a význam druhu *Bifidobacterium longum*

Bakalářská práce

Autor práce: Šárka Vidunová

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

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Identifikace, charakterizace a význam druhu *Bifidobacterium longum*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

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

Identifikace, charakterizace a význam druhu *Bifidobacterium longum*

Souhrn:

Střevní mikroflóra se skládá z rozsáhlého systému mikroorganismů. Ve své bakalářské práci se zabývám druhem bakterií *Bifidobacterium longum*, který se hojně vyskytuje v trávicím traktu lidí i zvířat. *B. longum* se taxonomicky dělí na poddruhy *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* a *Bifidobacterium longum* subsp. *suillum*.

Pro tuto práci byly použity izoláty *B. longum* ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky a typové kmeny ze sbírek mikroorganismů, které byly z velké části identifikovány na druhovou úroveň pomocí hmotnostní spektrofotometrie (MALDI-TOF MS). Některé z nich byly identifikovány dokonce na poddruhovou úroveň pomocí sekvenace 16S rRNA a dalších genů.

Cílem této práce byla poddruhová identifikace 58 izolátů druhu *Bifidobacterium longum* pomocí polymerázové řetězové reakce s využitím dvou sad poddruhově specifických primerů pro identifikaci poddruhů *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* a nalezení společných znaků a charakteristik pro jednotlivé poddruhy pomocí biochemických testů. Zaměřila jsem se na využívání substrátů jako zdroj energie v souvislosti s hostitelským prostředím, ze kterého byly izolovány, a to zejména na ureázu.

Z výsledků PCR byla zjištěna úzká genetická příbuznost mezi jednotlivými poddruhy a také se prokázala nespecifičnost primerů, jelikož s nimi pozitivně reagovaly i další testované poddruhy.

Ze zjištěných údajů testu ANAERO 23 vyplývá, že poddruhová identifikace na základě sacharidové preference je obtížná a nelze podle ní jednotlivé poddruhy rozlišit. Ureázová aktivita, podle níž by měly být rozlišitelné poddruhy *B. longum* subsp. *suis* a *B. longum* subsp. *suillum* nebyla plně prokázána. Tato aktivita spíše odráží původ kmenů a dietu hostitele.

Klíčová slova: *Bifidobacterium longum*, identifikace, substrátová preference, polymerázová řetězová reakce (PCR)

Identification, characterization and significance of the species *Bifidobacterium longum*

Summary:

The intestinal microflora consists of an extensive system of microorganisms. In my bachelor thesis I deal with species *Bifidobacterium longum*, which is abundant in the digestive tract of humans and animals. *B. longum* are taxonomically classified into subspecies *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* and *Bifidobacterium longum* subsp. *suillum*.

For this study were used isolates of *B. longum* from the collection of the Department microbiology, nutrition and dietetics and type strains from collections of microorganisms that have been largely identified to species level using mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Some even subspecies level by sequencing 16S rRNA and others genes.

The aim of this study was the identification of 58 isolates of the species *Bifidobacterium longum* by polymerase chain reaction by using two sets of subtype specific primers for the identification of the subspecies *B. longum* subsp. *longum* and *B. longum* subsp. *infantis* and find common feature and characteristics for each subspecies by biochemical tests. I focused on the use of substrates as an energy source in connection with the host environment from which they were isolated, especially urease.

The results of PCR show us close genetic relation among subspecies and also demonstrate the non-specificity of used primers, because with them also other tested subspecies responded positively.

Result of ANAERO 23 test says, that subspecies identification, which is based on carbohydrate preference, is difficult and can not distinguish by subspecies. Urease activity, by which should be the subspecies of *B. longum* subsp. *suis* and *B. longum* subsp. *suillum* distinguishable, has not been fully demonstrated. This activity rather reflects species of origin and also diet of the host.

Keywords: *Bifidobacterium longum*, identification, substrate preference, polymerase chain reaction (PCR)

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární rešerše.....	2
2.1 Rod Bifidobacterium.....	2
2.1.1 Historie.....	2
2.1.2 Morfologie	2
2.1.3 Fyziologie	3
2.1.4 Taxonomie	5
2.1.5 Výskyt.....	10
2.1.6 Význam.....	11
2.1.7 <i>Bifidobacterium longum</i>	13
2.1.7.1 Genom.....	13
2.1.7.2 Poddruhy	13
2.1.7.2.1 Sacharidová preference	14
2.1.7.2.2 <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	14
2.1.7.2.3 <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	14
2.1.7.2.4 <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i> a subsp. <i>suillum</i>	14
2.2 Metody identifikace a charakterizace bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i>.....	15
2.2.1 Kultivace.....	15
2.2.2 Fenotypové metody.....	15
2.2.2.1 Hmotnosti spektrofotometrie MALDI TOF MS	16
2.2.3 Genotypové metody	16
2.2.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	17
2.2.3.2 Multiplex PCR	19
2.2.3.3 Sekvenování specifických genů	20
2.2.3.4 Restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA (ARDRA).....	20
2.2.3.5 Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE).....	20
2.2.3.6 REP-PCR.....	20
3. Hypotéza	21
4. Cíl praktické části	21
5. Metodická část.....	22
5.1 Použité mikroorganismy.....	22
5.2 Příprava kultur.....	22
5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
5.3.1 Izolace DNA	23
5.3.2 Příprava PCR směsi	24
5.3.3 PCR proces	24

5.3.4	Agarózová gelová elektroforéza	25
5.3.5	Vyhodnocení	25
5.4	ANAEROTest 23	26
5.4.1	Příprava inokula	27
5.4.2	Test	28
5.4.3	Vyhodnocení	28
6.	Výsledky	29
6.1	PCR identifikace	29
6.2	ANAEROTEST 23	33
7.	Diskuze	36
8.	Závěr	39
9.	Seznam použité literatury	40
10.	Přílohy	44

1. Úvod

Trávicí trakt představuje hustě osídlené životní prostředí pro mikrobiální organismy, které ovlivňují zdraví hostitele. Kolonizace organismy začíná již při narození, kdy se organismy pocházející od matky či z okolního prostředí, dostanou do těla novorozence. Jeden z nejvýznamnějších, pozitivně působících rodů je rod *Bifidobacterium*. Tyto bakterie patří mezi jedny z nejčastěji aplikovaných probiotických mikroorganismů, a jsou součástí probiotických doplňků stravy, které jsou přidávány do fermentovaných potravin, jako je například jogurt. Bifidobakterie ovlivňují náš imunitní systém, napadení potenciálními patogeny, prevenci proti mnohým onemocněním a tvorbu některých důležitých látek jako jsou například vitamíny. Pro bakterie v trávicím traktu jsou důležitá prebiotika. Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které působí ve střevě a stimulují tak růst mikroorganismů. Bifidobakterie jsou schopny ve střevě rozložit nestravitelné komplexní sacharidy a oligosacharidy na monosacharidy, které jsou dále metabolizovány v tzv. fruktózo-6-fosfátové dráze za tvorby kyseliny mléčné a kyseliny octové. Tyto kyseliny příznivě ovlivňují kyselost ve střevě, zvyšují prokrvení střevní sliznice a zlepšují jeho hybnost.

2. Literární rešerše

2.1 Rod *Bifidobacterium*

2.1.1 Historie

Bifidobakterie byly poprvé objeveny ve stolici kojence v roce 1899 Henrym Tissierem v Pasteurově institutu (Russel a kol., 2011). Tyto anaerobní, gram-pozitivní bakterie byly ve tvaru Y a Tissier je pojmenoval *Bacillus bifidus*. Od roku 1900 do roku 1957 se název těchto bakterií různě měnil. V roce 1917 Winslow navrhl zařadit tyto bakterie do čeledi *Lactobacillaceae* a v roce 1920 byly bakterie pojmenovány Hollandem *Lactobacillus bifidus* (Biavati a kol., 2000). O několik let později požadoval Orla-Jensen o uznání samostatného rodu *Bifidobacterium*, ale vzhledem k podobnosti s laktobacily byly tyto bakterie po většinu dvacátého století klasifikovány jako členové rodů *Bacil*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* a *Corynebacterium* (Russel a kol., 2011). Roku 1963 Reuter rozpoznal a pojmenoval sedm druhů *Bifidobacterium* mimo již známého *Bifidobacterium bifidum*. O pár let později Scardovi díky aplikaci DNA hybridizace přispěli k uznání 24 druhů a později bylo popsáno dalších 8 druhů. Rod *Bifidobacterium* měl tedy již 32 druhů (Biavati a kol., 2000).

V roce 2014 patřilo do rodu *Bifidobacterium* 48 druhů a poddruhů a objevy nových druhů stále pokračují (Bunešová a kol., 2014). V současnosti je podle informací z oficiálních sbírek popsáno více jak 60 druhů a poddruhů.

2.1.2 Morfologie

Bifidobakterie se mohou vyskytovat jednotlivě, v řetězcích nebo shlucích. Tyto bakterie netvoří spory (Felis a Dellaglio, 2007).

Buněčná stěna bifidobakterií je gram-pozitivní. Skládá se z peptidoglykanového obalu, který je složen z polysacharidů, proteinů a teichoových kyselin. Složení aminokyselin v tetrapeptidech se mezi jednotlivými druhy liší, a tak díky tomu mohou být lépe rozpoznány. Obvykle je peptid složen z aminokyselin jako L-alanin, kyseliny D-glutamové, L-ornithinu nebo lysinu a D-alaninu. Základními polysacharidy v buněčné stěně těchto bakterií jsou glukóza, galaktóza a často také rhamnóza.

Teichoové kyseliny ve spojení s polysacharidovým řetězcem jsou zodpovědné za přilnutí bakterií k povrchu střeva. Lipoteichoové kyseliny také určují hydrofobní charakter bifidobakterií (Biavati a kol., 2000).

2.1.3 Fyziologie

Zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou anaerobní organizmy. Některé druhy však dokáží v přítomnosti oxidu uhličitého kyslík tolerovat. Teplotní minimum pro růst těchto bakterií je 25-28 °C, naopak teplotní maximum se pohybuje v rozmezí 43-45 °C (Scardovi, 1986). Nicméně optimální teplota pro růst lidských bifidobakterií je v rozmezí mezi 36 až 38 °C, zatímco pro bifidobakterie pro něž je hostitel zvíře, je optimální teplota pro růst vyšší, většinou kolem 41 až 43 °C. Jsou však i výjimky, u kterých může jejich růstové optimum být až 49,5 °C jako je to např. u *Bifidobacterium thermacidophilum* (Dong a kol., 2000). Optimální pH pro růst těchto bakterií je v rozmezí 6,5 až 7,0. Hraničními pH, při kterých růst ustává je 4,5 až 5,0 a nižší a naopak 8,0 až 8,5 a vyšší (Scardovi, 1986). Avšak některé kmeny, např. *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* vykazují růst i při pH 3-5. Tato vlastnost je důležitá pro přežití ve vyšších částech trávicí soustavy (Bunešová a kol., 2014).

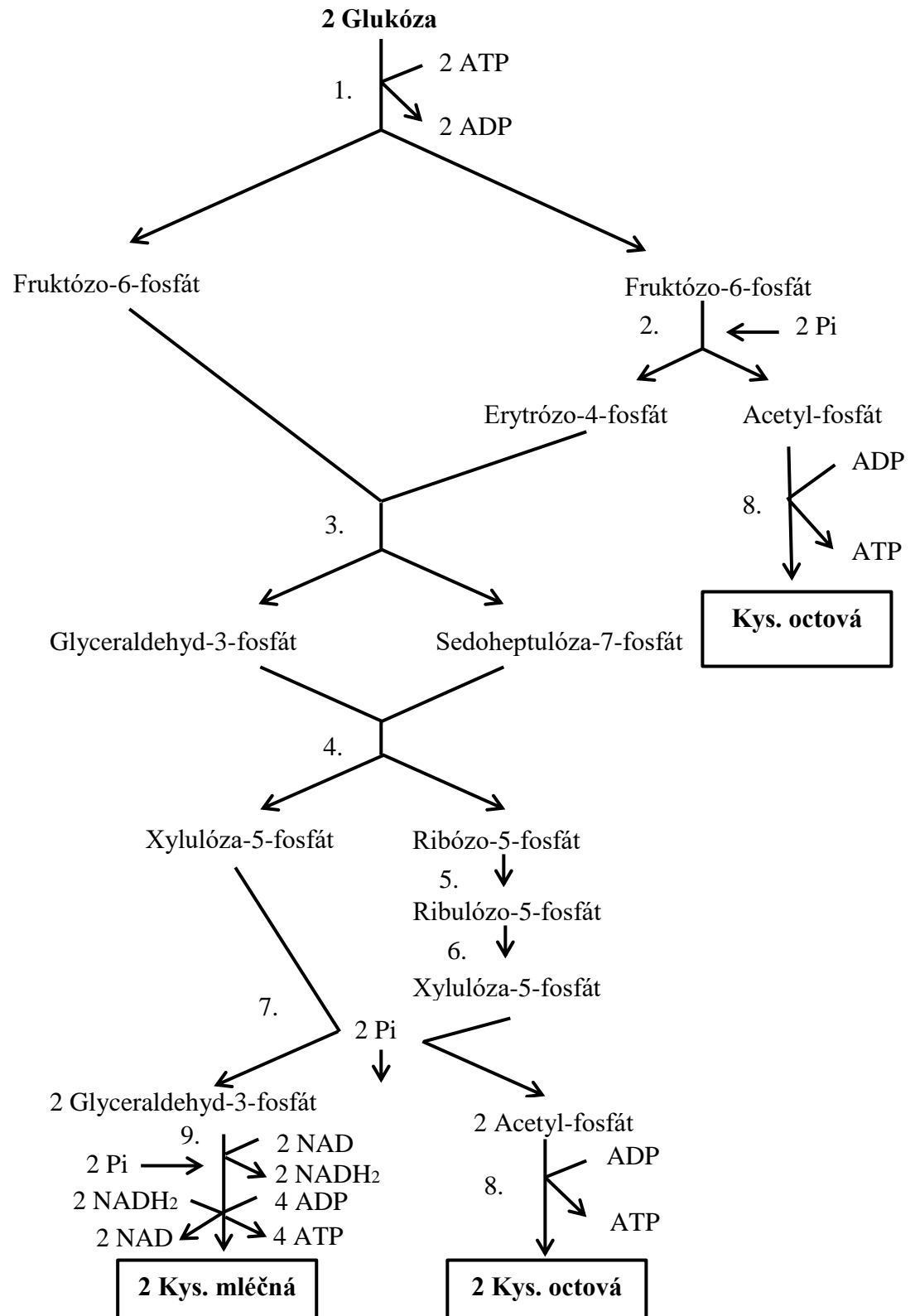
Test na katalázu je negativní, až na druhy *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides*, které byly původně izolovány z trávicího traktu včel. Tyto dva druhy vykazují katalázu pozitivní, dokáží tedy růst v přítomnosti kyslíku.

Bifidobakterie rozkládají hexózu charakteristickou metabolickou cestou označovanou jako fruktózo-6-fosfátová dráha neboli tzv. „bifid shunt“. Hlavní enzym je fruktóza-6-fosfoketoláza, která štěpí fruktózu-6-fosfát na acetylfosfát a erytrózu-4-fosfát. Přítomnost enzymu fruktóza-6-fosfoketolázy je považováno za důležitý taxonomický znak pro zařazení organismů do čeledi *Bifidobacteriaceae* (Felis a Dellaglio, 2007). Hlavními konečnými produkty fermentace jsou kyselina mléčná a kyselina octová, které se tvoří v molárním poměru 3:2 (Ventura a kol., 2004). Některé bifidobakterie mohou vytvářet organické kyseliny a etanol, který má vliv na jejich růst. Kyselina máselná, propionová a oxid uhličitý (výjimka degradace glukonátu) se v této metabolické cestě nevytváří.

Bifidobakterie využívají jako zdroj energie sacharidy. Jsou schopny fermentovat glukózu, galaktózu a fruktózu. Avšak bylo objeveno i několik druhů, které glukózu fermentovat nedokáží. Některé druhy dokáží jako zdroj energie využívat laktózu, např. *Bifidobacterium crudilactis*, *Bifidobacterium mongoliense* a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* vyskytující se v mléku a mléčných produktech. Mnoho zvířecích druhů bifidobakterií a lidské *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum* a *Bifidobacterium dentium* dokáží využívat škrob. Bifidobakterie dokáží využít mnoho dalších sacharidů např. xylo-

oligosacharidy, fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, isomalto-oligosacharidy (Bunešová a kol., 2014), rafinózu, manitol a sorbitol (Scardovi, 1986).

Obrázek č. 1 – Schématický diagram fermentace glukózy u zástupců rodu *Bifidobacterium* (upraveno podle Gomes a Malcata, 1990)



Vysvětlivky:

1. hexokináza a fruktózo-6-fosfát izomeráza, 2. fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza, 3. transaldoláza, 4. transketoláza, 5. ribózo-5-fosfát izomeráza, 6. ribulózo-5-fosfát-3-epimeráza, 7. xylulózo-5-fosfoketoláza, 8. acetát kináza, 9. enzymy homofermentativní dráhy

2.1.4 Taxonomie

Taxonomické řazení:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Actinobacteria*

Třída: *Actinobacteria*

Řád: *Bifidobacteriales*

Čeleď: *Bifidobacteriaceae*

Rod: *Bifidobacterium*

První metody identifikace a taxonomického řazení bakterií byly založeny na pozorování fenotypu a biochemických znaků, jako je morfologie buněk, kvašení sacharidů nebo elektrolytická pohyblivost enzymů. Avšak tyto metody často vedly k nepřesným a nejednoznačným výsledkům.

V současné době je bakteriální klasifikace založena na molekulárně biologických testech, díky kterým po jejich zavedení proběhly velké změny v tehdejší taxonomii bakterií. Přesná identifikace bakteriálních druhů je realizována díky rRNA genové sekvenci, obzvláště genové sekvence 16S rRNA. Všechny druhy, které patří do rodu *Bifidobacterium*, tvoří jednotku se stejným vývojem, vykazující více než 93% shodnost u 16S rDNA sekvence nalezené u členů v rámci tohoto rodu.

Bifidobakterie, jakožto grampozitivní bakterie s vysokým obsahem G+C, jsou ve fylogenetickém stromě bakterií řazeny ještě s dalšími rody, jako jsou *Streptomyces*, *Actinomyces* a *Propionibacterium*. Při použití 16S rRNA indexu podobnosti jde velmi těžce rozlišit rod *Bifidobacterium* od rodu *Gardnerella*, do kterého patří pouze druh *Gardnerella vaginalis*. Rod *Gardnerella* však vykazuje mnohem nižší obsah G+C (42%) než rod *Bifidobacterium* (55-65%) (Ventura a kol, 2004).

V současnosti rod *Bifidobacterium* nyní zahrnuje okolo 60 druhů a poddruhů.

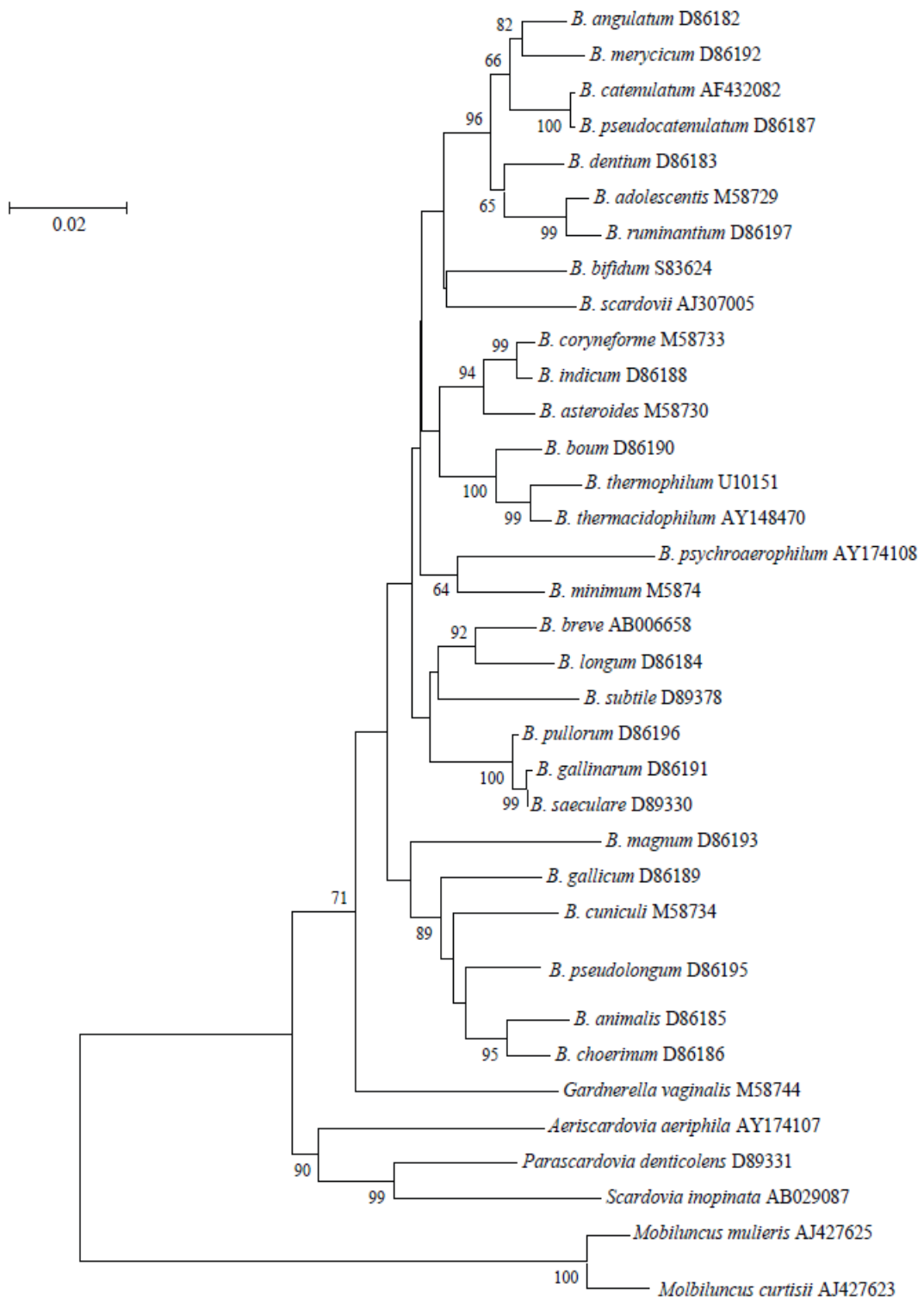
Tabulka č. 1 - Seznam rodu *Bifidobacterium* (upraveno podle
www.bacterio.net/bifidobacterium.html)

Druh, poddruh	Původně izolováno	Izoloval, rok	Kód DSM
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	Trávicí trakt čmeláka	Killer a kol., 2011	22766
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Bachor skotu, střevo dospělého člověka	Reuter, 1963	20083
<i>Bifidobacterium aesculapii</i>	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	Modesto a kol. 2014,	26737
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Lidské výkaly	Scardovi a Crociani, 1974	20098
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kryší výkaly	Masco a kol. 2004	20104
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Jogurt	Masco a kol. 2004	10140
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>	Vodní kefir	Laureys a kol. 2016	LMG: 28769
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Trávicí trakt včely medonosné	Scardovi a Trovatelli, 1969	20089
<i>Bifidobacterium biavatii</i>	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo a kol., 2012	23969
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Stolice kojence	Orla-Jensen, 1924	20456
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	Trávicí trakt čmeláka	Killer a kol., 2011	22767
<i>Bifidobacterium bombi</i>	Trávicí trakt čmeláka	Killer a kol., 2009	19703
<i>Bifidobacterium boum</i>	Bachor skotu	Scardovi a kol., 1979	20432
<i>Bifidobacterium breve</i>	Střevo kojence	Reuter, 1963	20213
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	Endo a kol., 2012	23973
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Stolice člověka, odpadní vody	Scardovi a Crociani, 1974	20103
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Výkaly selete	Scardovi a kol., 1979	20434
<i>Bifidobacterium commune</i>	Střevo čmeláka	Praet a kol., 2015	28792
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	Trávicí trakt včely medonosné	Biavati a kol., 1982	20216
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	Syrové mléko	Delcenserie a kol., 2013	LMG: 23609
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	Králičí výkaly	Scardovi a kol., 1979	20435

<i>Bifidobacterium denticolens</i>	Zubní kaz člověka	Crociani a kol., 1996	10105
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Zubní kaz	Scardovi a Crociani 1974	20436
<i>Bifidobacterium eulemuris</i>	Výkaly lemura (<i>Eulemur macaco</i>)	Michelini a kol., 2016	100216
<i>Bifidobacterium faecale</i>	Stolice člověka	Choi a kol., 2014	19856
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Střevo dospělého člověka	Lauer, 1990	20093
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	Slepé střevo kuřete	Watabe a kol., 1983	20670
<i>Bifidobacterium hapali</i>	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus L.</i>)	Michelini a kol., 2016	100202
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Trávicí trakt včely medonosné	Scardovi a Trovatelli 1969	20214
<i>Bifidobacterium inopinatum</i>	Zubní kaz člověka	Crociani a kol., 1996	10107
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	Stolice kojence	Morita a kol., 2011	21854
<i>Bifidobacterium lemurum</i>	Výkaly lemura (<i>Lemur catta</i>)	Modesto a kol., 2015	28807
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Střevo kojence	Mattarelli a kol., 2008	20088
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	Střevo dospělého člověka	Mattarelli a kol., 2008	20219
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i>	Výkaly selat	Yanokura a kol., 2015,	28597
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	Výkaly prasat	Mattarelli a kol., 2008	20211
<i>Bifidobacterium magnum</i>	Králičí výkaly	Scardovi a Zani, 1974	20222
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	Bachor skotu	Biavati a Mattarelli, 1991	6492
<i>Bifidobacterium minimum</i>	Odpadní voda	Biavati a kol., 1982	20102
<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	Kumys (nápoj z mléka klisny)	Watanabe a kol., 2009	21395
<i>Bifidobacterium moukalabense</i>	Výkaly gorily nížinné (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	Tsuchida a kol., 2014	27321
<i>Bifidobacterium myosotis</i>	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus L.</i>)	Michelini a kol., 2016	100196
<i>Bifidobacterium</i>	Stolice kojence	Scardovi a kol., 1979	20438

<i>pseudocatenulatum</i>			
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Bachor skotu	Yaeshima a kol., 1992	20092
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Prasečí výkaly	Mitsuoka 1969	20099
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	Prasečí slepé střevo	Simpson a kol., 2004	22366
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	Kuřecí výkaly	Trovatelli a kol., 1974	20433
<i>Bifidobacterium reuteri</i>	výkaly kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	Endo a kol., 2012	23975
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	Bachor skotu	Biavati a Mattarelli 1991	6489
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	Králičí výkaly	Biavati a kol., 1992	6531
<i>Bifidobacterium saguini</i>	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo a kol., 2012	23967
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Lidská krev	Hoyles a kol., 2002	13734
<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo a kol., 2012	23968
<i>Bifidobacterium stercoris</i>	Stolice člověka	Kim a kol., 2010	24849
<i>Bifidobacterium subtile</i>	Odpadní voda	Biavati a kol., 1982	20096
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Výkaly selete	Zhu a kol., 2003	17755
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Odpadní voda	Zhu a kol., 2003	15837
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	Prasečí výkaly	Mitsuoka, 1969	20210
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i> L.)	Michelini a kol., 2016	100201
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>	Zubní plak křečka	Okamoto et al. 2008	17777

Obrázek č. 2 - Fylogenetický strom zobrazující vztahy mezi druhy čeledi *Bifidobacteriaceae* sestavený na základě 16S rRNA analýzy genové sekvence (Felis a Dellaglio, 2007)



2.1.5 Výskyt

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

Rod *Bifidobacterium* zahrnuje především druhy, které byly původně izolovány z výkalů či trávicího traktu zvířat. *B. adolescentis* a *B. longum* subsp. *longum* byly objeveny u zvířat i člověka. *B. adolescentis* poprvé objevil Reuter v kravském bachoru a ve střevě dospělého člověka a *B. longum* subsp. *longum* byla objevena ve výkalech telat a ve střevě člověka (Bunešová a kol., 2014). Mezi další druhy, které se často vyskytují v lidském organismu patří *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. angulatum* (Ventura a kol., 2004). Z lidských výkalů či trávicího traktu byly objeveny také *B. gallicum* a nedávno objevené *B. stercoris* a *B. kashiwanohense* (Bunešová a kol., 2014).

Bifidobakterie byly objeveny také v ústní dutině a to především *B. dentium*, která způsobuje zubní plak a pravděpodobně i zubní kazy (Ventura a kol., 2004).

Některé bifidobakterie byly objeveny v mléce a mléčných produktech. Jsou to *B. animalis* subsp. *lactis* izolované z jogurtu, *B. crudilctis* objeveny v syrovém mléce a sýrech a *B. mongoliense* izolované z koňského mléka (Bunešová a kol., 2014).

Ventura se v rozdělení podle ekologických nik ve skupině z trávicích traktů zvířat zaměřil na bifidobakterie, které byly izolované převážně z výkalů prasat. Patří sem *B. longum* subsp. *suis*, *B. thermophilum*, *B. choerinum*, *B. aerophilum*, *B. psychroaerophilum*, *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* a *B. boum*. Druhy, které byly izolovány z výkalů telete, krávy a kuřete jsou *B. animalis*, *B. magnum*, *B. pseudolongum*, *B. globosum*, *B. merycicum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare* a *B. cuniculi*. Bifidobakterie byly nalezeny ve výkalech i dalších zvířat, např. u králíka, skotu nebo myši. Dále byly izolovány ze slepého střeva kuřete a slepého střeva vepře a kravského bachoru (Ventura a kol., 2004).

V posledních několika letech bylo popsáno mnoho nových druhů bifidobakterií z gastrointestinálního traktu primátů. V roce 2010 izolovali Endo a kol. 5 atypických kmenů bifidobakterií z výkalů Kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) a Tamarína žlutorukého (*Saguinus midas*). Na základě hlubší analýzy bylo ustanoveno 5 nových druhů: *Bifidobacterium reuteri*, *Bifidobacterium callitrichos*, *Bifidobacterium saguini*,

B. stellenboschense, a *B. biavatii* (Endo a kol., 2012). O dva roky později byl popsán nový druh izolovaný z výkalů Gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) *B. moukalabense* (Tsuchida a kol., 2014). Další nové taxony *B. myosotis*, *B. tissieri* a *B. hapali* (Michelini a kol., 2016b) byly získány z výkalů mláděte Kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) a to i přes fakt, že se výskytem bifidobakterií u tohoto druhu zabývalo již několik studií v předešlých letech (Endo a kol., 2010; Endo a kol., 2012). V roce 2016 byly také popsány druhy *B. aerophilum*, *B. avesanii* a *B. ramosum* izolované z trávicího traktu Tamarína pinčího (*Saguinus oedipus*) (Michelini a kol., 2016a). Všechny nové druhy bifidobakterií, zmíněné výše, pocházejí z jedinců žijících v přirozeném nebo alespoň částečně přirozeném prostředí. Naopak ve výkalech orangutana a šimpanze chovaných v zoologické zahradě detekoval D'Aimmo a kol. (2014) *B. adolescentis* a *B. dentium*, druhy typické pro člověka.

Z hmyzího trávicího traktu bylo izolováno 6 druhů; *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. incidium*, *B. bombi*, *B. actinocoloniiforme* a *B. bohemicum*. Nejčastěji byly izolovány z trávicího traktu čmeláků a včel, ale vyskytují se u různého hmyzu např. švábů, vos nebo sršní (Bunešová a kol., 2014).

Mnoho druhů bifidobakterií byly objeveny v odpadních vodách v důsledku fekálního znečištění. Druhy *B. subtile* a *B. minimum* byly izolovány pouze v odpadních vodách (Biavati a kol., 1982).

2.1.6 Význam

Střevní mikroflóra je velmi složitý systém, jehož úplné složení není dosud zcela známo (Felis a Dellaglio, 2007). Nejen lidský gastrointestinální trakt (GIT) je kolonizován velkým počtem různorodých skupin mikroorganismů, zabírající specifické oblasti a výklenky traktu. Tyto mikroorganismy se vyvinuly v souladu s jejich hostitelem a jsou nezbytné k správné funkci GIT. Vyvážená, komplexní mikroflóra je nezbytná pro správné trávení a k udržení homeostázy střevního ekosystému (Schell a kol., 2002).

Celkové složení je ovlivněno mnoha činiteli, mezi něž patří strava, věk, zdravotní stav hostitele, kulturní vlivy a další. Rod *Bifidobacterium* společně s rodem *Lactobacillus* jsou díky svým probiotickým vlastnostem, jedny z nejdůležitějších organismů zapojených do potravinové mikrobiologie a střevní mikroflóry lidského organismu (Felis a Dellaglio, 2007).

Střevní mikroorganismy, včetně bifidobakterií, se v těle člověka mění v závislosti na lidském věku (Ward a Roy, 2005). Zavedení pevných potravin do stravy kojených dětí má za následek významnou změnu mikroflóry (Ventura a kol., 2004). Nejčastější druhy izolovány ze vzorků stolice kojenců jsou *B. bifidum*, *B. longum*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. breve*.

U dospělých to jsou druhy *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum* a *B. catenulatum*/*B. pseudocatenulatum*.

Bifidobakterie mají příznivé účinky na lidské zdraví. Mezi zdravotní účinky, které tyto bakterie přináší, patří: stimulace imunitní odpovědi, znesnadnění růstu mnoha potenciálních patogenů a hnilobných bakterií, prevence proti průjmům, zácpě či jiným střevním infekcím, stimulace k přijímání laktózy, obnova střevní mikroflóry po léčbě antibiotiky. Organismy, které mají tyto pozitivní účinky, se nazývají probiotika (Ward a Roy, 2005). Mezi probiotika patří hlavně druhy *B. animalis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* a *B. adolescentis*. Jejich růst v trávicím traktu ovlivňují látky nazývané termínem prebiotika, mezi něž patří především oligosacharidy a polysacharidy (Satokari a kol., 2001). Prebiotika jsou definovány jako nestravitelné složky potravy, které mohou ovlivnit zdraví hostitele stimulací růstu bakterií nebo jejich metabolickou aktivitu v tlustém střevě, a tím zlepšují zdraví hostitele (Gibson a Roberfroid 1995).

Při mikrobiálním rozkladu polysacharidů, oligosacharidů a proteinů v batoru a tlustém střevě vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), které mají jeden až šest atomů uhlíku. Jsou rozpustné ve vodě a snadno absorbovány v těle. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem se přirozeně vyskytují v ovoci, zelenině a mléčném tuku. Bifidobakterie pomocí fruktózo-6-fosfátové dráhy metabolizují nestravitelné zbytky např. celulózu a škrob, při čemž vzniká fosfoenolpyruvát, který je degradován na pyruvát. Pyruvát je poté bifidobakteriemi metabolizován za vzniku acetyl-CoA a dále pak k tvorbě SCFA, acetátu a butyrátu. Při této metabolické cestě se vytváří 1,5 molu acetátu na mol hexózy. SCFA využívají epitelové buňky sliznice tlustého střeva, jaterní buňky a svalové buňky. Produkce SCFA v tlustém střevě má přímý vliv na absorpci amoniaku. Podle studií může amoniak zapříčinit nádorové bujení střevních buněk.

Některé druhy rodu *Bifidobacterium* jsou schopné produkovat konjugovanou kyselinu linolovou (CLA). CLA se přirozeně vyskytuje v živočišné tukové tkáni a mléce přežvýkavců. CLA vzniká v důsledku mikrobiální biohydrogenace kyseliny linolové a linolenové v batoru přežvýkavců. Bylo prokázáno, že CLA normalizuje sníženou glukózovou toleranci a zamezuje růst hyperglykémie. CLA také ovlivňuje produkci leptinu, což je hormon vylučovaný tukovou tkání. Leptin reguluje příjem potravy. CLA se tudíž může nepřímo podílet na snížení tělesné hmotnosti (Russell a kol., 2011).

Druhy *B. longum*, *B. animalis* subsp. *lactis* a *B. breve* vykazují antimikrobiální aktivitu proti patogenům díky konkurenčnímu vyloučení. Tyto druhy umožňují dekonjugaci solí žlučových kyselin a jsou schopné přilnout na hleny nebo střevního epitelu. Tyto vlastnosti

jsou důležité při určování zdraví prospěšných a probiotických mikroorganismů (Ventura a kol., 2004).

Díky svému probiotickému účinky jsou bifidobakterie používány v mnohých výrobcích, jako jsou jogurty, zakysané smetany, sýry, sušená mléka, zmrzlina a další mléčné výrobky. Nejčastěji se v probiotických produktech používají druhy *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. animalis* subsp. *lactis* (Hawkins, 1993).

2.1.7 *Bifidobacterium longum*

2.1.7.1 Genom

V roce 2002 provedl Schell a kol. sekvenaci genomu u kmene *Bifidobacterium longum*, který byl izolován z výkalů kojence. *B. longum* NCC2705 byl první kmen, u kterého byla poprvé provedena sekvence celého genomu. Bylo identifikováno 1730 pravděpodobně kódujících oblastí, které tvoří 86% celkového genomu. Konkrétní funkce byly přiřazeny 1225 z nich, což je 78%. U ostatních 505 kódujících oblastí (29%) nebyla jejich funkce zatím zcela objasněna, z nichž se 389 (22%) neshodovalo s již známými sekvencemi genomů. To znamená, že tyto geny jsou buď charakteristické pouze pro *B. longum* nebo zatím nebyly ještě identifikovány.

Druh *B. longum*, jakožto grampozitivní, prokaryotní organizmus, má cirkulární chromozom s obsahem 60% C+G a velikostí 2 256 646 bp. Součástí chromozomálního replikonu jsou 4 téměř identické *rrn* operony, 57 tRNA, 16 intaktních sekvenčních prvků, profágy a integrované plazmidové zbytky.

B. longum má geny pro syntézu minimálně 19 aminokyselin z NH_4 a biologických prekurzorů např. fosfoenolpyruvátu, oxalacetátu, oxoglutarátu a fumarátu poskytované v Krebsově cyklu (Schell a kol., 2002).

V současnosti jsou osekvenované a k dispozici desítky genomů druhů *B. longum* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

2.1.7.2 Poddruhy

Taxonomické nesrovnalosti týkající se druhů *B. longum* a *B. infantis* byly vyřešeny, když byly společně klasifikovány pod názvem *B. longum*. Pomocí molekulárních metod byly uznány tři biotypy; *infantis*, *longum* a *suis* (Sakata et al., 2002).

DNA těchto poddruhů vykazuje podobnost 63 až 81% (Mattarelli a kol., 2008). Později byl popsán nový poddruh *B. longum* subsp. *suillum* (Yanokura a kol., 2015).

2.1.7.2.1 Sacharidová preference

Identifikace biotypů *B. longum* pomocí sacharidové preference je těžká (Bahaka a kol., 1993). Podle Reutera není L-arabinóza fermentovatelná pro *B. longum* subsp. *infantis*. Pro *B. longum* subsp. *longum* je charakteristická fermentace melezitózy. D-ribosa je fermentovatelná pouze *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis*. *B. longum* subsp. *infantis* fermentuje D-glukuronát a α -fukózu, které naopak nejsou využitelné pro *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *suis*. Arabinogalaktan je využitelný pro *B. longum* subsp. *longum*, ale není fermentovatelný pro *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *suis* (Mattarelli a kol., 2008).

2.1.7.2.2 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*

B. longum subsp. *longum* byl popsán Reuterem v roce 1963 izolovaný z fekálií dospělého člověka. Již dříve bylo prokázáno, že je dominujícím druhem GIT dospělých lidí.

Bakterie, rostoucí na TPY (tryptone phytone yeast extract) agaru, mají velmi protáhlé, relativně tenké, lehce nepravidelné buňky, které mohou být ve vzácných případech rozvětvené. V TPY médiu se většina buněk rozvíjí v jednotném zákalu. Sedimentace probíhá pomalu a sediment je viskózní (Scardovi, 1986).

Jedinci tohoto druhu byli izolováni ze stolice dospělých lidí i kojenců, výkalů telat, vagíny a odpadních vod (Mattarelli a kol., 2008).

2.1.7.2.3 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

Reuter popsal v roce 1963 *B. infantis* jako nejvíce převládající druh gastrointestinálního traktu kojenců.

Buněčná morfologie tohoto poddruhu nevykazuje specifické vlastnosti, která by je odlišovala od jiných druhů tohoto rodu. Tyto bifidobakterie nefermentují pentózy.

Jedinci tohoto druhu byli izolováni ze stolice kojenců i sajících telat a v lidské vagíně (Scardovi, 1986).

2.1.7.2.4 *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* a subsp. *suillum*

B. longum subsp. *suis* izolovaný z prasečích výkalů popsal Matteuzzi a kol. roku 1971. Jedinci tohoto druhu mají štíhlé, prodloužené buňky (2-6 μ m), vzácně mohou být rozdvojené do tvaru kříže. Kolonie jsou kruhovitě, hladké a bílé s plným okrajem. V kapalných médiích jsou zprvu kalné, po 24 až 36 hodin sedimentují.

Tento poddruh byl objeven ve výkalech selat (Mattarelli a kol., 2008) a také ve výkalech telat na mléčné výživě (Bunešová a kol., 2012).

Biotyp *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* byl dále rozdělen na dvě skupiny podle využití ureázy. *B. longum* subsp. *suillum* subsp. nov. vykazuje test na ureázu negativní, zatímco *B. longum* subsp. *suis* je ureáza pozitivní (Yanokura a kol. 2015).

2.2 Metody identifikace a charakterizace bakterií rodu *Bifidobacterium*

2.2.1 Kultivace

Současný stav informací o mikroorganizmech žijících v gastrointestinálním traktu, je z velké části založen na kultivačních studiích. Podle vědeckých odhadů však až 85% z celé mikrobiální populace lidského střeva nejsme prozatím schopni vykultivovat. V důsledku toho je náš obraz střevní mikroflóry zaujatý ve prospěch mikroorganismů se snadnější kultivací (Satokari a kol., 2001).

Bylo popsáno mnoho médií pro detekci bifidobakterií, ale žádný z příslušných médií se nezdá být zcela selektivní. Mimo to některá selektivní média neumožňují růst všech druhů tohoto rodu. Nicméně jako selektivní faktor v používaných médiích se používá antibiotikum mupirocin (Rada a Petr, 2002). S přidavkem mupirocinu lze pak použít různá základní média (Bunesova a kol., 2015). Vlková a kol. (2015) navíc navrhli mupirocinové médium doplněné o norfloxacin a kyselinu octovou. Toto médium je více selektivní, potlačuje růst klostridií a lze ho používat ke kvantifikaci a izolaci bifidobakterií z komplexních prostředí jako jsou fekální vzorky.

2.2.2 Fenotypové metody

Použitelnost kultivačních medií obvykle hodnotí Gramovo barvení jednotlivých kolonií ze selektivních agarových půd. Identifikace bakterií rodu *Bifidobacterium* je založena na detekci enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy (F6PPK), který vzniká při fermentaci hexóz. Tento test je v porovnání s Gram barvením časově náročnější, ale pozitivní test je spolehlivým rozlišením příbuzných rodů (Rada a Petr, 2002). Enzym fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza slouží jako taxonomický nástroj k identifikaci rodu, neumožňuje však identifikaci na úrovni druhu (Ventura a kol., 2004). Principem reakce je přeměna fruktózo-6-fosfátu na acetylfosfát, který reaguje s cheláty železa za vzniku komplexu. Tato komplexní

sloučenina způsobí červenofialové zbarvení, které značí, že test je pozitivní, tudíž se jedná o rod *Bifidobacterium* (Scardovi, 1986).

2.2.2.1 Hmotnosti spektrofotometrie MALDI TOF MS

Hmotnostní spektrometrie je v dnešní době pravděpodobně nejvyužívanější metodou pro identifikaci rodu, druhu i poddruhu bakterií. Její výhodou je vysoká citlivost a rychlé provedení. Tato metoda je založena na specifické molekulové hmotnosti iontů, která se porovnává s databází spekter referenčních kmenů. Pro identifikaci bifidobakterií a ostatních bakterií trávicího traktu je obzvláště vhodný přístroj Bruker (Emonet a kol., 2010). Při výzkumu druhové diverzity bifidobakterií Chaplina a kol. (2015) bylo úspěšně identifikováno na úrovni druhu 93 % testovaných kmenů a ve studii Khonsariho a kol. (2016) dokonce všechny kmeny na úrovni druhu.

2.2.3 Genotypové metody

Příchod molekulárně-biologických metod výrazně rozšířil schopnost spolehlivě identifikovat kmeny a zhodnotit jejich evoluční příbuznost (Ventura, 2004).

První metody molekulární identifikace byly DNA-DNA hybridizace, sekvenční analýza 16S rDNA, hybridizace se specifickou sondou a polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP). Molekulární identifikace je založena na konstitutivní skladbě nukleových kyselin. Avšak sekvence podobnosti je u některých druhů velmi vysoká např. *B. catenulatum* a *B. pseudocatenulatum* (podobnost 99,5%) a *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* (podobnost 99,1%). Tzv. druhá generace molekulárních metod, do níž se řadí polymerázová řetězová reakce (PCR), multiplex-PCR, sekvenování specifických genů, restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA (ARDRA) a elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE), pozdvihla detekci a identifikaci na úrovni rodu a druhu na vyšší úroveň. Mezi další skupinu molekulárně-biologických metod patří náhodně amplifikované polymorfní DNA (RAPD), pulzní gelová elektroforéza (PFGE) a interrepetitivní polymerázová řetězová reakce (REP-PCR). Tyto metody jsou dobře využitelné při identifikaci a charakterizaci bifidobakterií v komerčních produktech i trávicím traktu (Ward a Roy, 2005).

2.2.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Mezi lety 1983 a 1985 vyvinul Kary Mullis v Cetus Corporation, USA novou metodu syntézy velkého množství fragmentů DNA bez využití klonování. Tato metoda byla pojmenována PCR (Prescott a kol., 2002).

PCR (polymerase chain reaction) patří k nejvýznamnějším objevům molekulární genetiky, díky této metodě došlo k zjednodušení a zlevnění analýz. PCR je *in vitro* metoda, při níž se syntetizují úseky DNA, založené na replikaci nukleových kyselin. Tento proces se nazývá amplifikace. Díky PCR se získá velké množství specifických genů nebo jiných segmentů DNA, které mohou být dále využity. Fragmenty DNA určené k replikaci musí ohraničovat dva oligonukleotidové primery (Madigan a kol., 2015).

Výhodou PCR je jeho vysoká efektivnost, rychlost, přesnost, citlivost a jednoduchost ovládací techniky. Další z výhod pro detekci bifidobakterií je, že PCR na rozdíl od klasických metod nevyžaduje anaerobní podmínky (Ward a Roy, 2005). Reakce probíhá v přístroji zvaný termocykler, v němž se automaticky mění teploty podle předem navoleného programu. Termocykler je schopný provést například 25 cyklů a amplifikovat DNA 105 krát za 57 minut (Prescott a kol., 2002).

Komponenty PCR:

- **Templátová DNA** - jejíž úsek má být amplifikován
- **Pár primerů** – uměle syntetizované oligonukleotidy, sloužící k iniciaci PCR (Medican a kol., 2015). Primery jsou obvykle cca 20 nukleotidů dlouhé (Prescott a kol., 2002).
- **Termostabilní polymeráza** - většinou *Taq* DNA-polymeráza, izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech. DNA polymeráza přirozeně kopíruje molekuly DNA. *Taq* DNA-polymeráza je stabilní za teploty cca 95°C. Může být použita i např. *Pfu* polymeráza izolovaná z hypertermofilní bakterie *Pyrococcus furiosus*, která roste při optimu 100 °C (Madigan a kol., 2015) nebo *Vent* polymeráza z bakterie *Thermus litoris* (Prescott a kol., 2002).
- **Mix nukleotidů** (dNTP) - 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), přítomné většinou v 50-200 μM a množství všech čtyř komponentů by mělo být vyvážené (Innis a kol, 2012). Nukleotidy tvoří stavební složku pro syntézu nových vláken DNA (Madigan a kol., 2015).

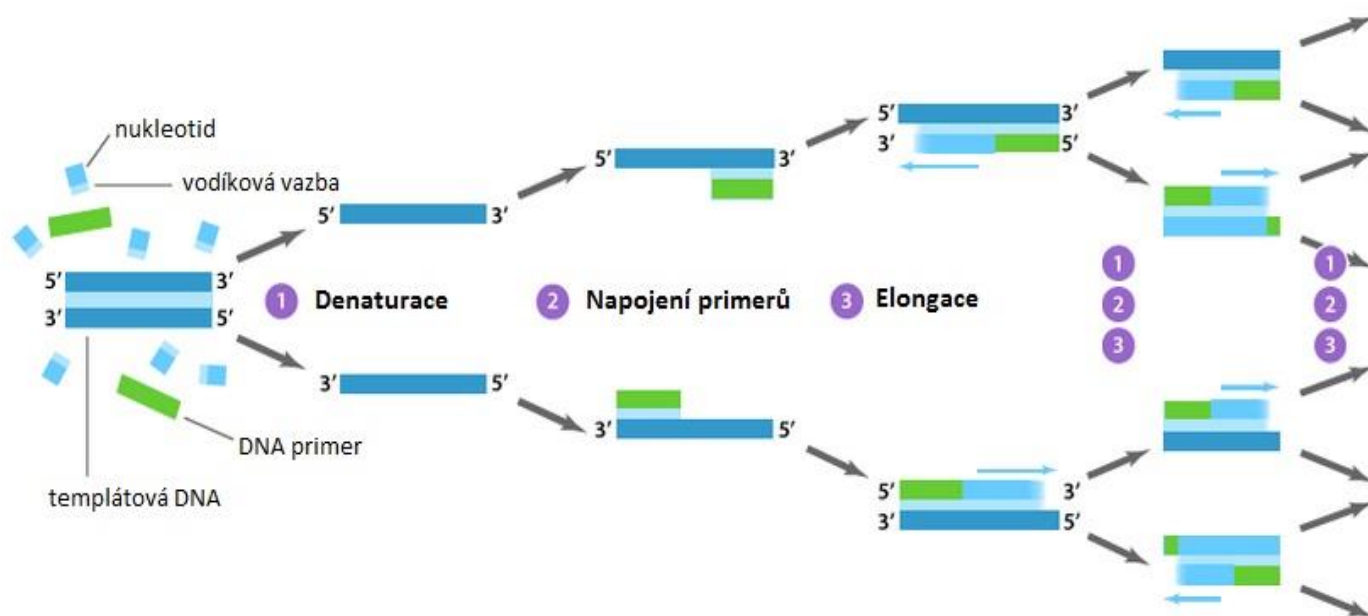
- **Mg²⁺** - koncentrace iontů hořčíku má vliv na enzymovou aktivitu, napojení primerů a specifitu produktů. Obsah Mg²⁺ by měl být 0,5 – 2,5 mM.
- **Puf** – vytváří optimální prostředí pro správnou aktivitu DNA polymerázy. Běžný puf pro PCR by měl být složen z 10 mM Tris-HCL s pH mezi 8,3 až 8,8 a 50mM KCl pro usnadnění připojení primerů. Při větším množství KCl by došlo k inhibici aktivity *Taq* DNA-polymerázy. PCR puf by dále měl obsahovat 1,5 mM MgCl₂ a 100 μM/ml želatiny.
- **PCR voda** – pro doplnění na požadovaný objem (Innis a kol, 2012).

Průběh:

Proces PCR je založen na cyklických změnách teploty:

- 1) Denaturace - reakce probíhá při 95°C, což vede k denuraci templátu, tedy změny prostorové struktury molekul DNA. Původně jeden komplementárně vázaný dvouřetězec DNA se rozdělí na dvě jednořetězcová vlákna.
- 2) Napojení primerů (annealing) – během této fáze se teplota sníží nejčastěji na 55-68 °C, což způsobí připojení primerů k templátu DNA. (Madigan a kol., 2015). Teplota a délka procesu potřebná k připojení primerů závisí na složení bází, délce oligonukleotidů a amplifikaci primerů (Innis a kol. 2012)
- 3) Elongace – v této části se zvýší teplota na cca 75 °C a dochází k samotné syntéze DNA (Madigan a kol., 2015). DNA polymeráza způsobuje extenzi navázaných primerů a syntézu kopií cílové sekvence DNA s využitím deoxyribonukleosid trifosfátů ve směru 5'→ 3'.

Obrázek č. 3 – Průběh PCR (upraveno podle www.abmgood.com)



Výsledek těchto tří fází cyklu je vznik dvou dvou-řetězců DNA z původního jednoho dvou-řetězce. Při dalším cyklu vzniká ze 4 vláken z prvního cyklu 8 fragmentů a při třetím vzniká 16 fragmentů DNA. Dvacet cyklů bude tedy produkovat kolem milionu kopií sekvencí DNA a 30 cyklů zhruba miliardu (Prescott a kol., 2002).

2.2.3.2 Multiplex PCR

Multiplex PCR je podobný běžnému PCR, ale tato metoda využívá více párů primerů, které se váží k různým úsekům templátové DNA a vzniká více produktů. Výhodou této metody je snížení počtu PCR reakcí a zkrácení její doby. Pro Multiplex PCR je důležité, aby teplota pro všechny primery byla ve stejném rozsahu, dále aby produkty PCR měly odlišné velikosti a byly tak od sebe rozlišitelné. U této metody je zapotřebí větší množství enzymu Taq polymerázy, oproti běžnému PCR (Ward, Roy, 2005).

2.2.3.3 Sekvenování specifických genů

Pro identifikaci a charakterizaci rodu *Bifidobacterium* může být použito sekvenování specifických genů. Je známo, že sekvence genů DNA, kódující proteiny, jsou účinnější pro charakterizaci bifidobakterií než sekvence genu 16S rRNA. Těmito geny jsou například: láktátdehydrogenáza (*ldh*), protein tepelného šoku (*hsp60*) a pyruvát kináza (*pk*) (Ward a Roy, 2005).

2.2.3.4 Restrikční analýza amplifikované ribozomální DNA (ARDRA)

V metodě ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) je amplifikován pomocí PCR buď celý gen rRNA nebo pouze oblast genu 16S rRNA. Posléze je produkt štěpen jedním restrikčním enzymem. Výběr restrikčních enzymů je důležité pro určení rozdílů při větším množství druhů. Produkty štěpení jsou separovány agarózovou gelovou elektroforézou, barveny ethidium bromidem a poté vizualizovány pod UV světlem (Ward a Roy, 2005). Počet a velikost výsledných fragmentů DNA se liší v závislosti na množství a umístění restrikčních míst v DNA sekvenci, která je analyzována (Ventura a kol., 2004).

2.2.3.5 Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE)

Principem DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) metody je oddělení fragmentů DNA stejné délky, ale jiné sekvence principem tání (denaturace) (Madigan a kol., 2015). Separace je založena na snížení elektroforetické mobility dvouvláknové molekuly DNA v polyakrylamidových gelech, obsahujících denaturující látky (směs močoviny a formamidu) nebo lineární teplotní gradient (Muyzer a Smalla, 1998). Pro tuto metodu je důležitý výběr správné rychlosti průběhu reakce a denaturačního gelu, aby se dosáhlo optimálního oddělení řetězců (Ward a Roy, 2005).

2.2.3.6 REP-PCR

Metoda REP-PCR (repetitive element palindromic PCR) slouží k získání fingerprintů genomové DNA, při níž se využívají primery tak, aby byly komplementární s krátkými repetitivními sekvencemi genomu. Při této PCR mohou být použity tři různé primery. BOX primer (původně popsáný u *Streptococcus pneumoniae*), ERIC primer (původně popsáný v *Salmonella typhimurium*) a REP primer (původně popsáný u *Escherichia coli*) (Ward a Roy, 2005). PCR amplifikace teplotové DNA má za následek tvorbu produktů s rozdílnou velikostí (Szcuka a Kaznowski, 2004).

3. Hypotéza

Bakterie druhu *Bifidobacterium longum* dokáží zutilizovat celou řadu substrátů, kdy můžeme očekávat určitou závislost na hostitelském prostředí, ze kterého byly izolovány.

4. Cíl praktické části

Cílem praktické části je zjistit substrátovou preferenci bifidobakterií izolovaných z různých hostitelských prostředí a pomocí molekulárně biologických metod identifikovat *Bifidobacterium longum* na poddruhovou úroveň.

5. Metodická část

5.1 Použité mikroorganismy

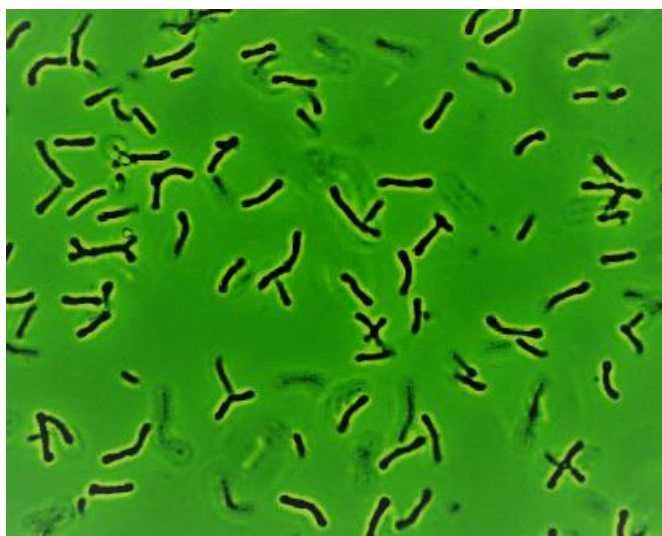
Pro tuto práci bylo použito 61 izolátů z rodu *Bifidobacterium* ze sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, které byly z velké části identifikovány na druhovou úroveň. U izolátů pocházejících z oficiálních sbírek jako DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) byla známá identita až na poddruhovou úroveň, totéž u izolátů, které byly součástí dříve vyšlých publikací KMVD. Zbytek izolátů byl více charakterizován a identifikován v rámci této bakalářské práce. Mikroorganismy byly vybrány z různých ekologických nik. Seznam všech použitých mikroorganismů je uveden v tabulce č. 4 (výsledky).

5.2 Příprava kultur

Bakteriální kmeny byly původně zmrazeny v modifikovaném Wilkins-Chargrem bujónu s přidavkem Bifipufu s glycerolem na - 20 °C. Jeden den před testováním byly mikroorganismy rozmrazeny a naočkovány (0,5 ml) do tekutého, anaerobního, modifikovaného Wilkins-Chargrem bujónu (9 ml). Poté proběhla kultivace po dobu 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C. Narostlá kultura se projevila zákalem v médiu. Posléze byla odebrána injekční stříkačkou kapka média s narostlou kulturou na vydezinfikované podložní sklíčko, přikryta krycím sklíčkem a sledována pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse E 200LED MV RS). Pro testování byly nutné pouze čisté kultury bifidobakterií, tedy jednotná kultura nepravidelných tyčinek bez jakýchkoliv jiných mikroorganismů např. koků, laktobacilů, kvasinek apod. (uvedeno na Obrázku č. 4). Mikroskopické pozorování probíhalo pod zvětšením 400x a u každého preparátu byl pořízen digitální snímek. Seznam většiny fotografií je uveden v přílohách.

Pokud byla ve vzorku čistá kultura bifidobakterií, bylo odebráno z každého vzorku živného média s narostlou kulturou po 1 ml do dvou sterilních zkumavek Eppendorf. Jedna zkumavka byla dále použita pro izolaci DNA, druhá pro ANAEROtest 23.

Obrázek č. 4 – Čisté kultury *Bifidobacterium longum*



5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Před provedením PCR musí být nejdříve izolována DNA z čistých kultur. Poté je smíchána směs pro PCR s DNA a vložena do termocykleru, kde proběhne PCR reakce. Následně je PCR směs přenesena do gelu a vložena do elektroforézy na 60 min, poté se gel prosvítí UV světlem a je zachycen grafický záznam – elektroforeogram.

5.3.1 Izolace DNA

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

5.3.2 Příprava PCR směsi

Směs pro PCR byla připravena podle Tabulky č. 2 v tomtéž pořadí a uvedeném množství. Směs byla promíchána a krátce zcentrifugována. Reakční pufr, směs nukleotidů a Taq DNA polymeráza byly přidány ve formě master mixu. Jako primery byly použity pro poddruh *B. longum* subsp. *longum* primery BiLON-1 a BiLON-2 a pro *B. longum* subsp. *infantis* primery BiINF-1 a BiINF-2. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce č. 3. Jednotlivé složky byly rozpipetovány do eppendorfových zkumavek a doplněny 1 µl vyzolovaným DNA do celkového množství 25 µl.

Tabulka č. 2 - Složení směsi pro PCR

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

^a – v koncentraci 10 pmol/µl, ^b – v koncentraci 10 – 30 ng/µl

Tabulka č. 3 – PCR primery (upraveno podle Bunešová a kol., 2014)

Poddruh	Primer	Sekvence primerů	Teplota nasednutí (°C)	PCR produkt (bp)
<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		

5.3.3 PCR proces

Zkumavky byly umístěny do termocykleru a poté byla spuštěna PCR reakce. PCR program probíhal ve třech opakujících se fázích. Počáteční denaturace probíhala při teplotě 95 °C po dobu 5 minut, následovalo 32 cyklů zahrnujících denuraci po dobu 30 sekund při teplotě 95 °C a nasednutí primerů probíhalo 30 sekund při 59 °C, elongace probíhala po dobu 30 sekund při 72 °C. Finální krok elongace trval 5 minut při 72 °C, načež následovalo ochlazení na 4 °C.

5.3.4 Agarózová gelová elektroforéza

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

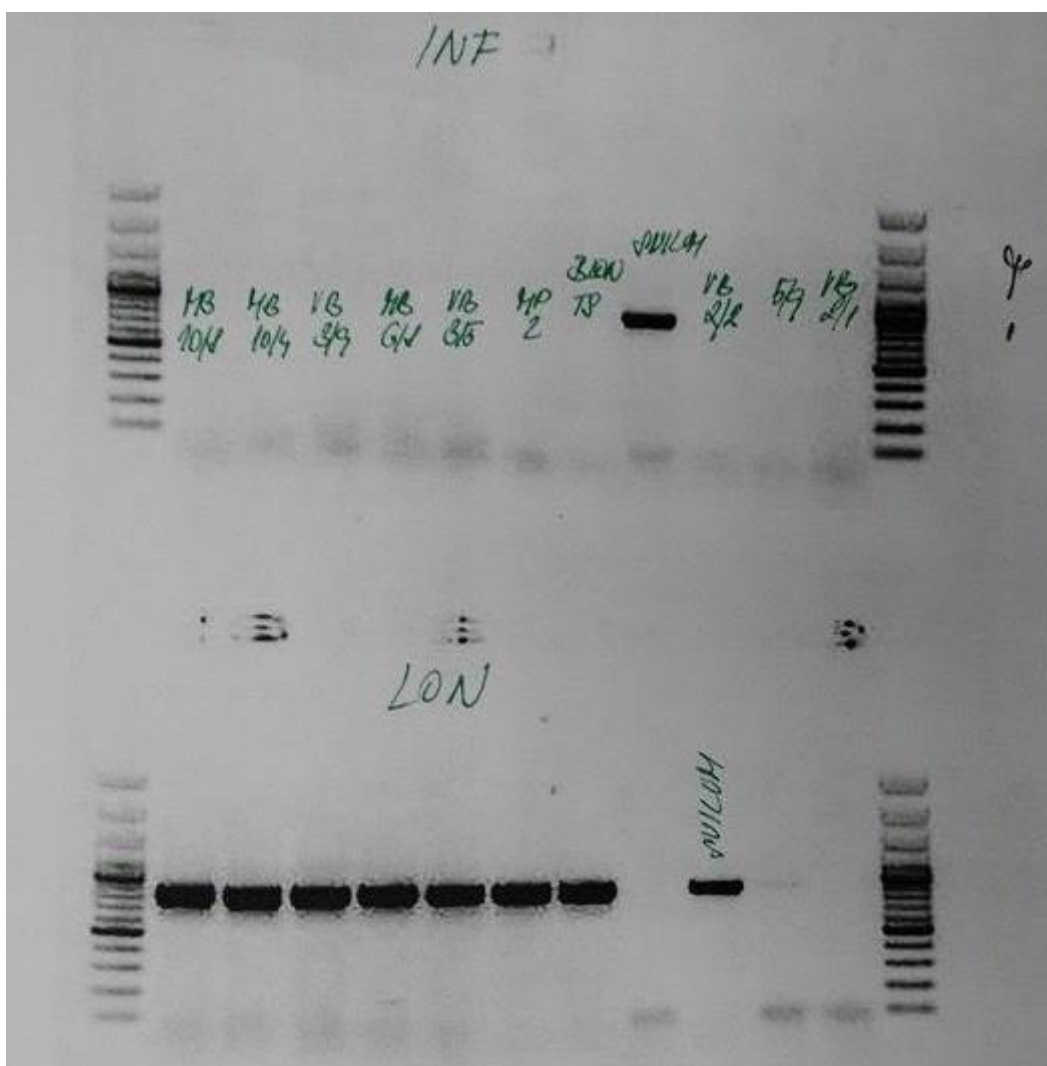
Postup:

- 1) Do 100 ml TAE (Tris-acetát-EDTA) pufru (0,75 krát koncentrovaný) byl přidán 1 g práškové agarózy.
- 2) Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě (3 min.)
- 3) Do směsi bylo přidáno 5 μ l GelRed (Biotum) barviva.
- 4) Roztok byl nalit do elektroforézy, do nádoby s hřebínky a nechal se ztuhnout při laboratorní teplotě.
- 5) Hřebínky byly opatrně vyjmuty, čímž vznikly komůrky pro PCR směs.
- 6) Gel byl zalit TAE pufrem v nádobě elektroforézy.
- 7) Do jamek v gelu bylo automatickou pipetou naneseno po 5 μ l PCR směsi. Do první a poslední jamky se nanáší 5 μ l velikostního standartu, který se přidává pro odhad velikosti pozorovaných fragmentů DNA. Velikost fragmentu se udává jako počet bází – bp (base pair).
- 8) Nádoba elektroforézy byla přikryta víkem a připojena ke zdroji napětí 80 V po dobu 60 minut.

5.3.5 Vyhodnocení

Po hodině elektroforézy byl gel přenesen a vizualizován pomocí Gel-Doc systému (BioRad). Byl pořízen elektroforeogram a v porovnání s velikostním standartem se určily poddruhy jednotlivých kmenů. Výsledek PCR několika kmenů je uveden na Obrázku č. 5.

Obrázek č. 5 – Výsledek PCR



INF – poddruhově specifická PCR pro *B. longum* subsp. *infantis*

LON - poddruhově specifická PCR pro *B. longum* subsp. *longum*

5.4 ANAEROTest 23

Souprava ANAEROTest 23 je systém spojující 23 biochemických testů umožňující identifikaci anaerobních bakterií na základě jejich sacharidového metabolismu. Testy jsou umístěny v jamkách mikrotitrační destičky. Jedna destička umožňuje identifikaci 4 kmenů, tři řady po osmi jamkách obsahují testy pro identifikaci jednoho kmene. Fermentace daného substrátu testovanou bifidobakterií se projeví změnou jeho barvy. K detekci se používá acidobazický indikátor. V pozitivním případě dochází ke zkvašování substrátu a k tvorbě organických kyselin, které okyslí médium a způsobí změnu indikátoru (změna barvy substrátu). Barevná škála pro pozitivní a negativní reakce je uvedena na Obrázku č. 6.

Obrázek č. 6 – Barevná škála (převzato z www.ridacom.com)

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

Vysvětlivky:

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

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

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

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

5.4.1 Příprava inokula

Během přípravy inokula a inokulace bylo potřeba pracovat co nejrychleji, aby byla kultura vystavena působení vzdušného kyslíku co nejkratší dobu.

- 1) 1 ml bakteriální suspenze ve 2 ml zkumavce Eppendorf byly centrifugovány v centrifuze MINI Spin rychlostí 14500 otáček/min po dobu 3 minut.
- 2) Ze zkumavky byl odlit supernatant a ponechán pouze sediment.
- 3) Sediment byl promíchán ve fyziologickém roztoku.
- 4) Suspenze byla centrifugována v centrifuze rychlostí 14500 otáček/min po dobu 3 minut.
- 5) Ze zkumavky byl odlit supernatant a ponechán pouze sediment.

- 6) Sediment byl několikrát promíchán v médiu pro ANAEROTest 23, aby došlo k dokonalé homogenizaci.

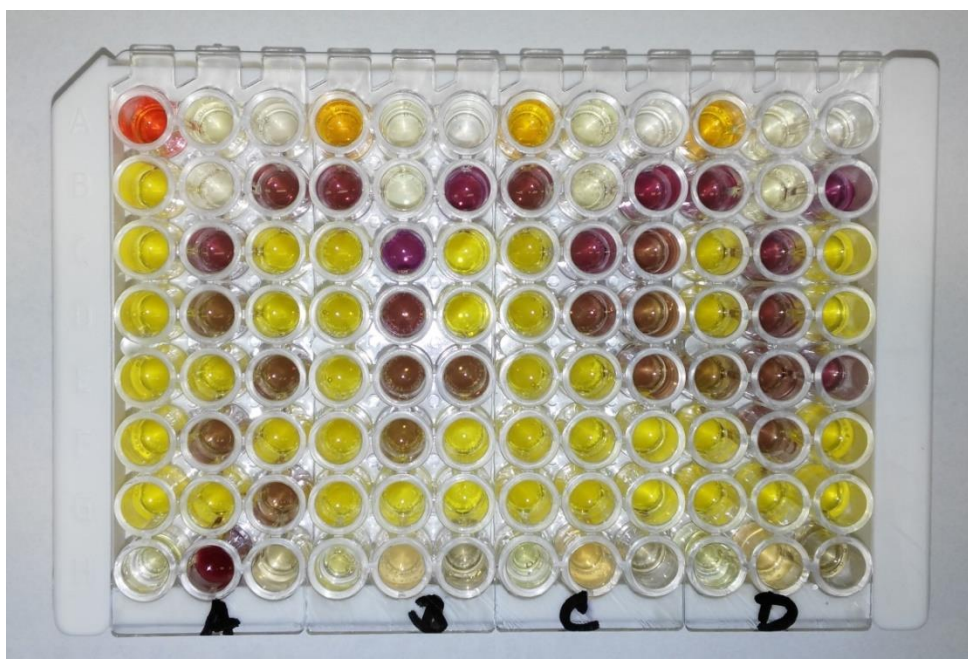
5.4.2 Test

- 1) 0,15 ml suspenze bylo inokulováno injekční stříkačkou do všech jamek v příslušných třech řadách destičky. Bylo dbáno na to, aby nedošlo ke kontaminaci sousedních jamek.
- 2) Jamka pro test pro indol (jamka H v první řadě) byla zakápnuta 2 kapkami parafinového oleje, aby bylo zabráněno vytékání indolu v případě pozitivní reakce.
- 3) Destičky s naočkovanými řadami byly společně s vyvíječem anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid) vloženy do inkubačního sáčku, který byl posléze vzduchotěsně uzavřen.
- 4) Destičky byly umístěny do termostatu nastaveného na 37 °C na 48 hodin.

5.4.3 Vyhodnocení

- 1) Po 48 hodinách inkubace byla jamka pro indol (jamka H v první řadě) zakápnuta 2 kapkami činidla pro indol a jamka pro nitráty (jamka H v druhé řadě) zakápnuta kapkou činidla pro nitráty.
- 2) Pomocí barevné škály (Obrázek č. 6) byly testy vyhodnoceny jako pozitivní nebo negativní a zaznamenány do formuláře pro záznam výsledků. Destička ANAEROTestu 23 během vyhodnocování je zobrazena na Obrázku č. 7.

Obrázek č. 7 – ANAEROTest po 48 hodinách inkubace



6. Výsledky

6.1 PCR identifikace

Seznam všech testovaných kmenů bifidobakterií se nachází v Tabulce č. 4. V práci bylo použito celkem 61 izolátů, pocházejících z 3 ekologických nik - zvířecích hostitelů, lidských hostitelů a potravinových výrobků. 58 izolátů patřilo druhu *B. longum* a pro kontrolu byly zařazeny také 3 izoláty druhu *B. pseudolongum* (DSM 20099, DSM 20092 a BSM8-1 ETH). 16 kmenů pocházelo z typových oficiálních sbírek a byla známa jejich identita. Tyto izoláty byly použity jako kontrolní kmeny. Jednalo se o typový kmen DSM 20219 ze sbírky DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), pocházející ze střeva dospělého člověka. Ze sbírky DSMZ dále pocházely i kmeny DSM 28597 a DSM 20211, vyizolované z výkalů selat, dále kmen DSM 20099 z výkalů prasat a DSM 20092 vyizolovaný z bachoru. Ze sbírky ETH (Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich) pocházel kmen 36 ETH vyizolovaný ze stolice dospělého člověka a dále kmeny 43 ETH, 47 ETH a BSM8-1 ETH pocházející ze stolice šestiměsíčních kojenců z Keni. Typový kmen ATCC 17930, izolovaný ze střeva kojence pocházel ze sbírky ATCC (American Type Culture Collection).

Do PCR identifikace byly zařazeny i 4 izoláty z typových sbírek poddruhu *B. longum* subsp. *suis* (43 ETH, 5/9, 022 II a DSM 20211) a 1 izolát poddruhu *B. longum* subsp. *suillum* (DSM 20211).

Ostatních 45 izolátů, u kterých byla známá pouze rodová a druhová identifikace, byly identifikované na poddruhovou úroveň pouze na základě provedené PCR. Tyto izoláty pocházely z lidských hostitelů (stolice dospělých lidí na konvenční i vegetariánské dietě, kojenců a dětí s Crohnovou chorobou), zvířecích zdrojů (výkalů prasat, selat, telat a z kravského bachoru) a z probiotických výrobků.

U izolátů VB 2/1, VB 2/2 a VB 5/7 pocházejících ze stolice vegetariánů a izolátu INFNUT vyšly obě PCR negativní a nebyla tak zjištěna jejich druhová či poddruhová identita. Naopak u kmenů MB 7/4, MB 7/5 a MB 7/6 pocházejících ze stolice dospělého člověka na konvenční dietě a kmeny MP 1, MP 3 a MP 4 pocházející ze stolice dětí s Crohnovou chorobou vyšla PCR pro oba dva poddruhy pozitivní a taktéž nemohla být získána přesná identita těchto kmenů.

U všech typových kmenů poddruhů *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* z oficiálních sbírek, u nichž byla známa identita vyšla PCR pro daný poddruh pozitivně.

U všech kmenů poddruhu *B. longum* subsp. *suus* včetně typového vyšla pozitivní PCR s použitím primerů pro poddruh *B. longum* subsp. *longum*, pro poddruh *B. longum* subsp. *infantis* byly reakce negativní. Naopak u izolátu DSM 28597 poddruhu *B. longum* subsp. *suillum* vyšly obě PCR pozitivní. U všech kontrolních kmenů druhu *B. psedolongum* vyšla PCR správně, tedy pro oba poddruhy *B. longum* negativně.

38 izolátů bylo na základě provedené PCR identifikováno jako poddruh *B. longum* subsp. *longum* a 5 izolátů jako *B. longum* subsp. *infantis*.

Tabulka č. 4 - Výsledky PCR identifikace

Kmen	Původ	PCR		Identifikováno jako
		<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	
DSM 20219 ^{*b}	Střevo dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
TP1 ^{*a}	Stolice kojence z Keni - 6 měsíců	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
36 ETH ^{*c}	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 1/2 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 1/6 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 1/10 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 2/5 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 2/10 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 3/1 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 5/3 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 5/9 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 5/10 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 6/7 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 6/8 ^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 7/4 ^a	Stolice dospělého člověka	+	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> / <i>infantis</i>
MB 7/5 ^a	Stolice dospělého člověka	+	+	<i>B. longum</i> subsp.

				<i>longum / infantis</i>
MB 7/6^a	Stolice dospělého člověka	+	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum / infantis</i>
MB 10/4^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 10/8^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 1/3^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 1/7^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 2/1^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	-	-	neidentifikováno
VB 2/2^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	-	-	neidentifikováno
VB 2/3^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 3/5^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 3/9^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 4/3^a	Stolice kojence – 2 měsíce	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 4/5^a	Stolice kojence – 2 měsíce	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 5/7^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	-	-	neidentifikováno
VB 5/10^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 6/1^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 6/12^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 7/6^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 8/1^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 8/8^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 9/2^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 9/6^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 9/12^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 10/4^a	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
VB 10/5^a	Stolice dospělého člověka	+	-	<i>B. longum</i> subsp.

- vegetariánská strava				<i>longum</i>
INF NUT ^a	Kojenecká výživa	+/-	-	neidentifikováno
Nutra Bona ^a	Probiotický produkt	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
ATCC 17930 ^{*d}	Střevo kojence	-	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>
Biopron Junior ^a	Probiotický produkt	-	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>
13 w ^{*a}	Stolice kojence z Keni – 6 měsíců	-	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>
13 y ^{*a}	Stolice kojence z Keni – 6 měsíců	-	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>
47 ETH ^{*c}	Stolice kojence z Keni – 6 měsíců	-	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>
MP 1 ^a	Stolice dětí s Crohnovou nemocí	+	+	<i>B. longum</i> subsp <i>longum / infantis</i>
MP 2 ^a	Stolice dětí s Crohnovou nemocí	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MP 3 ^a	Stolice dětí s Crohnovou nemocí	+	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum / infantis</i>
MP 4 ^a	Stolice dětí s Crohnovou nemocí	+	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum / infantis</i>
MP 8 ^a	Stolice dětí s Crohnovou nemocí	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MP 10 ^a	Stolice dětí s Crohnovou nemocí	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
DSM 28597 ^{*b}	Výkaly selat	+	+	<i>B. longum</i> subsp. <i>suillum</i>
5/9 ^{*a}	Výkaly telat	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>
022 II ^{*a}	Výkaly telat	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>
DSM 20211 ^{*b}	Výkaly prasat	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>
43 ETH ^{*c}	Stolice kojence z Keni – 6 měsíců	+	-	<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>
DSM 20099 ^{*b}	Výkaly prasat	-	-	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>
DSM 20092 ^{*b}	Bachor	-	-	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>
BSM8-1 ETH ^{*c}	Stolice kojence z Keni – 6 měsíců	-	-	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>

* - typové oficiální kmeny

^a - Sbírka Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky

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

^c – ETH – Švýcarský federální technologický institut (Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich)

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

6.2 ANAEROTEST 23

V ANAEROTESTU 23 bylo testováno 54 kmenů druhu *B. longum* a 3 kmeny *B. pseudolongum*. Druh *B. longum* je znám pro svou schopnost utilizace velkého množství substrátů, což je patrné i z výsledků sestavených testem ANAERO 23 (tabulky č. 6, 7, 8, přílohy). Tudíž jsem se v této práci zaměřila hlavně na využití ureázy, která je více specifická. V Tab. č. 5 jsou uvedeny kmeny, které v testu reagovaly pozitivně – bylo prokázáno, že využívají ureázu. Testované poddruhy pocházely z různých ekologických nik, ale v rámci jednotlivých nik se schopnost využití ureázy různila. U izolátu pocházejících z dospělého člověka reagovalo 6 kmenů pozitivně z celkových 35 kmenů, z toho 5 kmenů ze střeva nebo stolice člověka na omnivorní stravě a jeden kmen ze stolice člověka na vegetariánské stravě. Dva kmeny z celkových 9 kmenů, pocházejících z kojenecké stolice reagovalo pozitivně. Žádný z testovaných kmenů, pocházející ze stolice dětí s Crohnovou chorobou neprojevil schopnost utilizace ureázy. Z 3 kmenů izolovaných z probiotických produktů, 2 kmeny prokázaly svou schopnost využít ureázu. Animální kmeny pocházely ze 4 různých hostitelů, ale pouze kmen pocházející z prasečích výkalů byl schopen zutilizovat ureázu. Počet kmenů, reagujících pozitivně i negativně, rozdělený podle jejich zdroje je uveden v grafu č. 1.

V testovaných kmenech byly zahrnuty 3 kmeny poddruhu *B. longum* subsp. *suis*, z toho 2 na ureázový test reagovaly pozitivně a 1 kmen poddruhu *B. longum* subsp. *suillum*, který reagoval negativně. Z 5 kmenů poddruhu *B. infantis* 2 byly schopny ureázu zutilizovat. U druhu *B. pseudolongum* reagovaly na ureázu všechny kmeny negativně.

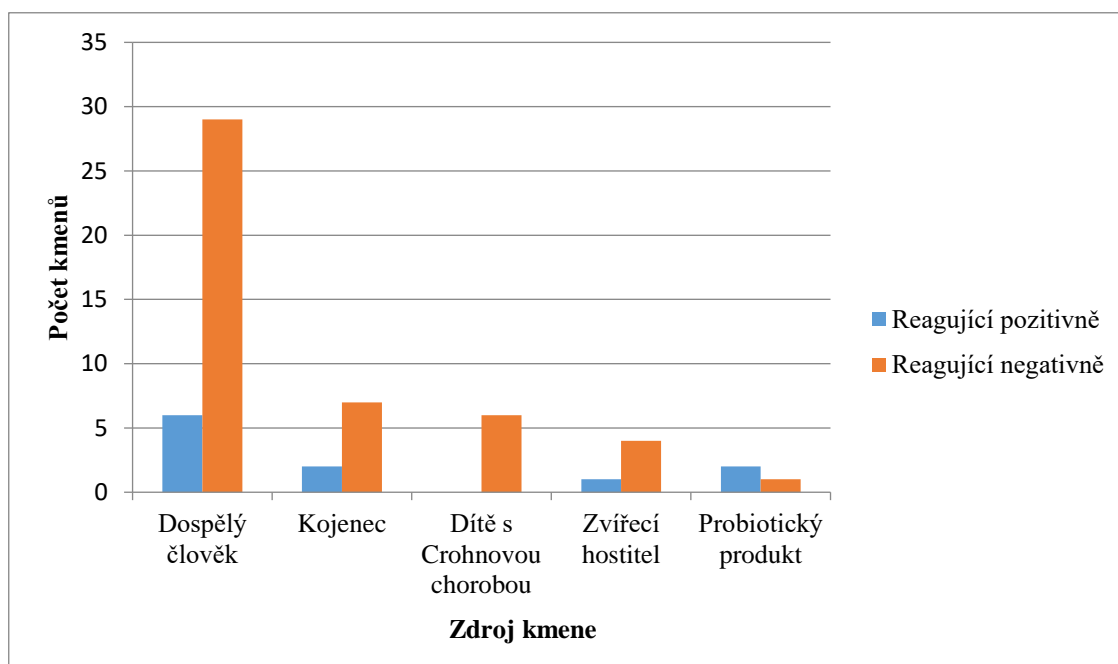
Ohledně ostatních sacharidových substrátů všechny kmeny fermentovaly laktózu, fruktózu, maltózu, glukózu a rafinózu. Sacharózu využily všechny kmeny kromě kmene BSM8-1 ETH, což je kontrolní kmen druhu *B. pseudolongum* subsp. *globosum*. Xylózu utilizovaly všechny kmeny kromě INF NUT (kojenecká výživa) a ATCC 17930 (stolice kojence). Galaktózu využívají všechny kmeny až na kmeny MB 7/4, MB 7/5, MB 7/6, pocházející ze stolice dospělého člověka a u nichž nebyla zjištěna přesná poddruhová identita. Ani jeden z testovaných kmenů nevyužívá indol. β -glukosidázu měli pozitivní bifidobakterie,

u nichž nebyl stanoven poddruh – kmeny MB 7/4, MB 7/5, MB 7/6, pocházejících ze stolice dospělého člověka a kmen INFNUT z kojenecké výživy a kmeny, identifikované jako *B. longum* subsp. *longum* - MB 10/4, MB 10/8, VB 1/3, vyizolované ze stolice dospělého člověka. Nitráty byly schopny využít pouze dva kmeny, a to MB 7/5 a DSM 20219, pocházejících z dospělého člověka. Rhamnózu využilo 5 kmenů poddruhu *B. longum* subsp. *longum* a jeden kmen poddruhu *B. longum* subsp. *infantis*. Manózu bylo schopno zutilizovat 12 kmenů, mezi nimi 9 poddruhů *B. longum* subsp. *longum*, 2 poddruhy *B. longum* subsp. *infantis* a 1 poddruh *B. longum* subsp. *suillum*. Sorbitol využilo 6 kmenů poddruhu *B. longum* subsp. *longum*, 5 pocházejících ze stolice dospělého člověka, 1 ze stolice kojence. Melezitózu využilo 28 kmenů z celkových 38 kmenů poddruhu *B. longum* subsp. *longum*, jeden kmen poddruhu *B. longum* subsp. *infantis* a žádný z kmenů poddruhů *B. longum* subsp. *suis* i *B. longum* subsp. *suillum*.

Tabulka č. 5 – Kmeny reagující na ureázu pozitivně

Kmen	Původ	Identifikováno jako
DSM 20219*	Střevo dospělého člověka	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 5/3	Stolice dospělého člověka	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
MB 7/4	Stolice dospělého člověka	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum/infantis</i>
MB 7/5	Stolice dospělého člověka	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum/infantis</i>
MB 7/6	Stolice dospělého člověka	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum/infantis</i>
VB 1/3	Stolice dospělého člověka - vegetariánská strava	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
INF NUT	Kojenecká výživa	neidentifikováno
Biopron Junior	Probiotický produkt	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>
47 ETH*	Stolice kojence z Keňi – 6 měsíců	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>
DSM 20211*	Prasečí výkaly	<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>
43 ETH*	Stolice kojence z Keňi – 6 měsíců	<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>

Graf č. 1 - Počet pozitivně a negativně reagujících kmenů na ureázu



7. Diskuze

Cílem této práce byla poddruhová identifikace 58 kmenů *Bifidobacterium longum*, izolovaných z různých prostředí a následné zhodnocení jejich sacharidových preferencí pro jednotlivé poddruhy. Identifikace bifidobakterií je důležitá, jelikož v potravinářském průmyslu je často potřeba pouze určitý druh. Navíc některé funkční vlastnosti požadované pro probiotické mikroorganismy jsou často druhově/ poddruhově či kmenově specifické (Hill a kol., 2014). Poddruhově specifická PCR byla provedena za použití dvou sad poddruhově specifických primerů pro identifikaci poddruhů *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* (Roy a Sirois, 2000). Specifčnost primerů byla kontrolována pomocí DNA, extrahované z typových kmenů se známou poddruhovou identitou. Do testu byly zařazeny nejen tyto dva uvedené poddruhy, ale i *B. longum* subsp. *suis* a *B. longum* subsp. *suillum* a 3 kmeny druhu *B. pseudolongum*. Podle výsledků této práce souhlasíme s Royem a Siroisem, že tyto primery jsou užitečné pro rozlišení poddruhů *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis*, jelikož u všech typových kmenů poddruhů *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* vyšla PCR pro daný poddruh pozitivně a pro testové kmeny druhu *B. pseudolongum* vyšla PCR v obou případech negativně. Specifitu primerů však nemůžeme potvrdit, jelikož na sadu primerů pro *B. longum* subsp. *longum* reagovaly pozitivně všechny typové kmeny *B. longum* subsp. *suis* a typový kmen DSM 28597 poddruhu *B. longum* subsp. *suillum* reagoval pozitivně jak na sadu primerů pro identifikaci *B. longum* subsp. *longum*, tak pro sadu primerů *B. longum* subsp. *infantis*. Toto zjištění odpovídá faktu, že tyto primery byly navrženy více jak před 20ti lety (Matsuki a kol., 1999) a mezitím došlo k rozšíření a taxonomické reklasifikaci daného druhu (Yanokura a kol., 2015). Navíc některé testované lidské izoláty nebylo možné poddruhově těmito specifickými primery identifikovat anebo naopak měly pozitivní výsledek pro oba poddruhy.

Podle Mattarelliho a kol. (2008) se *B. longum* subsp. *longum* vyskytuje ve stolici dospělých lidí a kojenců, výkalech telat, lidské vagíně a v odpadních vodách. *B. longum* subsp. *infantis* se nachází ve stolici kojenců, stolici sajících telat a v lidské vagíně. Je pravděpodobné, že u kmenů MB 7/4, MB 7/5, MB 7/6 pocházejících ze stolice dospělého člověka na omnivorní stravě, u nichž vyšly obě PCR pozitivní, se bude jednat o poddruh *B. longum* subsp. *longum*, jelikož kmen *B. longum* subsp. *infantis* u dospělých lidí nebyl objeven. Toto tvrzení bylo prokázáno i v naší PCR identifikaci, jelikož žádný z kmenů pocházející z dospělého člověka se neprokázal jako poddruh *B. longum* subsp. *infantis*.

U kmenů MB 7/4, MB 7/5, MB 7/6 vyšly stejné pozitivní výsledky obou PCR jako u typového kmene druhu *B. longum* subsp. *suillum*, ale jelikož byl tento poddruh nalezen pouze ve zvířecích zdrojích, pravděpodobně se nejedná o tentýž poddruh.

Cílem testu ANAERO 23 bylo stanovit schopnost různých poddruhů druhu *B. longum* pocházejících z rozdílných ekologických nik degradovat sacharidové substráty a na základě výsledků porovnat substrátovou preferenci daných kmenů. V testu ANAERO 23 bylo testováno celkem 57 vzorků, pocházejících ze zvířecích, lidských a potravinových zdrojů.

Liu a kol. (2015) uvádí, že četnost bifidobakterií souvisí se zdravím hostitele. Tyto bakterie jsou dominantní ve střevech kojenců a v dospělém věku se jejich četnost snižuje, což je zapříčiněno změnou stravy.

Bifidobakterie jsou schopny využít širokou škálu substrátů včetně mono-, oligo- a polysacharidů a využít tak uhlík jako zdroj energie (Vernazza a kol., 2006). Převážná část jejich genomu je soustředěna na využití uhlíkových zdrojů. Poddruh *B. longum* subsp. *longum*, který se vyskytuje z velké části u dospělých lidí je dobře vybavený pro degradaci polysacharidů rostlinného původu. Poddruh *B. longum* subsp. *infantis*, vyskytující se u kojenců, je specializován hlavně na využití oligosacharidů mateřského mléka (Bunešová a kol., 2016). Hlavní složkou mateřského mléka je laktóza. Primárními komponenty oligosacharidů mléka jsou kyselina sialová, fukóza, N-acetylglukosamin, fukóza, galaktóza a glukóza (Ninonuevo a kol, 2006).

Sakata a kol. (2002) testovali kmeny poddruhů *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *suus* na utilizaci několika sacharidových substrátů. Využití L-arabinózy zaznamenali u všech kmenů poddruhů *B. longum* subsp. *longum* i *B. longum* subsp. *suus*, což naopak neprokázal žádný z kmenů poddruhu *B. longum* subsp. *infantis*. Náš pokus u kmenů *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *suus* vyšel v souladu s pokusem Sakaty a kol., tedy všechny kmeny reagovaly na arabinózu pozitivně. U poddruhu *B. longum* subsp. *infantis* vyšla fermentace arabinózy u dvou kmenů pozitivně, u tří negativně. Důvodem, proč všechny kmeny *B. longum* subsp. *longum* jsou schopny využít L-arabinózu a u poddruhu *B. longum* subsp. *infantis* jen menšina, může být rostlinná strava u dospělých a mléčná výživa u kojenců, jelikož se arabinóza vyskytuje v rostlinné potravě.

Podle výsledků Lauera a Kandlera (1983) je melezitóza sacharidový vzor podle jejíž schopnosti utilizace jde rozlišit *B. longum* subsp. *longum*/ *B. longum* subsp. *suus* od *B. longum* subsp. *infantis*. Pro *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *suus* je charakteristická utilizace melezitózy, kterou naopak neumí využít *B. longum* subsp. *infantis*. Sakata a kol.

(2002) toto tvrzení svým pokusem vyvrátili, jelikož v jejich pokusu kmeny *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* projevily ohledně melezitózy sacharidovou rozmanitost a poddruh *B. longum* subsp. *suis* reagoval negativně. V našem pokusu reagovalo 28 z celkových 38 kmenů *B. longum* subsp. *longum* pozitivně, 1 z 5 kmenů poddruhu *B. longum* subsp. *infantis* a žádný kmen z poddruhů *B. longum* subsp. *suis* a *B. longum* subsp. *suillum*. Náš výsledek vyšel v souladu s pokusem Sakaty a kol., tedy že podle utilizace melezitózy nelze odlišit *B. longum* subsp. *longum*/ *B. longum* subsp. *suis* od *B. longum* subsp. *infantis*. Nicméně, pro odlišení *B. longum* subsp. *infantis* se jeví jako možná schopnost utilizace fukózy tímto poddruhem (Schwab a kol., 2017).

Ureáza hraje důležitou roli při novorozeneckém vývoji. Močovina obsažená v lidském mléce vyrovnává nedostatek koncentrace bílkovin pro potřebu dusíku nejen pro kojence, ale i pro střevní bakterie. Nedávná studie rozdělila poddruh *B. longum* subsp. *suis* na dva podtypy podle schopnosti využití ureázy. Podle této studie je *B. longum* subsp. *suis* ureáza pozitivní, zatímco *B. longum* subsp. *suillum* ureáza negativní (Yanokura a kol., 2015). V této práci byly testovány 3 izoláty poddruhu *B. longum* subsp. *suis*, z nichž 2 byly schopny zutilizovat ureázu. Tvrzení, že *B. longum* subsp. *suis* utilizuje ureázu, se nepodařilo zcela potvrdit. U poddruhu *B. longum* subsp. *suillum* byl testován 1 typový kmen, který prokázal ureázu negativní. Tento výsledek vyšel v souladu s tvrzením Yanokury a kol. Nicméně v našem testu byly zařazeny dva izoláty *B. longum* subsp. *suis* izolované z výkalů telat na mléčné výživě (Vlková a kol., 2010; Bunešová a kol., 2012) a tento kmen nevykazoval ureázovou aktivitu na rozdíl od typového kmene *B. longum* subsp. *suis* DSM 20211 a izolátu u afrického kojence 43 ETH. Tudíž ureázová aktivita není dostatečný faktor pro poddruhové rozdělení na *B. longum* subsp. *suis* a *B. longum* subsp. *suillum*. Tato aktivita spíše odráží vliv diety hostitele, ze kterého byl daný kmen izolován. Ureázovou aktivitu se nám podařilo detekovat u poddruhů *B. longum* subsp. *suis*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis*.

Výsledky této bakalářské práce prokázaly úzkou genetickou příbuznost mezi těmito poddruhy a obtížnost rozlišit tyto poddruhy podle jejich sacharidové preference. Nicméně substrátové preference a rozdíly testovaných kmenů poukazují na jejich původ a dietní zvyklosti hostitelů.

8. Závěr

Několik vědeckých studií prokázalo, že lze jednotlivé poddruhy *B. longum* rozlišit podle schopnosti utilizace některých substrátů. V této práci se neprokázal mezi poddruhy významný rozdíl v utilizaci substrátů, podle něhož by se dal určit konkrétní poddruh, jelikož kmeny v rámci jednoho poddruhu projevily u většiny substrátů sacharidovou rozmanitost. Na základě výsledků své bakalářské práce tudíž nemohu stanovit přesnou spojitost mezi jednotlivými poddruhy a jejich sacharidovými vzory.

Při identifikaci poddruhů pomocí PCR se podařilo identifikovat a odlišit některé izoláty poddruhu *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis*. Nicméně bylo zjištěno, že použité primery nejsou plně specifické, jelikož s nimi pozitivně reagovalo více poddruhů. Navíc ureázová aktivita byla shledána jako nedostatečná pro odlišení podruhu *B. longum* subsp. *suis* a *B. longum* subsp. *suillum*. Tato aktivita spíše odráží původ kmenů a dietu hostitele a potvrzuje stanovenou hypotézu.

9. Seznam použité literatury

- Biavati, B., Scardovi, V., Moore, W.E.C., 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of 4 new species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32: 358 – 373.
- Bahaka, D., Neut, C., Khattabi, A., Monget, D., Gavini, F., 1993. Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium breve*. *Int J Syst Bacteriol* 43, 565–573.
- Bunešová, V., Domig, K. J., Killer, J., Vlková, E., Kopečný, J., Mrázek, J., Ročková, Š., Rada, V. 2012a. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe*, 18, 166-168.
- Bunesova V., Lacroix C., Schwab C. 2016. Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium kashiwanohense*. *BMC Microbiol*. 16:248. 10.1186/s12866-016-0867-4.
- Bunesova, V., Musilova, S., Geigerova, M., Pechar, R., Rada, V., 2015. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *Journal of Microbiological Methods* 109, 106-109.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Killer, J., Musilová, Š. 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*.
- D'Aimmo, M.R., Modesto, M., Mattarelli, P., Biavati, B., Andlid, T., 2014. Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. *Anaerobe* 30, 169-177.
- Dong, X. Z., Xin, Y.H., Jian, W.Y., Liu, X.L. and Ling, D.W., 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 119-125.
- Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. 2010. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:1604–1613.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Dicks, L.M.T., 2010. *Anaerobe* 16, 590-596.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Schumann, P., Pukall, R., Dicks, L.M.T., 2012. *Systematic and Applied Microbiology* 35, 92-97.
- Felis, G. E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8 (2), s. 4461.

- Genus *Bifidobacterium* [online]. [cit. 2017-02-08]. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Dostupné z WWW: <www.bacterio.net/bifidobacterium.html>.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401 – 1412.
- Gomes M. P., Malcata F. X. 1999. *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and technology* 10: 139-157.
- Hawkins, S.M., 1993. Bifidobacteria in dairy products. *Cult. Dairy Prod. J.* 28, 16–20.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 11, 506-514.
- Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., 2012. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, 482 s.
- Lauer, E., Kandler, O. 1983. DNA-DNA homology, murein types, and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium* *Syst Appl Microbiol* 4, 42-64.
- Leahy. S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D., 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1303-1315.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. 2015. *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). Boston, MA: Pearson Education.
- Matsuki, T., K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda, and H. Oyaizu. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4506–4512.
- Mattarelli P., Bonaparte C., Pot B., Biavati B. 2008: Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. *nov.*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. *nov.* and *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. *nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 58: 767-772.
- Michelini, S., Modesto, M., Filippini, G., Spiezio, C., Sandri, C., et al., 2016a. *Systematic and Applied Microbiology* 39, 229-236.

- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek*. 73: 127-141.
- Ninonuevo, M. R., Park, Y., Yin, H., Zhang, J., Ward, R. E., Clowers, B. H., 2006. A strategy for annotating the human milk glycome. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 7471-7480.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002. *Microbiology*, 5th edition. McGraw-Hill Companies. New York,. 324-340.
- Rada, V. and Petr, J., 2002 Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Veterinarni medicina* 47:1-4.
- Reuter, G. 1963. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl Bakteriol Orig* 191, im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl Bakteriol Orig* 191, 486–507.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F a Stanton, C., 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 149: 88-105.
- Sakata, S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyamam M., and Benno, Y. 2002. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1945–1951.
- Satokari R. M., Vaughan E. E., Akkermans A. D. L., Saarela M., de Vos W. M. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 504-513.
- Scardovi V. 1986. Genus *Bifidobacterium* Orla – Jensen 1924. In: Sneath P.H.A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J.G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2. Williams and Wilkins, Baltimore. 1418 – 1434.
- Schell M. A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M. C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore R. D., Arigoni F. 2002. Genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *PNAS*. 99(22): 14422-14427.
- Schwab, C., Ruscheweyh, H.J., Bunesova, V., Pham, V.T., Beerenwinkel, N., Lacroix, C., 2017. Trophic interactions of infant bifidobacteria and eubacterium hallii during L-fucose and fucosyllactose degradation. *Frontiers in Microbiology* 8.

- Szczuka, E., and A. Kaznowski. 2004. Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42:220-228.
- Ventura, M., Sinderen, D. van, Fitzgerald, F. G., Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86. 205- 223.
- Vernazza, C. L., G. R. Gibson, and R. A. Rastall. 2006. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *J. Appl. Microbiol.* 100:846–853.
- Vlkova, E., Grmanova, M., Killer, J., Mrazek, J., Kopecny, J., Bunesova, V., Rada, V., 2010. Survival of *Bifidobacteria* Administered to Calves. *Folia Microbiologica* 55, 390-392.
- Vlková, E., Salmonová, H., Bunešová, V., Geigerová, M., Rada, V., Musilová, T., 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* 34, 27-33.
- Ward, P., Roy, D.: Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. 2005. *Lait* 85, 23-32.
- Yanokura, E., Oki, K., Makino, H., Modesto, M., Pot, B., Mattarelli, P., Biavati, B., Watanabe, K., 2015. Subspeciation of *Bifidobacterium longum* by multilocus approaches and amplified fragment length polymorphism: Description of *B. longum* subsp. *suillum* subsp. nov., isolated from the faeces of piglets. *Systematic and Applied Microbiology* 38, 305-314.

Použité obrázky

- *Polymerase Chain Reaction* (PCR) [online]. [cit. 2017-02-25]. Applied Biological Materials (ABM) Inc. Dostupné z WWW: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php#6.
- ANAERO test 23 [online]. [cit. 2017-03-12]. RIDACOM. Dostupné z WWW: <http://www.ridacom.com/en/products/view/6114>.

10. Přílohy

Tabulka č. 6 – Výsledky 1. řádku testu ANAERO23

Kmen	Substrát							
	URE	MLZ	LAC	GAL	FRU	MLT	GLU	IND
DSM 20219	+	+	+	+	+	+	+	-
TP1	-	+	+	+	+	+	+	-
36 ETH	-	+	+	+	+	+	+	-
MB 1/2	-	+	+	+	+	+	+	-
MB 1/6	-	+	+	+	+	+	+	-
MB 1/10	-	+	+	+	+	+	+	-
MB 2/5	-	*	+	+	+	+	+	-
MB 2/10	-	+	+	+	+	+	+	-
MB 3/1	-	+	+	+	+	+	+	-
MB 5/3	+	-	+	+	+	+	+	-
MB 5/9	-	-	+	+	+	+	+	-
MB 5/10	-	-	+	+	+	+	+	-
MB 6/7	-	-	+	+	+	+	+	-
MB 6/8	-	-	+	+	+	+	+	-
MB 7/4	*	-	+	-	+	+	+	-
MB 7/5	+	-	+	-	+	+	+	-
MB 7/6	*	-	+	-	*	+	+	-
MB 10/4	-	+	+	+	+	+	+	-
MB 10/8	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 1/3	+	-	+	+	+	+	+	-
VB 1/7	-	-	+	+	+	+	+	-
VB 2/3	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 3/5	-	-	+	+	+	+	+	-
VB 3/9	-	-	+	+	+	+	+	-
VB 4/3	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 4/5	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 5/7	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 5/10	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 6/1	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 6/12	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 7/6	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 8/1	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 8/8	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 9/2	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 9/6	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 9/12	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 10/4	-	+	+	+	+	+	+	-
VB 10/5	-	+	+	+	+	+	+	-
INF NUT	+	-	+	+	+	+	+	-

Nutra Bona	-	+	+	+	+	+	+	-
ATCC 17930	-	-	+	+	+	+	+	-
Biopron Junior	+	-	+	+	+	+	+	-
13 w	-	-	+	+	+	+	+	-
13 y	-	-	+	+	+	+	+	-
47 ETH	*	+	+	+	+	+	+	-
MP 1	-	-	+	+	+	+	+	-
MP 2	-	-	+	+	+	+	+	-
MP 3	-	+	+	+	+	+	+	-
MP 4	-	-	+	+	+	+	+	-
MP 8	-	+	+	+	+	+	+	-
MP 10	-	+	+	+	+	+	+	-
DSM 28597	-	-	+	+	+	+	+	-
022 II	-	-	+	+	+	+	+	-
DSM 20211	+	-	+	+	+	+	+	-
43 ETH	+	-	+	+	*	+	+	-
DSM 20099	-	-	+	+	*	+	+	-
DSM 20092	-	-	+	+	+	+	+	-
BSM8-1 ETH	-	-	+	+	+	+	+	-

Vysvětlivky:

(+) - pozitivní reakce, (-) - negativní reakce, (*) – reakce slabě pozitivní po 48 hod.

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

Tabulka č. 7 - Výsledky 2. řádku testu ANAERO23

Kmen	Substrát							
	bGL	NAG	RHA	MAN	TRE	SAL	SUC	NIT
DSM 20219	-	-	-	*	+	*	+	+
TP1	-	-	-	-	-	*	+	-
36 ETH	-	-	+	+	+	+	+	-
MB 1/2	-	-	*	*	*	*	+	-
MB 1/6	-	-	-	-	-	-	+	-
MB 1/10	-	-	-	-	-	-	+	-
MB 2/5	-	-	*	*	+	+	+	-

MB 2/10	-	-	-	*	+	+	+	-
MB 3/1	-	-	+	+	+	+	+	-
MB 5/3	-	-	-	-	-	*	+	-
MB 5/9	-	-	-	-	*	*	+	-
MB 5/10	-	-	-	*	+	*	+	-
MB 6/7	-	*	-	-	*	*	+	-
MB 6/8	-	*	-	-	*	*	+	-
MB 7/4	+	+	-	-	-	+	+	-
MB 7/5	+	+	-	-	-	+	+	+
MB 7/6	+	+	-	-	-	+	+	-
MB 10/4	-	-	-	-	+	+	+	-
MB 10/8	*	-	-	-	-	+	+	-
VB 1/3	+	-	-	-	+	-	+	-
VB 1/7	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 2/3	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 3/5	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 3/9	-	-	+	-	-	+	+	-
VB 4/3	-	-	-	-	+	-	+	-
VB 4/5	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 5/7	-	-	-	-	+	-	+	-
VB 5/10	-	-	-	-	+	+	+	-
VB 6/1	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 6/12	-	-	-	-	-	+	+	-
VB 7/6	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 8/1	-	-	-	*	-	+	+	-
VB 8/8	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 9/2	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 9/6	-	-	-	-	+	-	+	-
VB 9/12	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 10/4	-	-	-	-	-	-	+	-
VB 10/5	-	-	-	+	+	*	+	-
INF NUT	+	+	-	-	-	+	+	-
Nutra B	-	-	-	-	-	+	+	-
ATCC 17930	-	-	-	-	+	+	+	-
Biopron Junior	-	-	-	+	+	+	+	-
13 w	-	-	-	-	*	+	+	-
13 y	-	-	-	-	-	+	+	-
47 ETH	-	-	*	*	*	*	+	-
MP 1	-	-	-	-	-	-	+	-
MP 2	-	-	-	-	-	-	+	-
MP 3	-	-	-	-	-	-	+	-
MP 4	-	+	-	-	-	-	+	-
MP 8	-	*	-	-	*	-	+	-
MP 10	-	-	-	-	-	-	+	-
DSM	-	-	-	*	*	*	+	-

28597								
022 II	-	-	-	-	-	-	+	-
DSM 20211	-	-	-	-	-	*	+	-
43 ETH	-	-	-	-	-	-	+	-
DSM 20099	-	-	-	-	-	+	+	-
DSM 20092	-	-	-	-	-	-	+	-
BSM8-1 ETH	-	-	-	-	-	-	-	-

Vysvětlivky:

(+) - pozitivní reakce, (-) - negativní reakce, (*) – reakce slabě pozitivní po 48 hod.

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

Tabulka č. 8 - Výsledky 3. řádku testu ANAERO23

Kmen	Substrát							
	CON	SOR	ARA	XYL	CEL	RAF	MNS	ESL
DSM 20219	-	-	+	+	-	+	-	-
TP1	-	-	+	+	-	+	+	-
36 ETH	-	+	+	+	+	+	+	-
MB 1/2	-	-	+	+	*	+	+	-
MB 1/6	-	-	+	+	-	+	+	-
MB 1/10	-	-	+	+	-	+	+	-
MB 2/5	-	+	+	+	+	+	+	+
MB 2/10	-	+	+	+	+	+	+	+
MB 3/1	-	-	+	+	-	+	-	-
MB 5/3	-	-	+	+	-	+	+	-
MB 5/9	-	-	+	+	*	+	-	-
MB 5/10	-	-	+	+	*	+	+	-
MB 6/7	-	-	+	+	-	+	-	+
MB 6/8	-	-	+	+	-	+	-	+
MB 7/4	-	-	+	+	+	+	-	+
MB 7/5	-	-	+	+	+	+	+	+
MB 7/6	-	-	+	+	+	+	-	+
MB 10/4	-	-	+	+	-	+	-	+
MB 10/8	-	+	+	+	-	+	+	+
VB 1/3	-	-	+	+	-	+	+	-
VB 1/7	-	-	+	+	-	+	*	-
VB 2/3	-	-	+	+	-	+	-	-
VB 3/5	-	-	+	+	-	+	+	+

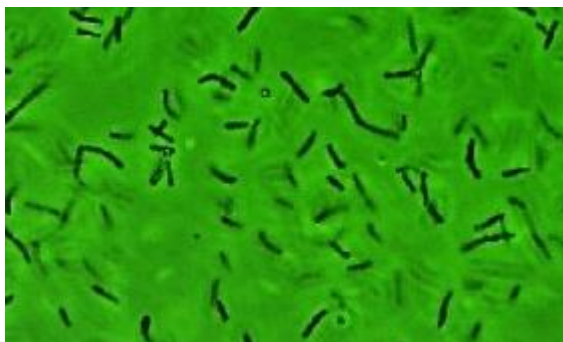
VB 3/9	-	-	+	+	-	+	+	+
VB 4/3	-	-	+	+	-	+	+	+
VB 4/5	-	-	+	+	-	+	-	*
VB 5/7	-	-	+	+	+	+	-	+
VB 5/10	-	-	+	+	-	+	-	+
VB 6/1	-	-	+	+	-	+	-	-
VB 6/12	-	+	+	+	-	+	+	*
VB 7/6	-	-	+	+	-	+	+	-
VB 8/1	-	-	+	+	-	+	+	-
VB 8/8	-	-	+	+	-	+	+	-
VB 9/2	-	-	+	+	-	+	+	-
VB 9/6	-	-	+	+	-	+	+	-
VB 9/12	-	-	+	+	*	+	+	*
VB 10/4	-	-	+	+	-	+	-	*
VB 10/5	-	+	+	+	-	+	-	*
INF NUT	-	-	-	-	-	+	+	+
Nutra B	-	-	+	+	-	+	+	-
ATCC 17930	-	-	-	-	-	+	+	-
Biopron J	-	-	+	+	+	+	+	-
13 w	-	-	-	+	*	+	+	-
13 y	-	-	-	+	*	+	+	-
47 ETH	-	-	+	+	*	+	+	-
MP 1	-	-	+	+	*	+	+	-
MP 2	-	-	+	+	-	+	+	-
MP 3	-	-	+	+	-	+	*	-
MP 4	-	-	+	+	-	+	+	-
MP 8	-	-	+	+	-	+	+	*
MP 10	-	-	+	+	-	+	-	-
DSM 28597	-	-	+	+	*	+	+	-
022 II	-	-	+	+	-	+	+	-
DSM 20211	-	-	+	+	-	+	+	+
43 ETH	-	-	+	+	-	+	+	-
DSM 20099	-	-	+	+	-	+	*	-
DSM 20092	-	-	+	+	-	+	-	-
BSM8-1 ETH	-	-	+	+	-	+	+	-

Vysvětlivky:

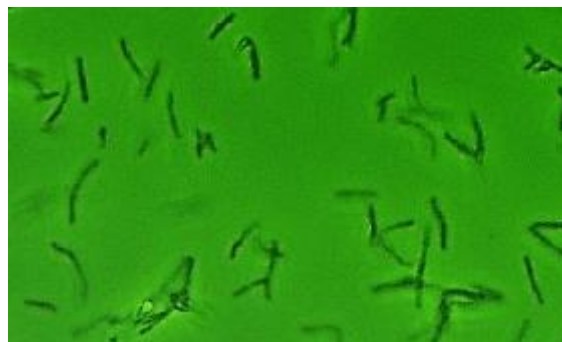
(+) - pozitivní reakce, (-) - negativní reakce, (*) – reakce slabě pozitivní po 48 hod.

CON – Kontrola rústu, SOR – Sorbitol, ARA – Arabinóza, XYL – Xylóza, CEL – Celobióza,
RAF – Rafinóza, MNS – Manóza, ESL – Eskulín

Seznam fotografií



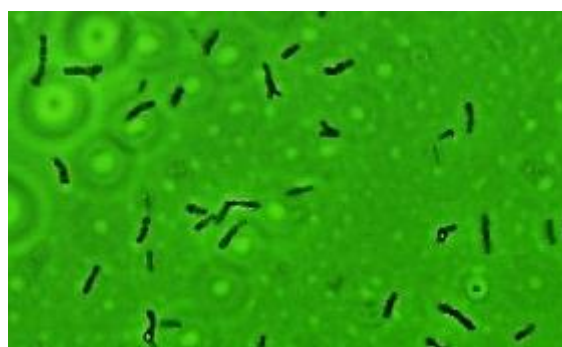
43 ETH



TP 1



36 ETH



MB 1/2



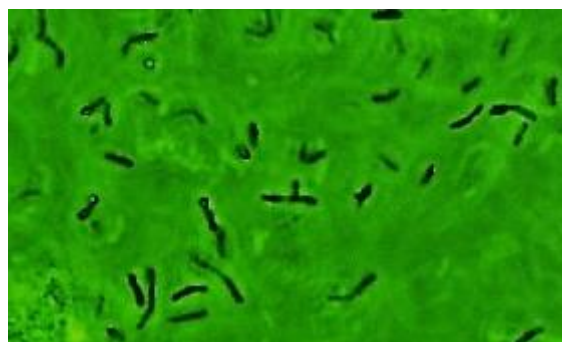
MB 1/6



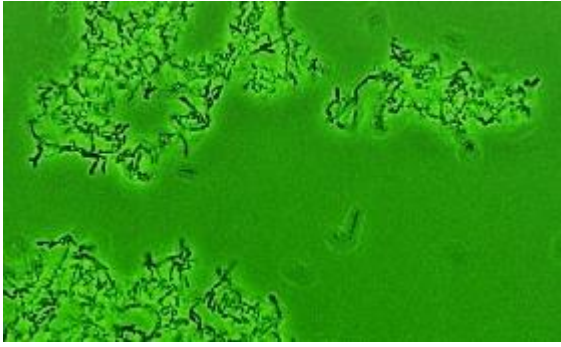
MB 1/10



MB 2/5



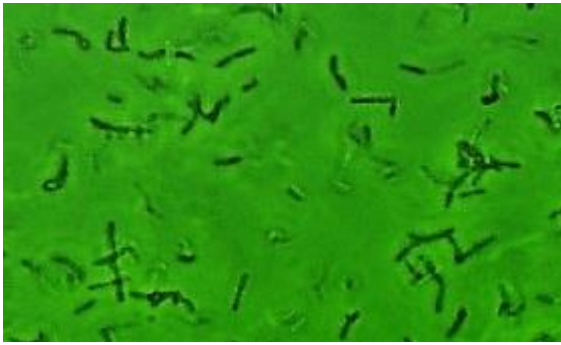
MB 5/3



MB 5/9



MB 7/4



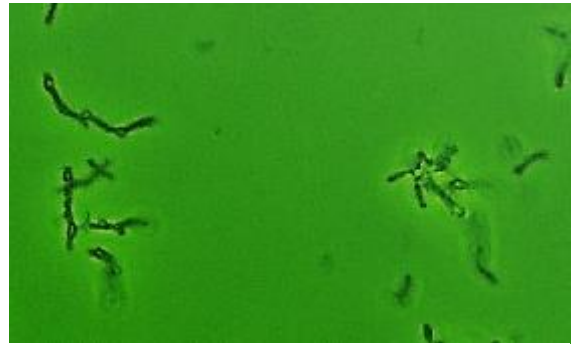
MB 7/6



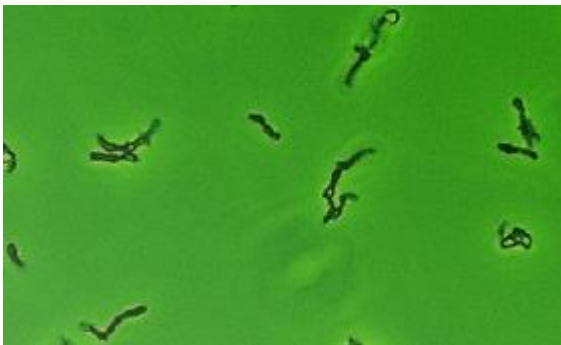
MB 10/4



VB 1/3



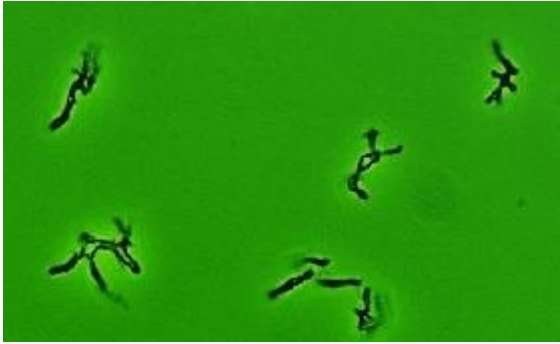
VB 1/7



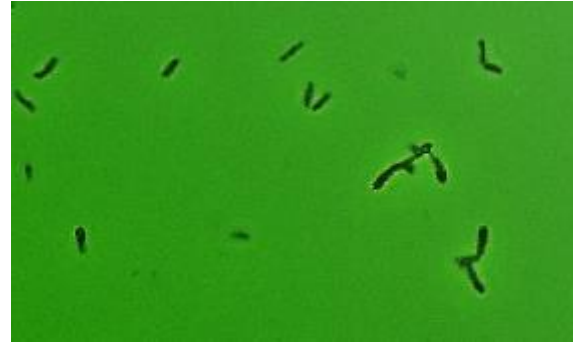
VB 2/1



VB 2/2



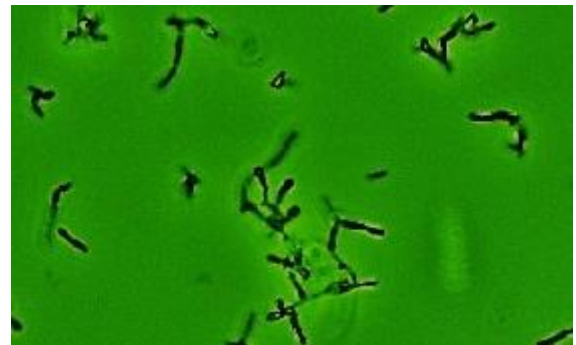
VB 3/5



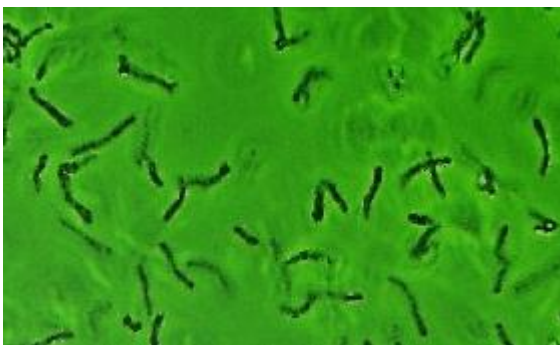
VB 4/3



VB 4/5



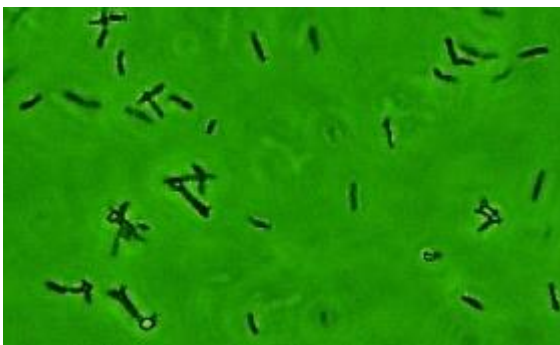
VB 5/10



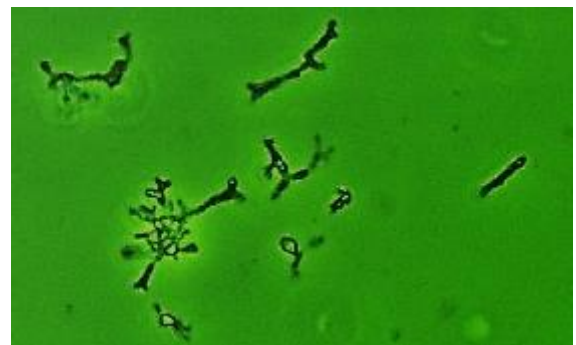
VB 6/1



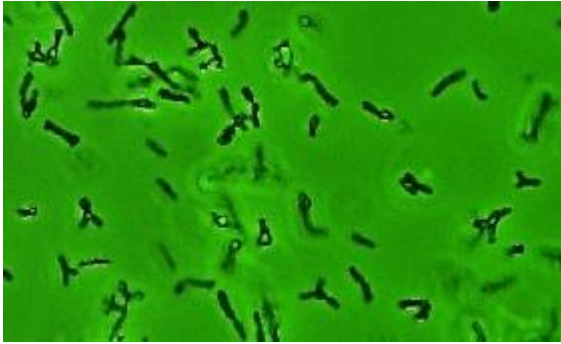
VB 7/6



VB 8/1



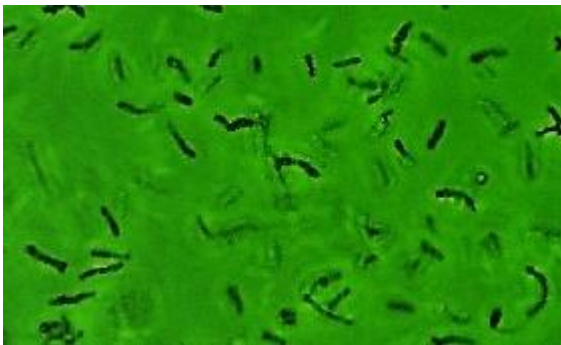
VB 8/8



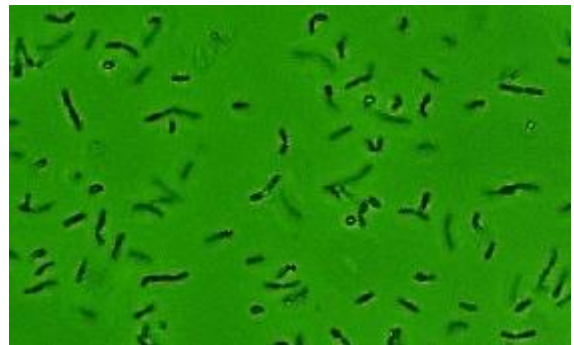
VB 9/2



VB 9/6



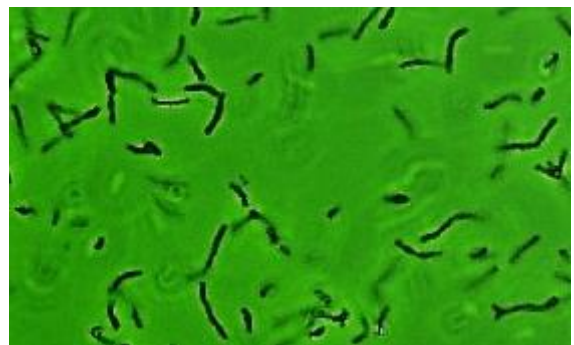
VB 9/12



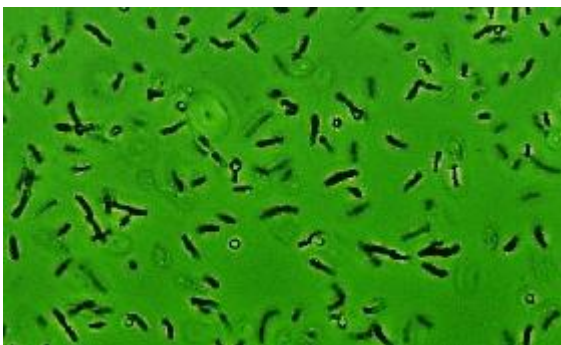
Nutra Bona



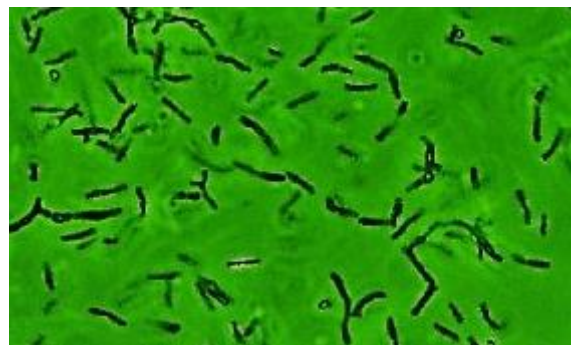
ATCC 17930



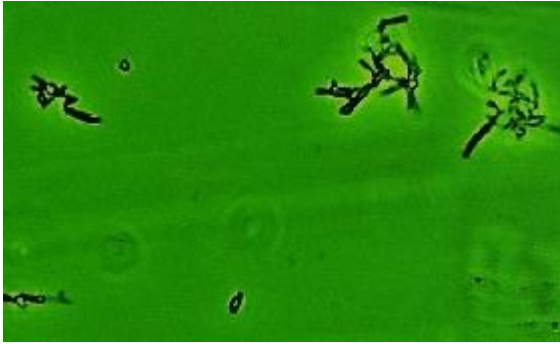
Biopron Junior



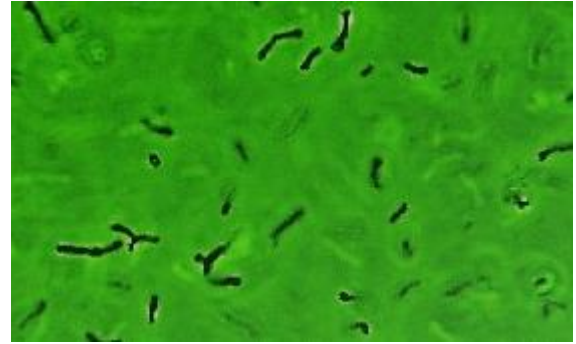
13 W



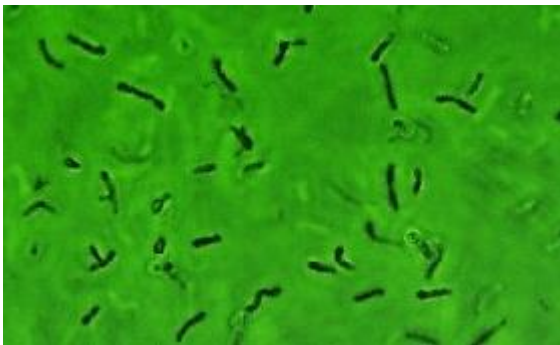
13 Y



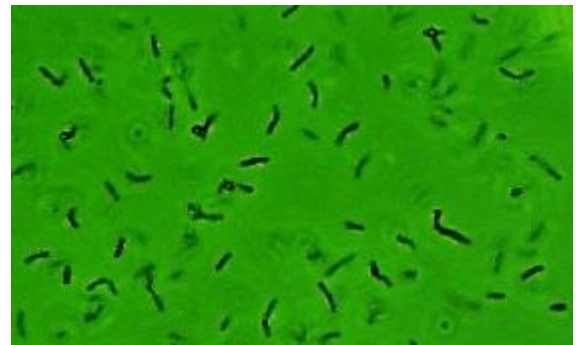
47 ETH



MP 1



MP 3



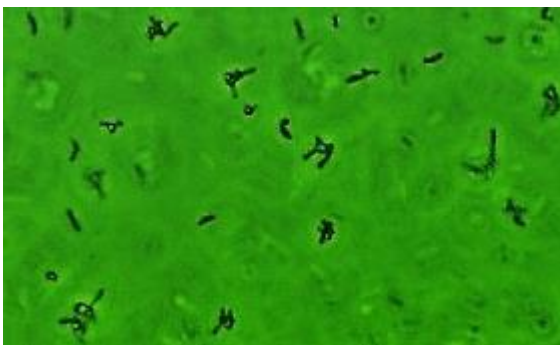
MP 4



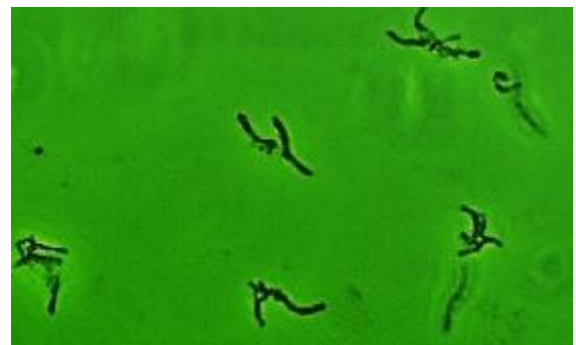
MP 8



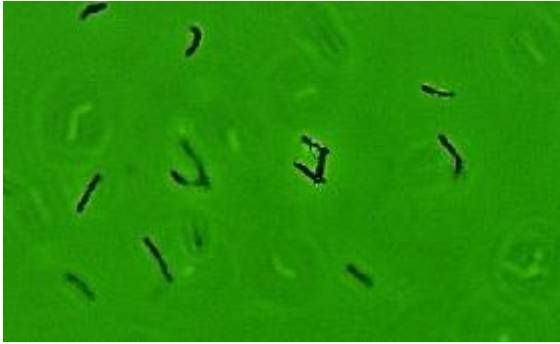
MP 10



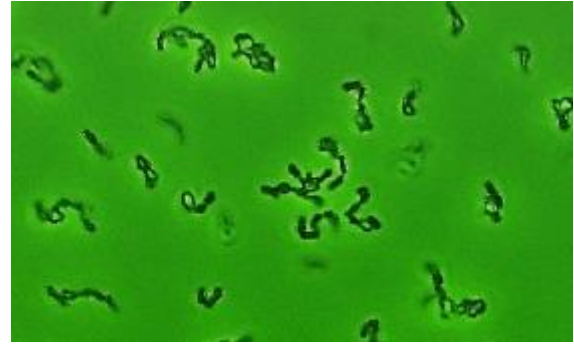
DSM 28597



5/9



022/II



DSM 20299



DSM 20092



BSM8-1 ETH