

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Popis nového druhu v rámci rodu *Bifidobacterium*

Bakalářská práce

**Adéla Andrášová
Výživa a potraviny (NUTRIB)**

Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci “Popis nového druhu v rámci rodu *Bifidobacterium*“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí 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 21.4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou chtěla upřímně poděkovat Ing. Nikol Modráčkové, Ph.D., vedoucí práce, za její neuvěřitelně cennou pomoc, podporu, trpělivost a odbornost při vedení mé bakalářské práce. Její ochota věnovat svůj čas a naslouchat mi byla pro mě neocenitelná a velmi si toho vážím. Dále bych ráda poděkovala Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí prostor, díky nimž jsem mohla provádět své analýzy. Ještě jednou děkuji všem, za jejich podporu, vstřícnost a ochotu pomoci.

Popis nového druhu v rámci rodu *Bifidobacterium*

Souhrn

Mikrobiální společenstva jsou definována jako seskupení mikroorganismů na určitém místě, u nichž dochází k jejich vzájemnému ovlivňování. Střevní mikrobiota se podílí nejen při tvorbě a stimulaci imunitního systému svého hostitele, ale i v udržení střevní homeostázy, ochraně před patogeny a rozkladu složek potravy. Běžnou součástí střevní mikrobioty bývají komenzální bifidobakterie, které se vyskytují v gastrointestinálním traktu většiny savců a hmyzu. Jejich značné zastoupení bylo detekováno zejména ve střevech primátů. Právě proto je střevní mikrobiota opic velký a velice pestrý ekosystém a je vhodná pro další zkoumání a hledání potenciálně nových druhů.

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit literární rešerši o dynamicky se rozvíjejícím rodu *Bifidobacterium* a o metodickém postupu při popisu jeho potenciálně nových druhů. Dále se v rámci praktické části také podílet na fenotypové a genotypové charakterizaci při popisu nového druhu. Tyto charakterizace byly provedeny u pěti vybraných bifidobakteriálních izolátů z novosvětských opic s potencionálem nového druhu.

Kmeny N50, N74, N97, N115 a GLT066 byly izolovány z tamarína sedlového (*Saguinus fuscicollis*), tamarína vousatého (*Saguinus imperator*), tamarína bělovousého (*Saguinus mystax*), tamarína žlutorukého (*Saguinus midas*) a lvička zlatého (*Leontopithecus rosalia*). Jejich příslušnost k *Bifidobacterium* spp. byla potvrzena detekcí fruktóza-6-fosfátfosfoketolázy a sekvenací genu 16S rRNA. U všech izolátů bylo dále prokázáno, že patří do skupiny Gram-pozitivních bakterií. V rámci morfologické analýzy byly shledány jako nepohyblivé, nesporulující, nepravidelné tyčinky variabilních tvarů. Konkrétně buňky kmenů N50, N74, N97 a GLT066 vykazovaly typicky bifidní tvar tyčinek, byly krátké nebo dlouhé, na konci zaoblené, tvaru V a Y, zatímco kmen N115 měl buňky stočené do klubíček. Kultivační znaky byly u všech kmenů jednotné. Kolonie vykultivované na povrchu agaru byly bílé, hladké, lesklé a kruhové s celistvými okraji, zatímco kolonie rostoucí v agaru byly bílé, drobné, čokovité nebo eliptické. V rámci testování fyziologických znaků byly kmeny N115 a GLT066 shledány jako striktně anaerobní, zatímco kmeny N50, N74 a N97 byly schopny růst i za mikroaerofilních podmínek. Z hlediska vztahu k teplotě byla pro všechny kmeny bifidobakterií jako optimální teplota růstu stanovena 37 °C. Konkrétně kmeny N50 a N97 velmi dobře rostly za rozpětí teplot 30–46 °C a kmen N74 při 30–37 °C, zatímco kmeny N115 a GLT066 pouze při teplotě 37 °C. Z hlediska vztahu k pH byla jako optimální hodnota pro všechny kmeny stanovena hodnota 6,5. Kmen N50 velmi dobře rostl v rozmezí pH 6,0–9,0, kmen N74 v pH 6,5–9,0 a kmen GLT066 v pH 6,0–7,5, zatímco kmeny N97 a N115 rostly dobře pouze při hodnotě pH 6,5. Výjimku při testování představoval kmen N115. Pro jeho další charakterizace tedy bude nezbytné jeho otestování znovu i ve větších objemech za stabilnějších podmínek.

U všech analyzovaných kmenů byly potvrzeny převážně typické bifidobakteriální vlastnosti. Do budoucna budou provedeny ještě další analýzy dle doporučených minimálních standardů pro popis nového taxonu, které jsou nezbytné pro popis nového druhu bifidobakterie.

Klíčová slova: mikrobiom, kultivace, bifidobakterie, fenotypová a genotypová charakterizace

Description of new species of the genus *Bifidobacterium*

Summary

Microbial communities are defined as assemblages of microorganisms in a particular location that interact with each other. The gut microbiota is involved not only in the maturation and stimulation of the host's immune system, but also in maintaining intestinal homeostasis, protection against pathogens, and the breakdown of food components. A common component of the gut microbiota is the commensal bifidobacteria found in the gastrointestinal tract of most mammals and insects. Their significant abundance has been detected especially in the intestines of primates. Thus, the gut microbiota of monkeys, a large and highly diverse ecosystem, is suitable for further investigation and a search for potentially novel species.

The aim of this thesis was to create a literature search on the dynamically developing genus *Bifidobacterium* and on the methodological approach to describe its potentially novel species. Then to participate in the phenotypic and genotypic characterization in the description of the new species as part of the practical part. These characterizations were performed on five selected *Bifidobacterium* isolates from New World monkeys with new species potential.

Strains N50, N74, N97, N115 and GLT066 were isolated from brown-mantled tamarin (*Saguinus fuscicollis*), emperor tamarin (*Saguinus imperator*), moustached tamarin (*Saguinus mystax*), golden-handed (*Saguinus midas*) and golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). Their affiliation to *Bifidobacterium* spp. was confirmed by the detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase and 16S rRNA gene sequencing. All isolates were further shown to belong to the group of Gram-positive bacteria. In morphological analysis, they were found to be immobile, non-sporulating, irregular rods of variable shapes. In particular, the cells of strains N50, N74, N97 and GLT066 showed typical bifid rod shapes, short or long, rounded at the end, V- and Y-shaped, while strain N115 had cells curled into a skein. The culture characteristics were uniform in all strains. Colonies cultured on the agar surface were white, smooth, glossy and circular with entire edges, whereas colonies growing in agar were white, small, lenticular or elliptical. In physiological trait testing, strains N115 and GLT066 were found to be strictly anaerobic, while strains N50, N74 and N97 were able to grow under microaerophilic conditions. In terms of the relationship to temperature, 37 °C was found to be the optimum growth temperature for all bifidobacterial strains. Specifically, strains N50 and N97 grew very well at 30–46 °C and strain N74 at 30–37 °C, while strains N115 and GLT066 only grew at 37 °C. Regarding the relationship with pH, a pH value of 6.5 was determined as the optimum for all strains. Strain N50 grew very well in the pH range 6.0-9.0, N74 in the pH 6.5-9.0 and GLT066 in the pH 6.0-7.5, while strains N97 and N115 grew well only at the pH 6.5. The exception in the testing was strain N115. It will be necessary to test it again in larger volumes under more stable conditions for its further characterisations.

All analyzed strains showed mostly typical bifidobacterial characteristics. Further analyses will be performed in the future according to the recommended minimum standards necessary for describing new bifidobacterial taxon.

Keywords: microbiome, cultivation, bifidobacteria, phenotypic and genotypic characterization

Obsah

1 Úvod	8
2 Hypotéza a cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Střevní mikrobiota	10
3.2 Bifidobakterie	11
3.2.2 Taxonomie bifidobakterií	12
3.2.3 Metabolismus	13
3.2.4 Bifidobakterie při podpoře zdraví hostitele	14
3.2.5 Aktuální druhová rozmanitost bifidobakterií	16
3.3 Popis nového druhu bifidobakterie	21
3.3.1 Fenotypová kritéria.....	21
3.3.2 Chemotaxonomická kritéria	22
3.3.3 Ekologická kritéria	23
3.3.4 Genotypová kritéria	23
4 Metodika	25
4.1 Seznam testovaných kmenů bifidobakterií	25
4.2 Kultivace bifidobakterií a kontrola čistoty kultury	25
4.3 Fenotypová charakterizace	26
4.3.1 Mikroskopická analýza – popis buněk	26
4.3.1.1 Barvení podle Grama	26
4.3.2 Makroskopická analýza – popis kolonií	26
4.3.3 Hodnocení fyziologických vlastností – O ₂ , teplota a pH	27
4.4 MALDI-TOF MS	28
4.5 Genotypová charakterizace	29
4.5.1 Izolace DNA pro celogenomové sekvenování	29
5 Výsledky	30
5.1 Fenotypová charakterizace	30
5.1.1 Kultivační a morfologická analýza.....	30
5.1.2 Hodnocení fyziologických vlastností	35
5.1.2.1 Vztah izolátů k přítomnosti kyslíku.....	35
5.1.2.2 Vztah izolátů k teplotám	36

5.1.2.3 Vztah izolátů k pH	36
6 Diskuse	38
7 Závěr	42
8 Seznam použité literatury	43

1 Úvod

Mezi rozsáhlým společenstvím střevních bakterií se vyskytuje také rod *Bifidobacterium*. Bifidobakterie dominují ve střevě zdravých kojenců, zatímco v dospělosti je jejich zastoupení nižší a stabilní. Přítomnost řady typických bifidobakteriálních druhů se mění s věkem. Bifidobakterie jsou spojovány s příznivým účinkem na zdraví svého hostitele, jako je produkce řady metabolitů zahrnujících mastné kyseliny s krátkým řetězcem, konjugované kyseliny linolové a bakteriociny (Arbolea et al. 2016). Přestože byl první druh bifidobakterie objeven před více než stoletím (Tissier 1899), tento rod komenzálních mikroorganismů se stále významně dynamicky vyvíjí a každým rokem počet nově popsáných druhů signifikantně narůstá. Nejčastěji jsou v současné době popisovány nové druhy bifidobakterií izolované zejména ze střevní mikrobioty primátů. Řada publikací na tento trend poukazuje s důrazem na bohaté zastoupení potenciálně nových druhů bifidobakterií zejména u novosvětských primátů (Duranti et al. 2019; Neuzil-Bunesova et al. 2021; Modrackova et al. 2021).

Pro popis nového druhu bakterií v rámci čeledi *Bifidobacteriaceae* byly vytvořeny minimální standardy a postupy, které zahrnují například morfologickou (popis bifidobakteriálních buněk, reakce na barvení podle Grama) a kultivační analýzu (popis kolonií), pohyblivost buněk, popis zdroje a místa výskytu daného kmene, DNA-DNA hybridizace, sekvenace genu 16S rRNA a dalších doplňkových fylogenetických markerů (Mattarelli et al. 2014).

2 Hypotéza a cíl práce

Při mikrobiologických rozborech fekálních vzorků od variabilních hostitelů byly detekovány izoláty bifidobakterií s potenciálem nového druhu bifidobakterie, které budou dále charakterizovány zejména na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD). V rámci popisu potenciálně nových druhů bude provedena morfologická a kultivační analýza, analýza MALDI-TOF hmotnostních spekter a budou dále testovány také jejich fyziologické vlastnosti. Předpokládáme, že provedení fenotypových a genotypových charakterizací u izolátů bifidobakterií různého původu s charakterem potenciálně nového druhu povede k potvrzení a následnému popsání nového druhu.

Cílem této práce je vytvoření přehledné literární rešerše na základě aktuálních vědeckých poznatků o dynamicky se rozvíjejícím rodu *Bifidobacterium* a o metodickém postupu při popisu jeho potenciálně nových druhů. Podílení se na fenotypové a genotypové charakterizaci nově popisovaných druhů bifidobakterií na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD).

3 Literární rešerše

Gastrointestinální (GI) ekosystém dospělého člověka obsahuje tři složky (mikrobiota, imunitní mediátory a epiteliální bariéra), jenž každá z nich je schopna určitého stupně vývoje a hraje důležitou roli pro úplnou funkční a vývojovou zralost (McCracken & Lorenz 2001). Střevní mikrobiota hraje zásadní roli v různých procesech lidského zdraví. Existují studie, které spojily vznik střevních onemocnění se vznikem řady dalších onemocnění (Arboleya et al. 2016). Mikrobiální populace vyvíjí rozmanité metabolické a fyziologické aktivity, jenž napomáhají nejen udržení zdraví hostitele, ale také rozkladu složek potravy, ochrany před patogeny, podpory diferenciací buněk hostitele a stimulace (nebo modulace) imunitního systému (Yatsunencko et al. 2012). Mezi mikrobiálními společenstvy a lidskými i zvířecími hostiteli dochází k mnoha vzájemným interakcím, jež jsou do určité míry řízené genetickou výbavou, výživou a životním stylem hostitele. Složení těchto společenstev má zásadní význam pro poskytnutí metabolických schopností nad rámec již zakódovaných v genomu hostitele a přispívá tak k tvorbě buněčných signalizací podporujících dynamickou adaptaci na změny v dostupnosti potravy, prostředí a vývoji organismu (Selber-Hnatiw et al. 2020). Za normálních podmínek je složení střevní mikrobioty poměrně stabilní, avšak může být negativně ovlivněno vnějšími faktory, jako je například léčba antibiotiky (Sullivan et al. 2001). Počet bakteriálních buněk v těle je řádově stejný jako počet lidských buněk (Sender et al. 2016), zatímco společný genom všech těchto bakteriálních buněk, označovaný také jako mikrobiom, obsahuje nejméně 150krát více genů než celkový počet genů přítomných v lidském genomu (Qin et al. 2010). Lidská GI mikrobiota dospělého člověka je tvořena výhradně členy, kteří patří do pěti bakteriálních kmenů: Firmicutes, Bacteroides, Actinobacteria, Proteobacteria a Verrucomicrobia, s významným zastoupením rodů *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Coproacillus* a *Bifidobacterium* (Tap et al. 2009; Pokusaeva et al. 2011). Právě k bifidobakteriím byla během posledních let poutána velká pozornost, a to nejen z důvodu jejich běžného vysokého zastoupení u kojenců (Arboleya et al. 2016), ale také z důvodu zjištění jejich významného výskytu ve střevech primátů, zejména také u dospělých jedinců, které se ukázalo jako velice pestrý ekosystém s obrovským potenciálem pro další zkoumání a zdroj pro izolaci a popis potenciálně nových druhů (Lugli et al. 2020).

3.1 Střevní mikrobiota

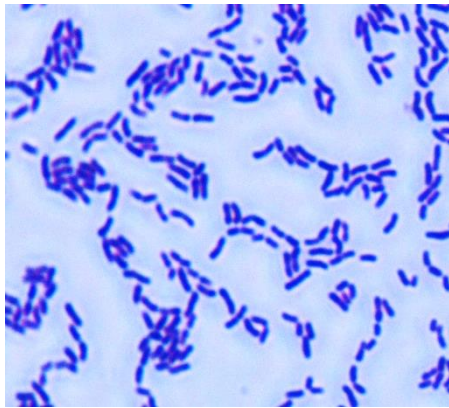
Mikrobiální společenstva jsou běžně definována jako soubor mikroorganismů žijících společně (Berg et al. 2020). Více specificky můžeme mikrobiální společenstva definovat jako více druhová seskupení, v nichž se mikroorganismy vzájemně ovlivňují (Konopka 2009). Určování struktury a funkčního potenciálu mikrobiomu ve zdraví a nemoci, stejně jako proměnných, které jej ovlivňují, se ukázalo jako zásadní (Shreiner et al. 2015). Mikrobiota je velmi dynamický ekosystém, jehož stav může být ovlivňován mnoha faktory, například genetickými faktory, věkem, geografickými podmínkami a léčbou léky (Cuffaro et al. 2021). Mikrobiom je silně ovlivněn prostředím, které osídluje (Simões et al. 2013), a proto lze specifikovat např. mikrobiom kůže (Byrd et al. 2018), dutiny ústní, dýchacího traktu (Man et al. 2017), urogenitálního traktu (Ravel et al. 2011) a střeva (Simões et al. 2013).

Střevní mikrobiota se podílí na střevním dozrávání a homeostázi prostřednictvím mnoha funkcí a je v neustálé symbióze a vzájemné komunikaci nejen s lidskými buňkami (Bäckhed et al. 2005; Cuffaro et al. 2021). Mikrobiální společenstva střevního traktu úzce souvisejí také s imunitním a nervovým systémem a jejich ochranou prostřednictvím efektu ekosystémové bariéry (Cuffaro et al. 2021). Významnou roli hraje také v produkci látek nezbytných pro tělo hostitele, jako jsou vitaminy, v udržování metabolické homeostáze, a dokonce i ve zdravém fungování distálních orgánů, jako jsou mozek, plíce a játra (Cummings & Macfarlane 1997; Turnbaugh et al. 2006; Mayer et al. 2015; Tripathi et al. 2018; Enaud et al. 2020). Mikrobiota také významně napomáhá trávení potravy, konkuruje patogenům, rozkládá mucin a podporuje diferenciaci epitelových buněk a lymfoidní tkáně spojené se sliznicí. Zásadní vliv na protizánětlivou aktivitu a podporu imunity má metabolická aktivita a její složení (Konieczna et al. 2012). I z toho důvodu je v současné době na trhu k dispozici řada probiotických výrobků (Savitri & Lata 2021). Ačkoli ne všechny mechanismy, které přispívají při léčbě nemocí spojenými s gastrointestinálním traktem (GIT) podáváním probiotik, nejsou zcela jasné, uvádí se, že modifikace střevní mikrobioty, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a jejich účinek na organismus, snižování pH v trávicím systému, produkce bakteriocinů a dalších látek a vitaminů by mohly patřit mezi některé z nich (Tijjani et al. 2020).

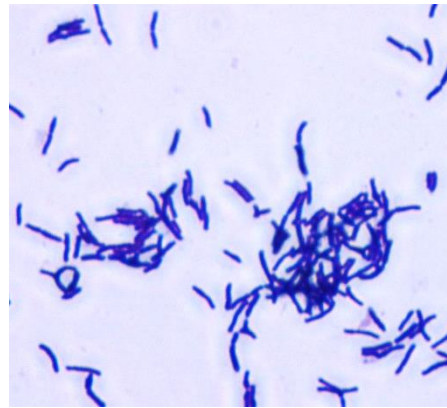
3.2 Bifidobakterie

Pro podobnost mezi zástupci z rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* byla historicky taxonomie těchto mikroorganismů často zaměňována, a proto i mnoho někdejších i současných textů se zabývalo těmito rody zároveň. Hlavním faktorem tohoto prolínání je skutečnost, že oba taxony mají několik morfologických a fyziologických podobností (Gram-pozitivní tyčinky, netvořící spory, produkující značné množství kyseliny mléčné a octové). Navíc k tomu přispívá skutečnost, že jsou oba rody hojně zastoupeny v trávicím traktu savců, s tím je spojována jejich běžná a pravidelná izolace z trávicího traktu nejen lidských kojenců a dospělých lidí, ale také jejich potenciální vlastnosti podporující zdraví svých hostitelů (Lawson 2018). Dále se hojně vyskytují také v pochvě, ústní dutině, zadních střevech včel a čmeláků, ve fermentovaných i nefermentovaných potravinách a v neposlední řadě i odpadních vodách (Modesto 2018).

Bifidobakterie byly poprvé izolovány v roce 1899 (Tissier 1899) a od té doby jsou intenzivně studovány, jako bakterie vyskytující se v lidské střevní mikrobiotě (Shimamura et al. 1992). *Bifidobacterium* spp. je rod tvořen Gram-pozitivními, nepohyblivými, striktně anaerobními tyčinkami (Turroni et al. 2012; Bäckhed et al. 2015; Mei et al. 2022). Buňky bifidobakterií jsou typické svým nepravidelným tvarem různě dlouhých tyčinek. Mohou být krátké zakřivené, válcovitého tvaru na konci zaoblené nebo nepravidelné ve tvaru písmene V nebo Y (**Obrázek 2**) (Gomes & Malcata 1999; Lee & O'Sullivan 2010). Několik studií prokázalo, že nepřítomnost nebo nízké koncentrace *N*-acetylglukosaminu, ionty Ca^{2+} nebo aminokyselin (např. serin, kyselina glutamová, alanin a kyselina asparagová) v růstovém médiu vyvolávají výhradně bifidní tvar bifidobakterií (**Obrázek 1**) (Lee & O'Sullivan 2010).



Obrázek 1: Bifidní tvar – vzorek 8 (A. Andrášová)



Obrázek 2: Agregáty – vzorek 1 (A. Andrášová)

Přestože se bifidobakterie charakterizují jako kataláza-negativní anaeroby (Gomes & Malcata 1999), existují výjimky, například *B. indicum* a *B. asteroides*, které jsou kataláza-positivní a prosperují i za přítomnosti kyslíku (Felis & Dellaglio 2007). Optimální pH pro jejich růst je 6–7, téměř žádný nárůst vykazují při pH 4,5–5,0 a nižším, nebo také při pH 8,0–8,5 a vyšším. Optimální teplota pro růst činí 37–41 °C (Gomes & Malcata 1999). Typickým a klíčovým enzymem pro metabolismus bifidobakterií je fruktóza-6-fosfátfosfoketoláza, která je využívána jako taxonomický znak, při identifikaci bifidobakterií, nicméně neumožňuje jejich mezidruhovou diferenciaci. Bifidobakterie mají ve své buněčné stěně fosfolipidy, které jsou variabilní, a základní aminokyselinou v tetrapeptidu bývá buď ornitin nebo lysin a mají různé typy příčných vazeb. Jako větev aktinobakterií obsahují bifidobakterie ve svých DNA bázích od 54 do 67 mol% guaninu a cytosinu (G+C) a vykazují heterofermentativní typ metabolismus. Bifidobakterie jsou navíc typickým příkladem sacharolytických bakterií (Gomes & Malcata 1999).

Zástupce rodu *Bifidobacterium* považujeme za součást gastrointestinální mikrobioty. Podílejí se na podpoře udržování zdraví svého hostitele (Pokusaeva et al. 2011). Tito komenzálové, bývají také často využívány v potravinářském průmyslu a jako probiotické mikroorganismy, jelikož u některých kmenů byly prokázány specifické příznivé účinky na zdraví hostitele (Sánchez et al. 2013). Bifidobakterie představují převažující populaci u novorozenců a kojenců, avšak počet bifidobakterií klesá s věkem. Druhy jako *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* jsou typicky spojovány s ranými stádii života jedince, kdežto například druh *Bifidobacterium adolescentis* je více spojován s dospělými hostiteli (Sánchez et al. 2013). Bifidobakterie se vyskytují nejen v trávicím traktu lidí, ale také například u čmeláků (*Bombus lucorum*) (Killer et al. 2011) a drvodělek fialových (*Xylocopa violacea*) (Alberoni et al. 2019), krys, divokých prasat (Masco et al. 2004), psů (Neuzil-Bunesova et al. 2020) a velmi hojně u opic (Modrackova et al. 2021).

3.2.2 Taxonomie bifidobakterií

Rod *Bifidobacterium* patří do domény Bacteria, kmene Actinobacteria, třídy Actinobacteria, řádu Bifidobacteriales a čeledi *Bifidobacteriaceae*. Čeleď *Bifidobacteriaceae*

zahrnuje čtyři rody: *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Scardovia* a *Parascardovia* (Ventura et al. 2007). Bifidobakterie tvoří obecně hluboce rozvětvenou linii v rámci aktinobakterií (Gao & Gupta 2005; Gao et al. 2006).

Actinobacteria je jedním z největších kmenů v doméně Bacteria (Salam et al. 2020), jenž obsahuje různé rody bakterií s velmi variabilním metabolismem a způsobem života. Zahrnuje jak patogeny, rostlinné komenzály, symbionty vázající dusík, tak i obyvatelé GIT, mezi které právě patří bifidobakterie (Ventura et al. 2007).

3.2.3 Metabolismus

Bifidobakterie jsou sacharolytické a jsou tedy schopné využívat velkou škálu sacharidů pocházejících z hostitelovy diety, které nejsou rozloženy v horních částech střeva, a z nichž mnohé jsou oligo- a polysacharidy rostlinného původu (Pokusaeva et al. 2011). Z monosacharidů jsou bifidobakterie kromě glukózy schopny využívat také galaktózu, laktózu a obvykle i fruktózu jako zdroj uhlíku (Gomes & Malcata 1999). Různé bifidobakteriální kmeny mohou mít různé schopnosti využívat sacharidy (Pokusaeva et al. 2011). Schopnost bifidobakterií kolonizovat gastrointestinální trakt přímo závisí na jejich schopnosti využívat komplexní sacharidy, které jsou v tomto prostředí všudypřítomné. Metabolismus sacharidů je u bifidobakterií proto intenzivně studován. Bifidobakterie jsou schopny využít tedy jak dietární, tak hostitelské sacharidy (Egan & Van Sinderen 2018). Jako dietární lze uvést polysacharidy buněčných stěn rostlin, pektin, celulózu, arabinan, xylan a rezistentní škrob, které jsou odolné vůči trávení glykosylhydrolázami kódovanými hostitelem, tedy i jejich vstřebávání v tenkém střevě (Lattimer & Haub 2010). Zatímco hostitelské sacharidy mají úlohu nejen jako zdroj energie, ale také navíc slouží jako místa pro přichycení adhezních struktur mikroorganismů (Kankainen et al. 2009; Turroni et al. 2010). Ukázalo se, že bifidobakterie kódují produkci extracelulárního polysacharidu, který je důležitý pro adhezi bakterií k buňkám hostitele a zároveň k přispívání k odolnosti vůči žaludečním kyselinám a žlučovým solím (Pérez et al. 1998; Ventura et al. 2007).

Obecně jsou primárním odpadním produktem střevní mikrobioty SCFA, které vznikají fermentací nestravitelných polysacharidů, včetně například také prebiotických oligosacharidů mateřského mléka (HMO) (Cheng et al. 2020). Nejvýznamnější SCFA pro lidské zdraví jsou formiát, acetát, butyrát a propionát, protože představují převážnou většinu přítomnou v tlustém střevě (Silva et al. 2020), mají mnohostranné funkce a hrají významnou roli v integritě střevní bariéry, střevním pH a inhibici patogenů (Ewaschuk et al. 2008). Bifidobakterie produkují acetát a laktát v poměru tři moly acetátu ku dvěma molům laktátu jako hlavní finální produkt svého metabolismu a řadu dalších minoritních metabolických produktů (Rosypal et al. 1981; Mozzi 2010). Stav tlustého střeva je ovlivňován právě poklesem pH způsobeným uvolňováním široké škály SCFA bifidobakteriemi (Collins & Reid 2016; Liu et al. 2019). Významnost SCFA obecně dosvědčuje skutečnost, že snížení obsahu těchto sloučenin v organismu je spojeno s mnoha chronickými onemocněními, včetně onemocnění ledvin (Stuivenberg et al. 2022). Bifidobakterie mají navíc nápadnou schopnost produkovat konjugovanou kyselinu linolenovou (CLA) na úrovni druhu a kmene. Tato schopnost byla například popsána u devíti kmenů bifidobakterií z lidského střeva pomocí analýzy plynovou chromatografií (Coakley et al. 2003; Mei et al. 2022).

3.2.4 Bifidobakterie při podpoře zdraví hostitele

Pro podporu zdraví hostitele je podávání probiotik jedním ze slibných nástrojů. Probiotika jsou definována jako živé organismy, při jejichž podání v přiměřeném množství přinášejí hostiteli zdravotní prospěch a zahrnují širokou škálu mikroorganismů (Hill et al. 2014). Probiotika se ve stále větší míře přidávají do řady potravin, nápojů a lokálních výrobků, v řadě případů s pochybným nebo neexistujícím vědeckým/zdravotním tvrzením přínosu pro hostitele (Cunningham et al. 2021). Rostoucí trend využívání probiotik v potravinách, ve kterých se původně probiotika nenacházela, by mohl vést ke snížení funkční účinnosti v důsledku vyloučení potencionálního synergického účinku potraviny. Je tedy velice důležitý vhodný výběr potravinových zdrojů pro dodávání probiotik (Ranadheera et al. 2010). Probiotika sloužící jako mikrobiální doplňky stravy přispívají ke střevní mikrobiální rovnováze a jsou také využívány ke změně složení mikrobioty tlustého střeva. Tyto změny však mohou být pouze přechodné (Gibson & Roberfroid 1995). Využívání živých mikroorganismů ve stravě má bohatou historii. Kvašené mléčné výrobky, ve kterých se mikroorganismy přirozeně vyskytují, se pro podpůrné léčebné účely využívaly výrazně dříve, než byla zaznamenána existence samotných mikroorganismů (Leahy et al. 2005). Fermentovaná mléka a jogurty jsou považovány za významné nositele pro dodávání probiotik (Ranadheera et al. 2010). Mezi základní mechanismy účinku probiotik patří soupeření o vazebná místa s patogeny na epiteliálních buňkách trávicího traktu, což zabraňuje infekci, tvorba určitých metabolitů, také i bakteriocinů, které snižují růst patogenních bakterií, posilování epiteliální bariéry, zlepšená přilnavost ke střevní sliznici a inhibice patogenní adheze a modulace intimního systému (Savitri & Lata 2021).

Jedním z rozsáhle studovaných probiotických rodů je *Bifidobacterium* spp., podílející se na obnově střevní homeostázy působením několika mechanismů (Sarkar & Mandal 2016). Konkrétně například právě bifidobakterie jsou to z důvodu jejich dlouhodobého zkoumání, kladných zkušeností při podávání, běžné přítomnosti v mikrobiotě hostitelů bez zdravotních komplikací a potenciálně probiotických vlastností (Gibson & Roberfroid 1995; Sánchez et al. 2013). V rámci potravin se například v jogurtech běžně nachází *B. animalis* a *B. longum*, dále ve fermentovaných mlékách, některých zmrzlinách a sýrech *B. animalis* subsp. *lactis* (Ranadheera et al. 2010). Probiotické bifidobakterie lze navíc přidávat do pasterizovaných mléčných výrobků, aby byla zvýšena stravitelnost laktózy (Rolfe 2000). Pozitivní vliv na snížení výskytu laktóзовé intolerance u některých jedinců byl prokázán konkrétně u druhu *Bifidobacterium longum* (Jiang et al. 1996; Leahy et al. 2005). Aby mohla aktivně probioticky působit ve střevním traktu hostitele, musí přežít náročné podmínky nacházející se při průchodu GIT, jako je například kyselé pH, žaludeční enzymy a žluč, pankreatin a další střevní enzymy v tenkém střevě. Tyto faktory GIT mohou silně ovlivnit metabolický stav podaných bakterií a jejich přežívání, a tím i významně ovlivnit jejich funkčnost. Jakmile se bifidobakterie usadí ve svém přirozeném prostředí, tj. v tlustém střevě, musí disponovat vhodným genetickým zázemím a enzymatickým aparátem, aby umožnily rozklad metabolických zdrojů typických jak endogenních, jako je střevní mucin, tak exogenních, sacharidy v potravě, které nejsou tráveny v horních částech střeva. Je tedy zřejmé, že bifidobakterie musí mít specifické adaptační vlastnosti na prostředí, ve kterém žijí (Sánchez et al. 2013).

Bifidobakterie, podobně jako jiné organismy produkující kyselinu mléčnou vykazují ochranný účinek proti ničivým následkům akutního průjemového onemocnění (Leahy et al. 2005). Konkrétně *Bifidobacterium longum* například vykazoval inhibiční účinky na mnoho patogenních organismů, například působí proti *Salmonella typhimurium* na živočišných *in vivo* modelech (Silva et al. 1999, 2004).

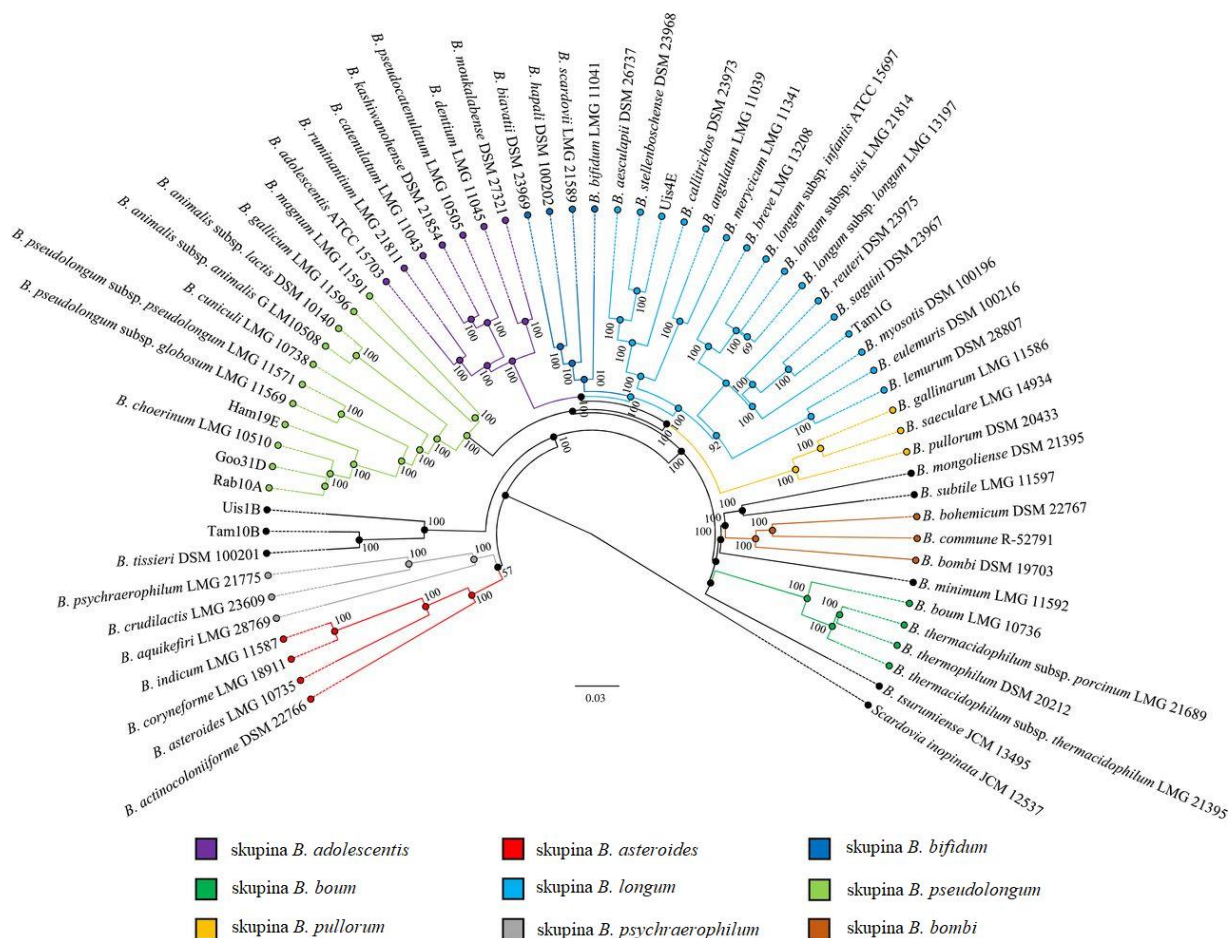
Formování a udržování střevní mikrobioty je komplexní proces, jenž lze ovlivnit i několika dalšími faktory. Mohou ji ovlivnit interakce mezi mikroorganismy, mezi mikroorganismy a hostitelem, stravou a také například způsobem porodu. GIT plodu je sterilní, během porodu osidlují GIT dítěte mikroorganismy z matky a okolního prostředí, než dojde k vytvoření komplexní mikrobioty (Mackie et al. 1999; McCracken & Lorenz 2001). Mikroorganismy, jež jako první kolonizují GIT, jsou aerobní a fakultativně anaerobní bakterie a snižují oxidačně-redukční potenciál ve střevě, umožňují kolonizaci také anaeroby (McCracken & Lorenz 2001; Underwood et al. 2015). Na složení a funkci rané mikrobioty má zásadní vliv výživa, zejména kojení. Zavedení pevné stravy nemá na složení a funkci takový vliv, spíše je nutná ke správnému dozrávání mikrobioty připomínající mikrobiotu dospělého člověka (Bäckhed et al. 2015). Přesto ale bylo zjištěno, že *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* se vyskytují u kojenců kojených mateřským mlékem, ale i u kojenců krmených umělou výživou (Klaassens et al. 2009; Arboleya et al. 2016). To naznačuje hostitelskou specifitu těchto druhů. U kojených dětí se již po pěti dnech objevily bifidobakterie, zatímco u dětí, které od prvního dne po narození dostávaly stravu založenou na umělé výživě, bylo jejich významné opoždění při osídlení GIT (Favier et al. 2003). Zejména právě některé typicky kojenecké druhy rodu *Bifidobacterium* mohou získávat energii z mateřského mléka a jejich HMO (Petherick 2010), což pravděpodobně souvisí s jejich převahou ve střevní mikrobiotě v prvním roce života kojence (Garrido et al. 2013a). Po ukončení kojení, a tedy snížení přísunu mateřského mléka početní převaha bifidobakterií v trávicím traktu klesá (Bottacini et al. 2014).

Podporu již přítomných bifidobakterií v GIT hostitele lze uskutečnit podáváním prebiotik. Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravin, jež mohou příznivě ovlivňovat hostitele tím, že selektivně stimulují růst a/nebo metabolickou aktivitu jedné nebo omezeného počtu mikroorganismů bakterií v tlusté střevě, a tím zlepšují zdraví hostitele (Gibson & Roberfroid 1995). Aby mohly být účinné, prebiotika nesmí být strávena v horní části střeva a musí být přednostně v trávicím traktu prospěšnými mikroby, které jsou součástí mikrobioty tlustého střeva (Manning & Gibson 2004). Za prebiotika jsou považovány vlákniny typu galakto-oligosacharidů, frukto-oligosacharidů a inulinu, jejichž některé formy se přirozeně vyskytují v potravinách, jako jsou luštěniny, obiloviny, ovoce a zelenina (Lockyer & Stanner 2019). Vzhledem k rozsahu potravin, které mohou být obohaceny prebiotiky, jejich schopnostmi vyvolat pozitivní změny mikrobioty a zdravotním aspektům, které z toho mohou vyplynout, je důležité, aby byly použity spolehlivé technologie pro ověření funkčnosti (Gibson et al. 2004). Potencionálně vhodné prebiotické substráty pro rod *Bifidobacterium* mohou být navíc i potravinářská zahušťovadla, zejména přírodní gumy a škrob (Modrackova et al. 2019). Tyto definice se vztahují i na oblast výživy zvířat, v níž jsou strategie zaměřené na udržení zdraví a prevenci onemocnění mikrobioty stejně důležité jako u lidí (Gibson et al. 2017).

Dalším významným faktorem při ovlivnění složení střevní mikrobioty je také podávání antibiotik. Působením antibiotik, podávaných k prevenci a léčbě infekčních onemocnění způsobených bakteriemi a plísněmi, bývá mikrobiota lidského GIT velmi často vystavována a není to žádoucí (Duranti et al. 2017). Může to totiž způsobit modulaci bakteriální komunity ve střevě cestou šíření genů rezistence k antibiotikům, přičemž antibiotická terapie pozitivně selektuje ty mikroorganismy, které takové genetické vlastnosti nesou (Duranti et al. 2017). Invaze patogenů způsobuje narušení střevní homeostázy a vyvolání první linie obrany, což zahrnuje vrozené imunitní reakce a reakce vyvolané endogenní mikrobiotou. Pokud tuto rezistenci patogeny úspěšně překonají, je následně vyžadován terapeutický zásah zahrnující právě antibiotika. Ty mnohdy ponechávají střevo nekolonizované a náchylné k recidivám, což otevírá možnosti pro cílenou aplikaci probiotických doplňků stravy (Sarkar & Mandal 2016). Bylo zjištěno, že antibiotická terapie redukuje celkovou bakteriální rozmanitost a ovlivňuje až 33 % mikrobiální populace a současně u starších osob by měl být vliv antibiotické léčby zvažován z hlediska dlouhodobých zdravotních účinků (O'Sullivan et al. 2013). Navzdory mírnému, ale dlouhotrvajícímu dopadu po expozici antibiotikům je střevní mikrobiota zdravých mladých dospělých odolná vůči krátkodobému zásahu širokospektrými antibiotiky a jejich genová rezistence vůči antibiotikům moduluje procesy obnovy (Palleja et al. 2018).

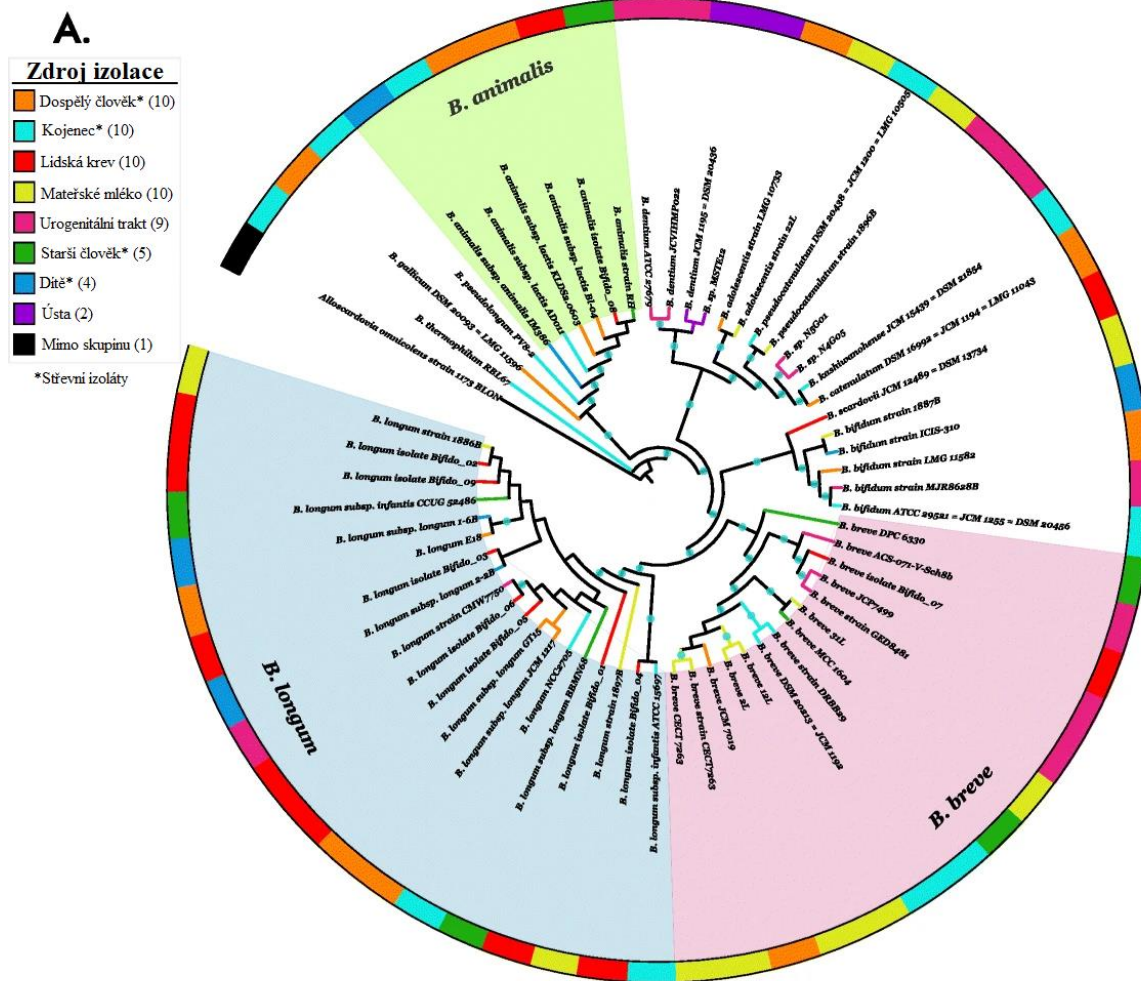
3.2.5 Aktuální druhová rozmanitost bifidobakterií

Od objevení bifidobakterií na konci 19. století v prostředí lidského střeva se výskyt a druhové zastoupení rozsáhle dokumentovalo v různých a rozmanitých ekologických nikách. Dle veřejně dostupné databáze List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) (bacterio.net) je ke konci prvního čtvrtletí roku 2023 uvedeno 117 platně popsáných druhů bifidobakterií a 18 poddruhů (Parte et al. 2020). Na základě fylogenetické analýzy jsou bifidobakterie rozdělovány do deseti fylogenetických skupin konkrétně *B. adolescentis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. bombi*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. psychraerophilum* a *B. tissieri* (Lugli et al. 2018; Modesto et al. 2020b). Podle výzkumu Lugli et al. (2018) fylogenetická skupina *B. pseudolongum* je nejvariabilnější bifidobakteriální skupinou z hlediska ekologických nik zastoupených živočišnými druhy, z nichž byly tyto kmeny izolovány. Fylogenomická analýza ukázala, že některé detekované tanoxny nepatří do žádné dříve popsané fylogenetické skupiny, tudíž na základě příbuznosti mezi danými typovými kmeny bifidobakterií byly navrženy dva další fylogenetické klastry, a to skupina *B. psychraerophilum* a skupina *B. bombi* (**Obrázek 3**) (Lugli et al. 2018).



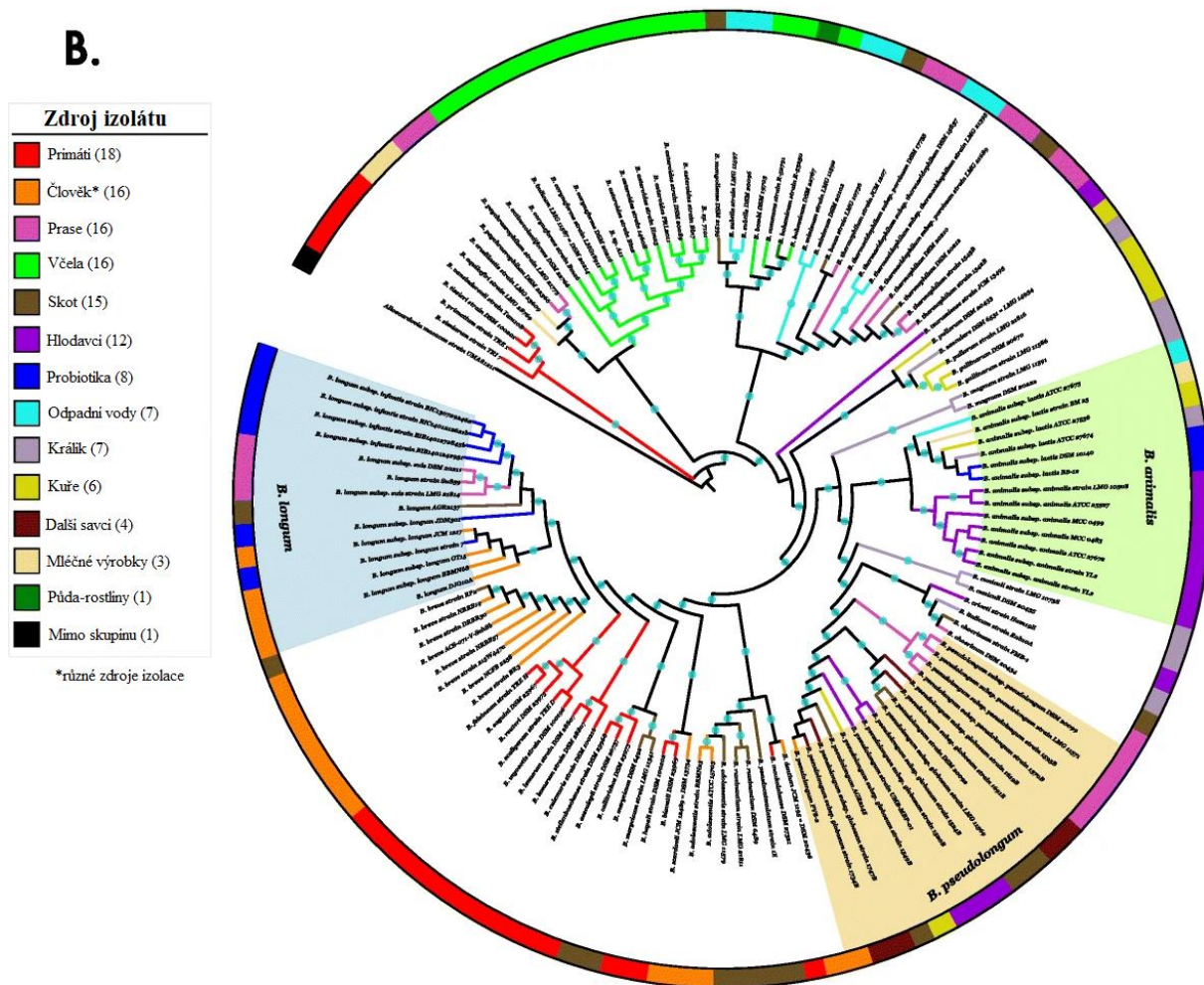
Obrázek 3: Fylogenetický strom rodu *Bifidobacterium* zobrazující devět fylogenetických skupin, založený na konkatenci odvozených aminokyselinových sekvencí 232 základních genů Goo31D, Ham19E, Rab10A, Tam1G, Uis4E a Uis1B bootstrap (Lugli et al. 2018)

Pro zkoumání fylogenetických vztahů mezi kmeny bifidobakterií izolovanými z různých prostředí a hostitelů byly zkonstruovány dva fylogenetické stromy na základě 107 zřetěžených základních genů. Tyto stromy zahrnovaly jeden se 60 kmeny pocházejícími od člověka (**Obrázek 4**) a druhý se 129 kmeny z různých prostředí a hostitelů (**Obrázek 5**) (Rodriguez & Martiny 2020). V obou stromech se těsně shlukovali příslušníci stejné taxonomické skupiny a fylogenetická struktura stromů byla podobná těm předchozím založených na sekvenaci genu 16S rRNA a genech dalších (Ventura et al. 2006; Lugli et al. 2014; Milani et al. 2014; Sun et al. 2015). Například bylo zjištěno, že druhy *B. breve* a *B. longum* jsou si blízce příbuzné, stejně jako *B. bifidum* a *B. scardovii*. Jedním z rozdílů bylo, že fylogenetická skupina *B. asteroides* se již dříve ukázala být umístěna v nejhlubších větvích linie bifidobakterií (Bottacini et al. 2012; Milani et al. 2014; Sun et al. 2015). Zatímco Rodriguez & Martiny (2020) ve svém fylogenetickém stromu kmenů odvozených od člověka (**Obrázek 4**) uvádí nejhlubší větev u druhu *B. thermophilum*, což bylo pravděpodobně způsobeno chybějícím zástupcem fylogenetické skupiny *B. asteroides*, který by mohl být do stromu odvozeného od člověka zahrnut. Ve větším stromu nejhlubší větve odpovídaly kmenům druhů *B. simiarum*, *B. primatum*, *B. vansinderenii* a *B. tissieri* (Rodriguez & Martiny 2020).



Obrázek 4: *Fylogenetický vztah kmenů Bifidobacterium odvozených od člověka na základě 107 markerových genů. Významné druhy jako B.longum, B. breve a B. animalis jsou vystínovány různými barvami. Vnější kroužek představuje různé zdroje izolace bifidobakterií (Rodriguez & Martiny, 2020)*

Při porovnání více druhů hostitelů a prostředí bylo prostředí, ze kterého byly kmeny izolovány, silně spojeno s fylogenetickým rozšířením bakterií (**Obrázek 5**). Například kmeny odvozené od včel, primátů a hlodavců jsou ve fylogenetickém stromu v rámci svých kategorií těsně seskupeny. Tyto širší evoluční vzorce se zdají být obzvláště výrazné u kmenů izolovaných z řádů Artiodactyla, Hymenoptera a Primates, neboť se shlukují většinou v rámci stejných větví (Rodriguez & Martiny 2020).



Obrázek 5: Fylogenetické vztahy druhů *Bifidobacterium*, které se vyskytují u více hostitelů, na základě 107 markerových genů. Významné druhy jako *B. pseudolongum*, *B. longum* a *B. animalis* jsou vystínovány různými barvami. Vnější kroužek představuje různé zdroje izolace bifidobakterií (Rodriguez & Martiny, 2020)

V následující tabulce (**Tabulka 1**) je uveden seznam nově popsanych druhů bifidobakterií od roku 2020 do současnosti, aktuální ke dni 19. 3. 2023 z databáze LPSN. Celkově bylo od roku 2020 popsáno 27 nových druhů. Nejvyšší počet, celkově 10, nově popsanych druhů pochází ze střevní mikrobioty novosvětských opic. Mezi novosvětské opice jsou řazeni například tamarini. Přesto se podařilo Lugli et al. (2021) izolovat nový druh, konkrétně *B. colobi*, také z trusu guarézy plástíkové jakožto zástupce opic starého světa. V posledních letech se také výrazně zkoumá trávicí trakt včel, ve kterých se popsalo několik nových druhů bifidobakterií, jako například *B. apousia* (Chen et al. 2021). Olofsson et al. (2023) poté začátkem března 2023 navrhl další potenciálně nový druh bifidobakterie, konkrétně *Bifidobacterium mellis* sp. nov., který byl izolován ze žaludku včely medonosné (*Apis mellifera*).

Tabulka 1: Seznam uznávaných bifidobakterií v databázi LPSN (bacterio.net), které byly popsány od roku 2020

Bifidobakteriální druh	Objevitel a rok	Zdroj izolace
<i>Bifidobacterium mellis</i>	Olofsson et al. 2023	Žaludek včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)
<i>Bifidobacterium mizhiense</i>	Li et al. 2022	Trávicí trakt čmeláka (<i>Apis mellifa</i>)
<i>Bifidobacterium amazonense</i>	Lugli et al. 2021	Kosman stříbrný (<i>Mico argentatus</i>)
<i>Bifidobacterium apousia</i>	Chen et al. 2021	Žaludek včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)
<i>Bifidobacterium choladohabitans</i>	Chen et al. 2021	Trávicí trakt čmeláka (<i>Apis mellifa</i>)
<i>Bifidobacterium colobi</i>	Lugli et al. 2021	Gueréza pláštiková (<i>Colobus guereza</i>)
<i>Bifidobacterium erythrocebi</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2021	Opice patas (<i>Erythrocebus patas</i>)
<i>Bifidobacterium miconis</i>	Lugli et al. 2021	Kosman stříbrný (<i>Mico argentatus</i>)
<i>Bifidobacterium miconisargentati</i>	Lugli et al. 2021	Kosman stříbrný (<i>Mico argentatus</i>)
<i>Bifidobacterium moraviense</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2021	Svišť Goeldiho (<i>Callimico goeldii</i>)
<i>Bifidobacterium oedipodis</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2021	Tamarín bavlníkový (<i>Saguinus oedipus</i>)
<i>Bifidobacterium olomucense</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2021	Tamarín kníratý (<i>Saguinus mystax</i>)
<i>Bifidobacterium panos</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2021	Šimpanz (<i>Pan troglodytes</i>)
<i>Bifidobacterium phasiani</i>	Lugli et al. 2021	Bážant obecný (<i>Phasianus colchinus</i>)
<i>Bifidobacterium pluvialisilvae</i>	Lugli et al. 2021	Kosman stříbrný (<i>Mico argentatus</i>)
<i>Bifidobacterium polysaccharolyticum</i>	Chen et al. 2021	Trávicí trakt čmeláka (<i>Apis mellifa</i>)
<i>Bifidobacterium pongonis</i>	Lugli et al. 2021	Orangutan sumaterský (<i>Pongo abelii</i>)
<i>Bifidobacterium saguinibicoloris</i>	Lugli et al. 2021	Tamarín pestrý (<i>Saguinus bicolor</i>)
<i>Bifidobacterium santillanense</i>	Lugli et al. 2021	Kosman stříbrný (<i>Mico argentatus</i>)
<i>Bifidobacterium simiiventris</i>	Lugli et al. 2021	Lvíček zlatý (<i>Leontopithecus rosalia</i>)
<i>Bifidobacterium canis</i>	Neuzil-Bunesova et al. 2020	Německý ovčák
<i>Bifidobacterium cebidarum</i>	Duranti et al. 2020	Malpoviti (<i>Cebidae</i>)
<i>Bifidobacterium choloepi</i>	Modesto et al. 2020b	Lenochod dvouprstý (<i>Choloepus didactylus</i>)
<i>Bifidobacterium leontopithecii</i>	Duranti et al. 2020	Tamarín zlatohlavý (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)

<i>Bifidobacterium platyrrhinorum</i>	Modesto et al. 2020a	Kotul veverovitý (<i>Saimiri sciureus</i>)
<i>Bifidobacterium saimiriisciurei</i>	Modesto et al. 2020a	Kotul veverovitý (<i>Saimiri sciureus</i>)
<i>Bifidobacterium tibiigranuli</i>	Eckel et al.2020	Domácí vodní kefir

3.3 Popis nového druhu bifidobakterie

Pro popis nového druhu bifidobakterie je nezbytné dodržet minimální definované standardy a postupy. Součástí tohoto procesu je fenotypová a genotypová charakterizace a popis ekologických kritérií (Mattarelli et al. 2014). Dle těchto standardů by popis nového druhu měl:

- i. být založen na polyfázovém principu, který integruje genomické a fylogenetické údaje s fenotypovými a chemotaxonomickými znaky;
- ii. zahrnovat typový a/nebo referenční kmen, který představuje úzce příbuzné členy;
- iii. poskytnout popis, který nejen umožní nové zástupce přiřadit k taxonu na základě charakteristických znaků, ale také rozlišuje nový taxon od jeho fylogenetických nebo fenotypových sousedních znaků.

Druhá identifikace bakterií se provádí na základě fenotypových a biochemických znaků, ke kterým patří morfologie buněk, profily cukerné fermentace a elektroforetická pohyblivost enzymů, tvoří první taxonomické klíče uplatňované v praxi bakteriální klasifikace. Mnohdy však jejich využití přináší nejednoznačné výsledky, a proto byly zavedeny molekulárně-genetické metody, jako například DNA-DNA hybridizace (Ventura et al. 2004).

3.3.1 Fenotypová kritéria

Obecně fenotypová kritéria zahrnují morfologické, fyziologické, biochemické a nutriční charakteristiky. Z důvodu možného ovlivnění fenotypu kultivačními a testovacími podmínkami, je doporučováno zahrnutí také typových kmenů příslušných referenčních taxonů, které je důležité pro srovnávací účely na úrovni rodu. Zahrnutí referenčních taxonů s typovým kmenem má důležitý význam pro organismy, které se zdají být vysoce příbuzné na základě sekvencí genu pro 16S rRNA a pro druhový popis založený na jediném kmeni. Počet a význam rozlišujících fenotypových charakteristik musí být dostatečně vysoký, aby bylo možné hranice druhů spolehlivě vymezit (Mattarelli et al. 2014).

Tvar a forma buněk by měly být náležitě popsány a v ideálním případě by měl být popis podpořen vhodnou mikroskopickou fotografií. Doporučuje se mikroskopie s fázovým kontrastem při zvětšení 1000x, a také elektronová mikroskopie může být užitečná k odhalení dodatečných morfologických informací. Jelikož morfologie a uspořádání buněk jsou velmi závislé na růstových podmínkách, je třeba uvést popis kultivačních podmínek a složení média. U rodu *Bifidobacterium* mohou mít pro rozpoznání druhu velký význam morfologické znaky, jako je uspořádání a počet větvících se buněk a jejich tvar a rozměry buněk za různých kultivačních podmínek. Morfologie buněk kultivovaných na agarových plotnách může být

heterogenní (Mattarelli et al. 2014). Makroskopická morfologie kolonií včetně velikosti, tvaru, barvy, okrajů, vyvýšení, povrchu, konzistence a průhlednosti jsou obecně velmi málo užitečné pro rozlišení příslušníků bifidobakterií. Podrobnosti o charakteristikách kolonií však mohou být užitečné při popisu druhu, pokud je uvedeno médium a kultivační podmínky (Mattarelli et al. 2014).

Nezbytnou součástí popisu nového druhu je barvení podle Grama. Barvicí reakce může být za zvláštních okolností proměnlivá, proto se doporučuje, aby byly kultury podrobeny postupu těsně po zviditelnění růstu a aby se barvení opakovalo v pozdní exponenciální fázi růstu. Všechny bifidobakterie by měly být Gram-pozitivní. Nezbytnou informací je také uvedení nepřítomnosti endospor (Mattarelli et al. 2014).

Bifidobakterie se vyznačují striktně sacharolytickou aktivitou, která může být ovlivněna různými kultivačními podmínkami. Je doporučováno použití specifického modifikovaného tekutého média obsahujícího pouze polovinu běžného množství sacharidů a také použití bromkresolové purpurové barvy jako indikátor pH. Pro bifidobakterie by měly být testovány následující sacharidy: celobióza, melibióza, rafinóza, mannitol, amygdalin, sacharóza, galaktóza, laktóza, maltóza, manóza, salicin, trehalóza, arabinóza, eskulin, glukonát, melezitóza, ribóza, sorbitol, xylóza, fruktóza, glycerol, ramnóza a škrob (Mattarelli et al. 2014). Dále se bifidobakterie vyznačují fermentací glukózy prostřednictvím *bifid shunt* cesty, přičemž hlavními konečnými produkty jejich metabolismu jsou kyselina octová a mléčná. Proto se doporučuje analyzovat skutečné množství zkvašené glukózy. Pro stanovení podílu kyseliny octové a L-mléčné lze použít také GC analýzu (Holdeman et al. 1977; Mattarelli et al. 2014). Pro čeleď *Bifidobacteriaceae* je totiž typická aktivita enzymu fruktóza-6-fosfátfosfoketolázy (F6PPK), jejíž detekcí je umožněno identifikace bifidobakterií na úrovni rodu (Biavati & Mattarelli 2006; Mattarelli et al. 2014). Test F6PPK se provádí metodou Orbana a Pattersona (Orban and Patterson, 2000).

Také údaje o růstových požadavcích jsou součástí charakteristiky každého mikroorganismu a jsou nezbytné pro stanovení jeho optimálních kultivačních podmínek. Proto je velmi důležité uvádět:

- i. rozsah a optimální hodnoty teploty a pH pro růst ve vhodných médiích
- ii. pokud je to možné, tak také i generační dobu za optimálních růstových podmínek (Mattarelli et al. 2014).

Ačkoli vhodná média mohou být velmi různá, požadované přísady (vitaminy a další růstové faktory, extrakty, sůl atd.) by měly být uvedeny v popisu druhu. Faktory ovlivňující růst by měly být zkoumány za podmínek blízkých optimálním podmínkám růstu a musí být podrobně popsány. Podmínky růstu by měly zahrnovat vztah ke kyslíku, tj. zda jsou kmeny schopny růst za anaerobních, mikroaerofilních a anaerobních podmínek (Mattarelli et al. 2014).

3.3.2 Chemotaxonomická kritéria

Typ peptidoglykanu buněčné stěny je obecně považována za cenný taxonomický nástroj pro identifikaci a charakterizaci bifidobakterií (Schleifer & Kandler 1972). Stanovení těchto znaků nevyžaduje nutně purifikaci kompletní buněčné stěny. Disulfidický můstek je důležitým taxonomickým kritériem pro bifidobakterie (Mattarelli et al. 2014).

3.3.3 Ekologická kritéria

Je třeba podrobně uvést zdroj a místo izolace nového taxonu, jakož i možnou potenciální patogenitu a hostitele. K objasnění možného přenosu z primárního (např. fermentující potraviny) do sekundárního prostředí (např. odpadní vody) nebo zdokumentovat záměrné přidání do potravin. Detailní popis původního zdroje izolace je nezbytný, podobně také pojednání o přirozeném prostředí a ekologickém zařazení nového taxonu (Mattarelli et al. 2014). Je to zejména důležité právě pro ty bifidobakterie, které jsou často užívány jako doplňky nebo startovací kultury v potravinách nebo farmaceutických přípravcích (Stiles & Holzapfel 1997; Biavati & Mattarelli 2006).

3.3.4 Genotypová kritéria

Výhodou identifikačních technik založených na analýze DNA je, že se tyto metody zaměřují spíše na složení nukleových kyselin mikroorganismů než na expresi fenotypových znaků kódovaných příslušnými geny, čímž se zamezuje variabilitě vyvolané regulací genů vlivem prostředí. Vedle tradičních měření DNA–DNA hybridizace (DDH) (Rosselló-Mora & Amann 2001) nabývají na významu i další genetické metody, jako jsou metody založené na sekvenaci různých genů, včetně sekvenování celého genomu, které jsou stále důležitějšími nástroji pro posuzování vztahů mezi různými taxony (Mattarelli et al. 2014).

Jednou z metod je stanovení obsahu guaninu a cytosinu v DNA (G+C mol %). Indikace hodnoty obsahu G+C v DNA (mol %) u nového typového kmene nebo rozsah obsahu G+C DNA nového typového druhu by měl být stanoven pomocí validovaných metodik. Pro stanovení procentuálního podílu G+C lze použít různé metody, například enzymovou hydrolyzu DNA a následné kvantifikování nukleosidů pomocí metody HPLC. Také kompletní sekvenování genomu umožňuje stanovit obsah G+C v DNA spolehlivým způsobem. Vzhledem k tomu, že jsou stále častěji k dispozici celkové sekvence bakteriálních genomů (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), představují tak vynikající referenční mikroorganismy (Mattarelli et al. 2014).

DDH je jako metoda klasický standard pro odhad genetických vztahů na druhové úrovni u prokaryot. DDH by měla být prováděna v případech, kdy nový taxon obsahuje více než jeden kmen, aby se prokázalo, že všechny členové taxonu sdílejí dostatečný stupeň podobnosti, aby mohly být považovány za jeden druh. DDH by se měla používat také k určení, zda je tato homogenní skupina genomicky odlišná od blízce příbuzných druhů. DDH je nezbytná, pokud kmény sdílejí více než 97 % genu 16S rRNA (Mattarelli et al. 2014). Pokud nový taxon vykazuje takto vysokou podobnost s více než jedním druhem, měla by DDH být provedena se všemi příslušnými typovými kmény, aby se prokázalo, že mezi jednotlivými druhy existuje dostatečná odlišnost, která podporuje jejich zařazení do nového taxonu (Tindall et al. 2010). Je nutné, aby byly řádně uvedeny experimentální podmínky (pufrovací systém, iontová síla a teplota reasociace) (Mattarelli et al. 2014).

Gen pro 16S rRNA je nejpoužívanější molekulární marker a jeho sekvenování v plné délce (>1400 nt) je stále metodou první volby pro identifikaci a určení fylogenetických vztahů. Veřejná dostupnost sekvencí většiny typových kménů je velkou výhodou při identifikaci a fylogenetickém zařazení nových izolátů nebo taxonů. Stackebrandt a Goebel (1994) navrhli

horní limit 97 % podobnosti genu 16S rRNA jako prahovou hodnotu. Zatímco nižší sekvenční podobnosti naznačují odlišné druhy, podobnosti 97 % nebo vyšší stále vyžadují použití DDH k určení druhové identity (Mattarelli et al. 2014). Stackebrandt a Ebers (2006) navrhli vyšší mezní hodnotu pro druhové odlišení 98,7-99 %, později byla navržena hodnota 98,65 % (Kim et al. 2014). Kim et al. (2014) stanovili tuto hranici pro podobnost sekvencí genů 16S rRNA provedením párových srovnání 6787 prokaryotických genomů náležejících do 22 kmenů a prokázali, že tato úroveň odpovídá průměrné identitě nukleotidů (ANI) pro vymezení druhů. Pro výpočet podobnosti musí být správné zarovnání sekvencí pomocí různých algoritmů. Pro rekonstrukci fylogenetických stromů je pak důležité ověřit spolehlivost bodů větvení pomocí kritéria správnosti, jako je bootstrapová analýza. Sekvence genu 16S rRNA použité při popisu druhu by měly být uloženy ve veřejně přístupné databázi a v popisu druhu musí být uvedena jejich přístupová čísla. Aby se předešlo předčasnému přiřazení neplatných latinských názvů ve veřejné databázi, měly by být sekvence přednostně ukládány pod laboratorním kódem a pod prozatímními názvy, jako například *Bifidobacterium sp. isolate no. X* (Mattarelli et al. 2014). Nicméně samotná podobnost sekvencí genu 16S rRNA není vždy dostačující k zaručení rozlišení druhů, i když je základní pro prvotní identifikaci. Geny kódující funkční proteiny, ale také ty nekódující oblasti, jako je např. 16S-23S (ITS), jsou variabilnější, a proto mohou mít i vyšší stupeň rozlišení. Stále častěji se používají při identifikaci a popisu nových druhů (Santos and Ochman 2004; Mattarelli et al. 2014). S rostoucí dostupností kompletních bakteriálních genomů byly vytvořeny sady více hostitelských genů, které mohou přesně předpovědět příbuznost genomů a zlepšit přesnost druhové identifikace (Coenye et al. 2005).

Výběr genů užitečných pro rozlišení druhů by se měl řídit několika základními pravidly:

- i. geny by měly být ve většině bakteriálních genomů přítomny v jedné nebo několika málo kopiích;
- ii. měly by mít vyšší rychlost evoluce ve srovnání s rRNA geny;
- iii. neměly by se snadno rekombinovat;
- iv. měly by mít dostatečnou variabilitu, aby umožnily rozlišit druhy v daném rodu (Zeigler 2003).

Kromě sekvence genu 16S rRNA je doporučeno pro zlepšení přesnosti genetické identifikace izolátu, zejména při popisu nového druhu, použít alespoň dva další genetické markery. Při použití pro popis druhů by tyto dodatečné sekvence měly být rovněž uloženy ve veřejné sekvenční databázi a v článku by měly být uvedeny přístupové kódy (Mattarelli et al. 2014).

4 Metodika

Součástí této bakalářské práce je dílčí charakterizace některých znaků potenciálně nových druhů bifidobakterií, které byly původně izolovány z fekálních vzorků novosvětských primátů v rámci publikace Modrackova et al. (2021) a sbírky izolovaných kmenů z fekálních vzorků lvíčků zlatých chovaných v zajetí, a které jsou součástí široké sbírky bifidobakterií na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky na ČZU v Praze.

4.1 Seznam testovaných kmenů bifidobakterií

Pro popis potenciálně nových druhů bifidobakterií bylo celkem vybráno 5 kmenů, které splňovaly předpoklady nového druhu (**Tabulka 2**), konkrétně kmeny N50, N74, N97, N115 a GLT066. Všechny izoláty byly originálně izolovány ze selektivních médií pro detekci bifidobakterií (Rada & Petr 2000; Vlková et al. 2015), ze kterých byly následně odebrány izoláty pro identifikaci a případně další charakterizace. Charakterizacím provedeným v rámci této bakalářské práce předcházela identifikace kmenů na rodovou úroveň F6PPK testem (Orban & Patterson 2000), MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF MS) a sekvenací genu 16S rRNA a srovnáním získaných složených sekvencí s databázemi BLAST a EZ Taxon (Modrackova et al. 2021).

Tabulka 2: Seznam potenciálně nových druhů bifidobakterií

Kmen	Hostitel	MALDI-TOF MS (score)	F6PPK	Accession number	nt	BLAST ID	EZ Taxon
N50	Tamarin sedlový (<i>Saguinus fuscicollis</i>)	<i>B. longum</i> (1,81)	+	MN736359	1375	<i>B. cebidarum</i> (96,31 %)	<i>B. scaligerum</i> (97,75 %)
N74	Tamarin vousatý (<i>Saguinus imperator</i>)	NRI (1,36)	+	MN736369	1397	<i>B. platyrrhinorum</i> (96,34 %)	<i>B. myosotis</i> (96,56 %)
N97	Tamarin bělovousý (<i>Saguinus mystax</i>)	NRI (1,37)	+	MN736375	1378	<i>B. simiiventris</i> (96,61 %)	<i>B. aerophilum</i> (97,38 %)
N115	Tamarin žlutoruký (<i>Saguinus midas</i>)	NRI (1,43)	+	MW678774	1397	<i>B. stellenboschense</i> (96,26 %)	<i>B. platyrrhinorum</i> (96,56 %)
GLT066	Lvíček zlatý (<i>Leontopithecus rosalia</i>)	NRI (1,56)	+	V procesu ukládání	1385	<i>B. cebidarum</i> (97,10 %)	<i>B. cebidarum</i> (96,97 %)

Vysvětlivky: MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrofotometrie s laserovou desorcpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem; NRI – nespolehlivá úroveň identifikace; F6PPK + – fruktóza-6-fosfátfosfoketoláza pozitivní; Accession number – kód uloženého záznamu sekvence genu 16S rRNA; nt – počet nukleotidů

4.2 Kultivace bifidobakterií a kontrola čistoty kultury

Pro všechny charakterizace byla vždy kultura připravena z originální zamražené kopie, která byla následně sub-kultivována do plného nárůstu a zároveň u ní byla vždy zkontrolována čistota ve fázově kontrastním mikroskopu Eclipse E200 (Nikon, Japonsko).

Kultivace kmenů pro další analýzy proběhla ve Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid, Velká Británie) doplněného sójovým peptonem (5 g L⁻¹, Oxoid), L-cysteinem (0,5 g L⁻¹) a Tweenem

80 (1 ml L⁻¹, obojí Sigma-Aldrich, USA) (WSP bujón) v prostředí bez přístupu kyslíku metodou roll-tube podle Hungate (1969) při 37 °C po dobu 24 hodin. Zásobní kultury byly reaktivovány ve WSP bujónu po dobu 24 hodin pro získání pracovních kultur. Jejich čistota byla rutinně potvrzena fázově kontrastní mikroskopií.

Pro popis kultivačních charakteristik byla také provedena kultivace kultur na Petriho miskách s WSP agarem – Wilkins-Chalgren anaerobní agar byl doplněn o 5 g L⁻¹ sójového peptonu, 0,5 g L⁻¹ L-cysteinu a 1 ml L⁻¹ Tween 80.

4.3 Fenotypová charakterizace

4.3.1 Mikroskopická analýza – popis buněk

Morfologie buněk a jejich uspořádání bylo hodnoceno pomocí fázově kontrastního mikroskopu Elipse E200. Délka a šířka buněk byla dále stanovena v programu NIS-Elements, při 1000x. Pomocí mikroskopu byla kromě nezbytné čistoty kultury také dále popisována přítomnost spor, pohyblivost buněk a schopnost barvení podle Grama.

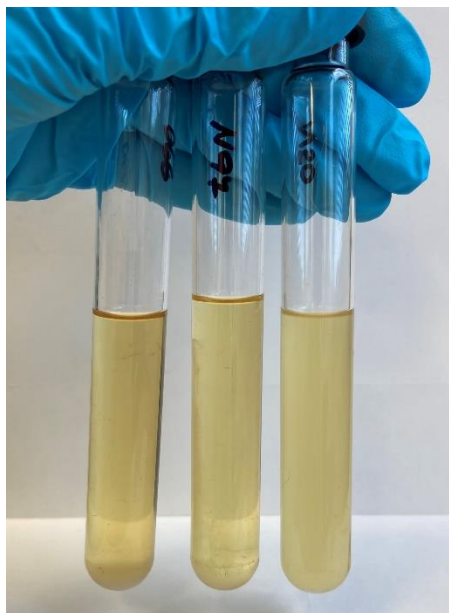
4.3.1.1 Barvení podle Grama

Barvení podle Grama zlepšuje kontrast zobrazení bakteriální kultury a zároveň umožňuje klasifikaci pozorovaných buněk na základě odlišnosti struktury jejich buněčné stěny. U zapáleného kahanu na podložním sklíčku byla připravena kapka vody, ve které byla pomocí kličky rozetřena část kolonie/kultury analyzovaného izolátu. Po zaschnutí bylo vše zafixováno, a to 3x přetažením sklíčka plamenem kahanu. Na preparát byla nanášena violet (5 g krystalové violeti, Lachema n.p., Česká republika; 200 ml 96% etanolu; 1% roztok šťavelanu amonného, Lach-Ner s.r.o., Česká republika) a necháno po 30 vteřin působit (barvení). Po 30 vteřinách byl přidán Lugolův roztok (2 g jodidu draselného, Lachema n.p.; 1 g jódu, Lach-Ner s.r.o.; 300 ml destilované vody) a zase ponechán 30 vteřin působit. Po uplynutí bylo vše opláchnuto vodou a následně odbarveno etanolem (Penta, Česká republika) 3x3 vteřiny a následně opět opláchnuto vodou. Následně byl preparát dobarven fuschinem (5 g bazického roztoku fuschinu, Lachema n.p., Česká republika; 100 ml 96% etanolu; destilovaná voda v poměru 1:4) po dobu 2 minut a opláchnut poté vodou. Před mikroskopováním byl přidán imersní olej (Nikon) a preparát byl poté vyšetřen v mikroskopu s imerzním objektivem (100x).

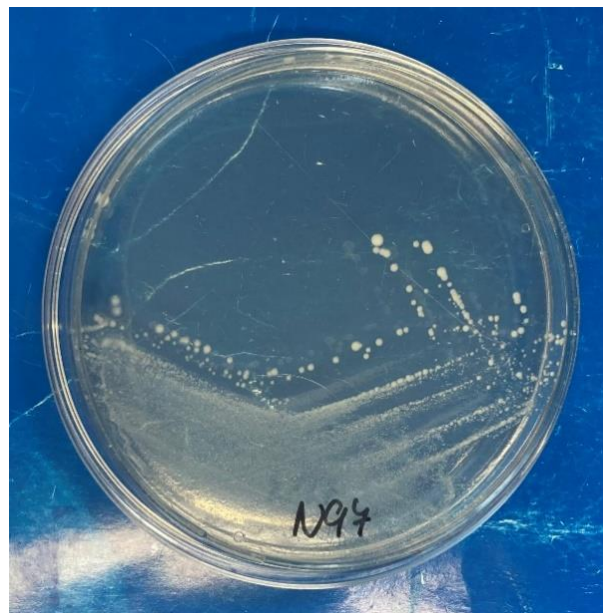
4.3.2 Makroskopická analýza – popis kolonií

Pro hodnocení makroskopických vlastností bifidobakteriálních izolátů byl testován růst kolonií na a v agaru. Byly připraveny čerstvě narostlé čisté kultury (**Obrázek 6**), které byly dále zaočkovány na/do WSP agar dvěma způsoby. Při prvním způsobu testování byly kultury rozetřeny 10 µl kličkou na velkou Petriho misku s předem připraveným WSP agarem (**Obrázek 7**). Druhým způsobem bylo sériové rozředění kultury do 10⁻⁸ buněk a její zaočkování po 0,5 ml do malých Petriho misek s následným přelitím WSP agarem. Takto připravené Petriho misky byly kultivovány za anaerobních podmínek dnem vzhůru v anaerostatu po dobu

48 hodin při 37 °C. Po proběhlé kultivaci byly hodnoceny kultivační znaky narostlých kolonií (barva, velikost, elevace, ohraničení, aroma).



Obrázek 6: Čerstvě narostlé kultury ve WSP bujónu (A. Andryšová)



Obrázek 7: Narostlé kultury bifidobakterií na WSP agaru v Petriho miskách připravené křížovým rozetřem (A. Andryšová)

4.3.3 Hodnocení fyziologických vlastností – O₂, teplota a pH

V rámci hodnocení fyziologických vlastností byl testován vztah izolátů ke kyslíku, teplotě a pH. Pro každý test byla připravena čerstvě narostlá čistá kultura, která byla zaočkována do WSP bujónu/agaru. Pro test vztahu bifidobakteriálních izolátů ke kyslíku, byly připraveny různé podmínky kultivace – anaerobní, mikroaerofilní a aerobní. Kultury bifidobakterií byly zaočkovány po 20 µl do 180 µl WSP bujónu v mikrotitrační destičce vždy v triplicátech. První varianta byla kultivována za aerobních podmínek jen přiklopená víkem. Pro druhou byly připraveny anaerobní podmínky pomocí GENbag anaer (bioMérieux, Francie). Mikroaerofilní podmínky byly pro třetí destičku připraveny pomocí CampyGen vyvíječe (bioMérieux). Takto inokulované destičky byly kultivovány při 37 °C v termostatu po dobu 48 hodin. Měření optické denzity bylo provedeno přístrojem Tecan Infinite M200 spektrometr (Tecan Group, Švýcarsko) při vlnové délce 600 nm po 24 a 48 hodinách. Druhou variantou hodnocení vztahu kultur ke kyslíku byla jejich kultivace ve WSP agaru, a to buď natřením kultury na agar, nebo jejím přelitím (viz kapitola 4.3.2). Podmínky kultivace byly zajištěny stejně jako pro testování v mikrotitračních destičkách. Výsledek byl poté pro tuto variantu odečten pouze vizuálně s mikroskopickou kontrolou narostlých kolonií.

Analogickým způsobem byl hodnocen vliv teploty na růst bifidobakteriálních izolátů, který byl proveden za optimálních podmínek růstu bifidobakterií, tedy anaerobních podmínek, pomocí GENbag anaer a byl testován při teplotách 20, 25, 30, 37, 46 a 49 °C. Kultury bifidobakterií byly zaočkovány po 20 µl do 180 µl WSP bujónu v mikrotitrační destičce vždy v triplicátech. Takto inokulované destičky byly kultivovány při různých při již zmíněných

hodnotách teplot v termostatech po dobu 48 hodin. Poté byla měřena optická denzita přístrojem Tecan Infinite M200 při vlnové délce 600 nm po 24 a 48 hodinách.

Pro test citlivosti bifidobakteriálních izolátů k pH byl připraven WSP bujón celkem o 9 hodnotách pH: 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 6,5, 7,5, 8,5 a 9,0. Pro vytvoření dané hodnoty pH byla použita kyselina octová (Sigma-Aldrich) a 1% NaOH (Lach-Ner s.r.o.). Připravované roztoky byly měřeny pH metrem Checker Plus (Hanna Instruments, Česká republika). Následně byly kultury bifidobakterií byly zaočkovány po 20 μ l do 180 μ l WSP média a dané hodnotě pH v mikrotitrační destičce. Pro vytvoření anaerobních podmínek byl opět použit GENbag anaer. Inokulované destičky byly kultivovány při 37 °C v termostatu po dobu 48 hodin. Měření optické denzity bylo provedeno opět přístrojem Tecan Infinite M200 spektrometr při vlnové délce 600 nm po 24 a 48 hodinách.

Pro vyhodnocení schopnosti růstu za daných podmínek byla vytvořena škála pro interpretaci naměřených hodnot absorbance s odečtem negativních kontrol: –, žádný nárůst ($\leq 0,15$); +, slabý nárůst (0,16–0,29); ++, dobrý nárůst (0,30 \leq).

4.4 MALDI-TOF MS

Pro ověření identity bifidobakteriálních izolátů byla rutinně prováděna MALDI-TOF MS. U zapáleného kahanu byl sterilní jehlou odebrán 1 ml kultury do zkumavky, který byl na centrifuze stočen při 14 500 otáčkách po dobu 2 minut. Poté co byl slit supernatant, byla usazená peleta resuspendována v 500 μ l 70% etanolu. Roztok resuspendované pelety s etanolem byl zvortexován a znovu stočen při 14 500 otáčkách po dobu 2 minut. Etanol byl poté odstraněn a zbylá peleta nechána vyschnout po dobu 10 minut. Resuspendace pelet po vysušení byla provedena v 15 μ l 70% kyseliny mravenčí (Honeywell, Německo), ke které bylo poté přidáno 15 μ l acetonitrilu (Honeywell). Po zvortexování bylo provedeno stočení vzorků opět při 14 500 otáčkách po dobu 2 minut. Poté byl 1 μ l supernatantu ve dvou kopiích napipetován na připravenou MALDI destičku. Poté co vzorek zcela zaschnul, byl překryt 1 μ l HCCA matricí (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, Sigma-Aldrich) dle návodu Bruker Daltonik (Bruker Daltonik, Německo). Po zaschnutí byla destička se vzorky změřena pomocí software Bruker Biotyper (Bruker Daltonik). Získaná naměřená spektra byla následně srovnána s databází BRUKER a také s rozšířenou databází pro identifikaci bifidobakterií (Modrackova et al., 2021) a na základě jejich podobnosti (score, **Tabulka 3**) byla ověřena identita testovaných kmenů.

Tabulka 3: Bruker kritéria (score), MALDI-TOF MS

Rozsah hodnot (score)	Identifikace
0,00–1,69	Není spolehlivá identifikace
1,70–1,99	Identifikace na úroveň rodu
2,00–3,00	Identifikace na úroveň druhu

4.5 Genotypová charakterizace

Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány kmeny na základě již proběhlých analýz pro identifikaci neznámých kultur a následný popis nového druhu. U všech kultur testovaných v této práci tedy již dříve proběhlo sekvenování genu 16S rRNA, složení sekvencí a jejich srovnání s veřejně dostupnými databázemi (Modrackova et al., 2021). Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulce (**Tabulka 2**). V rámci této bakalářské práce a genotypových charakterizací poté byla izolována a připravena DNA pro budoucí celogenomové sekvenování popisovaných druhů.

4.5.1 Izolace DNA pro celogenomové sekvenování

Pro izolaci DNA byl použit **FastDNA SPIN Kit** (MP Biomedicals, USA) a postup definovaný výrobcem s modifikací vstupního vzorku. 1 mL čerstvě narostlé kultury bifidobakterie byl stočen na centrifuze při rychlosti 14 000 otáčkách po dobu 2 minut, supernatant byl slit a pelety byly poté resuspendovány v 978 μ L roztoku Sodium Phosphate Buffer (MP Biomedicals) a následně převedeny do Lysing Matrix E tube (MP Biomedicals). Poté byl postup shodný s postupem uvedeným výrobcem. Získaná vyizolovaná DNA byla následně uložena při -20 °C a připravena tak pro budoucí celogenomové sekvenování.

5 Výsledky

Pro tuto práci bylo vybráno 5 potenciálně nových druhů bifidobakterií, u nichž byla provedena dílčí část analýz na základě minimálních standardů pro popis nového druhu v rámci rodu *Bifidobacterium*.

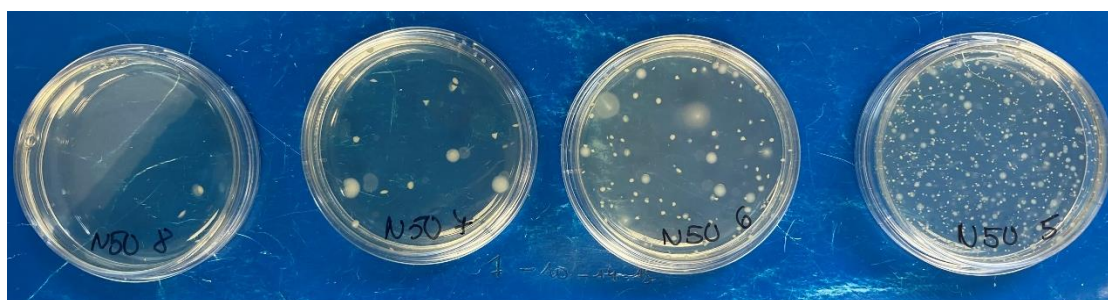
5.1 Fenotypová charakterizace

5.1.1 Kultivační a morfologická analýza

V rámci kultivační a morfologické analýzy byla nejprve úspěšně ověřena čistota všech testovaných bifidobakteriálních izolátů. Jejich potenciál nového druhu byl navíc také úspěšně ověřen pomocí MALDI-TOF MS. V rámci morfologické analýzy bylo potvrzeno, že všechny testované kmeny bakterií byly Gram-pozitivní, nepohyblivé a nesporulující. Všechny také měly tyčinkovitý tvar buněk, délky a tvar se však lišil. Nejčastěji se jednalo o krátké nebo dlouhé nepravidelné tyčinky, mnohdy i rozvětvené tvořící shluky. V rámci kultivační analýzy lze shrnout podobný trend charakteristik pro všechny testované kmeny. Kolonie izolátů byly bílé a kruhové, zatímco kolonie rostoucí v agaru byly bílé a eliptické. Dále jsou podrobně uvedeny podrobné charakteristiky pro konkrétní testované kmeny potenciálně nových druhů bifidobakterií.

- **Kmen N50**

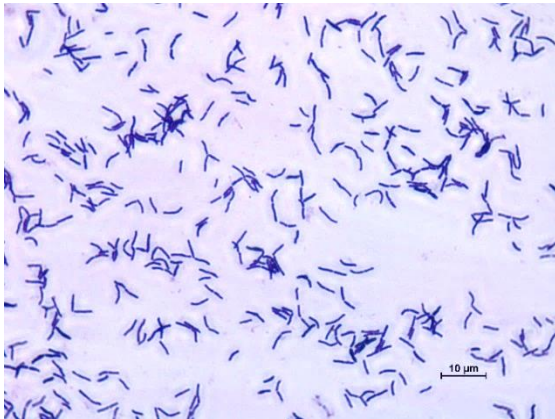
Dobře izolované kolonie kmenu N50 vykultivované na povrchu WSP agaru za anaerobních podmínek byly bílé, neprůhledné, hladké a kruhové s celými okraji nebo mléčně zakalené s neurčitým okrajem, zatímco kolonie narostlé v agaru byly většinou drobné, čočkovité nebo eliptické (**Obrázek 8**). Kolonie dosahovaly průměru cca 2,68 mm na povrchu agaru, zatímco 0,90 mm v agaru.



Obrázek 8: Vykultivované kolonie kmenu N50. Rozředěná inokula byla přelita WSP agarem (zleva: od nejvyšší koncentrace buněk po nejnižší) (A.Andrýsová)

Po kultivaci v WSP bujónu byl zákal střední s velkým sedimentem na dně zkumavky. Při morfologické analýze bylo potvrzeno, že kmen N50 patří do skupiny Gram-pozitivních tyčinek (**Obrázek 9**). Buňky vypadaly jako tyčinky různých tvarů, také tvořící typicky bifidní tvar, krátké i dlouhé a na konci zakulacené, některé ve tvaru písmene V a Y,

netvořící velké shluky (**Obrázek 10**). Buňky kmenu N50 měly průměrnou délku 2,15–9,62 μm a šířku 1,42 μm .



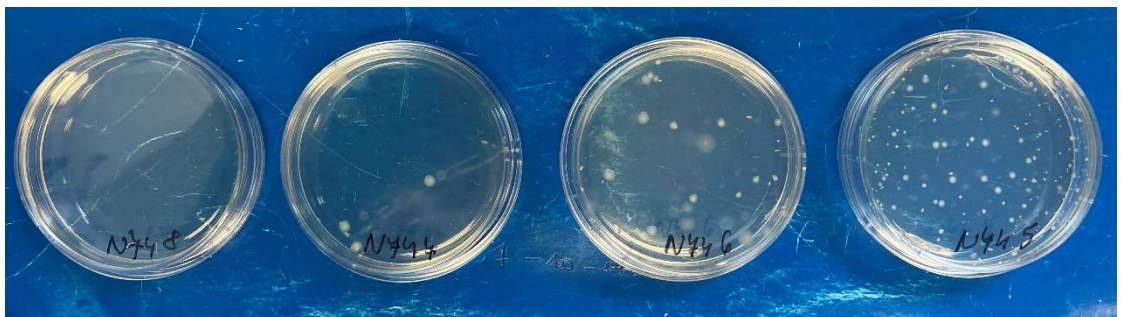
Obrázek 9: Kmen N50 připravený pomocí Gramova barvení (A. Andryšová)



Obrázek 10: Kmen N50 v mikroskopu s fázovým kontrastem, krátké a dlouhé tyčinky (A. Andryšová)

- **Kmen N74**

Dobře izolované kolonie kmenu N74 vykultivované na povrchu WSP agaru za anaerobních podmínek byly mléčné, neprůhledné, s bílým vypouklým středem, hladké, lesklé a kruhové bez celých okrajů, kolonie narostlé v agaru byly malé bílé, čoučkovité nebo eliptické, ale také mléčné kruhové (**Obrázek 11**). Kolonie dosahovaly průměru 2,23 mm na povrchu agaru, zatímco 0,78 mm v agaru.

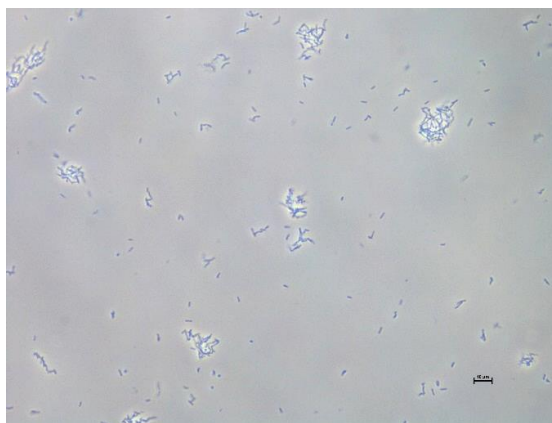


Obrázek 11: Vykultivované kolonie kmenu N74. Rozředěná inokula byla přelita WSP agarem (zleva: od nejvyšší koncentrace buněk po nejnižší) (A. Andryšová)

Při kultivaci v WSP bujónu byl zákal silný se silným sedimentem na dně zkumavky. Při morfologické analýze bylo potvrzeno, že kmen N74 patří do skupiny Gram-pozitivních tyčinek (**Obrázek 12**). Buňky vypadaly jako krátké nepravidelné tyčinky, často tvořící krátké řetězky, které byly v některých případech rozvětvené a mohou tvořit i shluky více buněk (**Obrázek 13**). Buňky kmenu N74 měly průměrnou délku 1,68–4,81 μm a šířku 0,93 μm .



Obrázek 12: Kmen N74 připravený pomocí Gramova barvení (A. Andrášová)



Obrázek 13: Kmen N74 v mikroskopu s fázovým kontrastem, rozvětvené tyčinky (A. Andrášová)

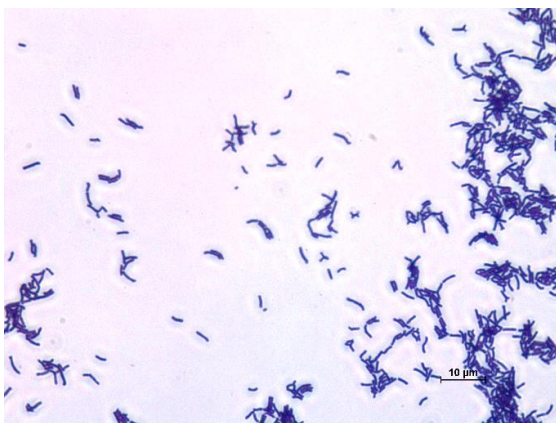
- **Kmen N97**

Kmen N97 měl dobře izolované kolonie vykultivované na povrchu WSP agaru za anaerobních podmínek vypouklé, neprůhledné bílé, kruhové s celými hladkými okraji, zatímco zapuštěné kolonie byly drobné čoučkovité nebo eliptické (**Obrázek 14**). Kolonie na povrchu agaru dosahovaly průměru 1,51 mm, zatímco 0,71 mm v agaru.

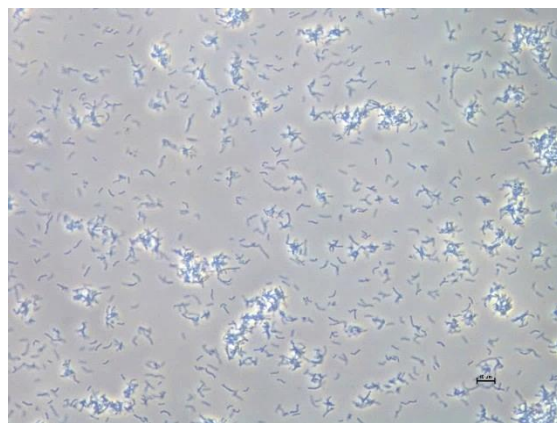


Obrázek 14: Vykultivované kolonie kmenu N97. Rozředěná inokula byla přelita WSP agarem (zleva: od nejvyšší koncentrace buněk po nejnižší) (A. Andrášová)

Při kultivaci v WSP bujónu byl zákal mírný se sedimentem na dně zkumavky. Při morfologické analýze bylo potvrzeno, že kmen N97 patří do skupiny Gram-pozitivních tyčinek (**Obrázek 15**). Buňky měly rozvětvenou strukturu s tyčinkami ve tvaru V a Y, které byly zaoblené na konci, často tvořící agregáty (**Obrázek 16**). Buňky kmenu N97 měly průměrnou délku 2,38-7,85 μm a šířku 0,93 μm .



Obrázek 15: Kmen N97 připravený pomocí Gramova barvení (A. Andryšová)



Obrázek 16: Kmen N97 v mikroskopu s fázovým kontrastem, agregáty (A. Andryšová)

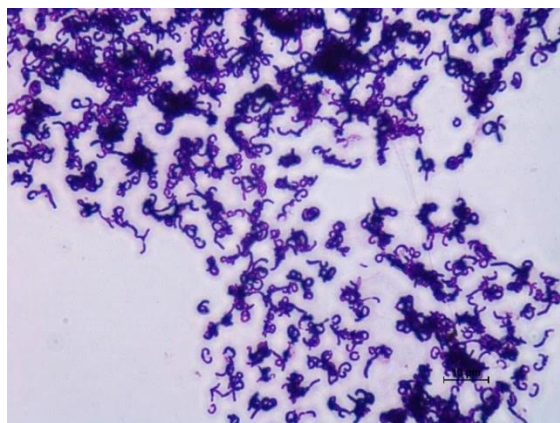
- **Kmen N115**

Jednotlivé dobře izolované kolonie kmenu N115, které byly vykultivované na povrchu WSP agaru za anaerobních podmínek byly bílé, neprůhledné, hladké a kruhové s celými okraji, ale i kruhové bez celých okrajů a vypouklým bílým středem, zatímco zapuštěné kolonie byly drobné čočkovité, eliptické nebo mléčné kruhové (**Obrázek 17**). Kolonie na povrchu agaru dosahovaly průměru 2,15 mm, zatímco 0,55 mm v agaru.

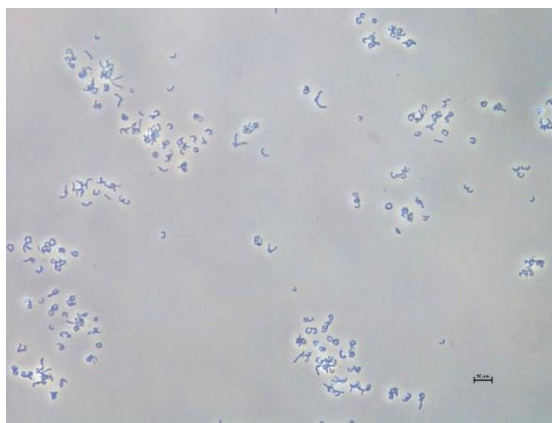


Obrázek 17: Vykultivované kolonie kmenu N115. Rozředěná inokula byla přelita WSP agarem (zleva: od nejvyšší koncentrace buněk po nejnižší) (A. Andryšová)

Při kultivaci v WSP bujónu byl zákal mírný se sedimentem na dně zkumavky. Při morfológické analýze bylo potvrzeno, že kmen N115 patří do skupiny Gram-pozitivních tyčinek (**Obrázek 18**). Buňky tvořily nepravidelně tvarované tyčinky, které neodpovídaly běžnému bifidnímu tvaru, ale byly zakrouceny do tvarů C a O (**Obrázek 19**). Délka těchto bakterií se pohybovala od 4,83 do 8,61 μm a šířka byla v průměru 1,57 μm .



Obrázek 18: Kmen N115 připravený pomocí Gramova barvení (A. Andrášová)



Obrázek 19: Kmen N115 v mikroskopu s fázovým kontrastem, neobvyklý tvar tyčinek (A. Andrášová)

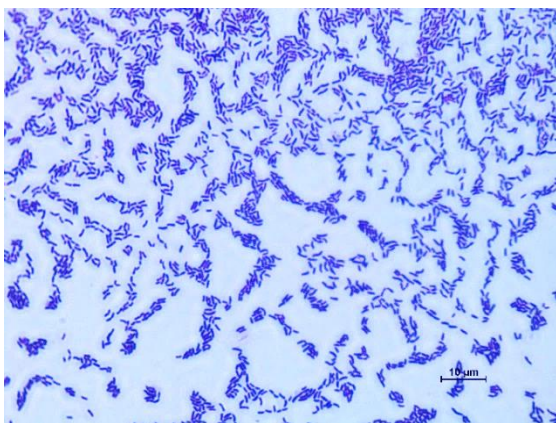
- **Kmen GLT066**

Za anaerobních podmínek na WSP agaru byly vykultivované dobře izolované kolonie, které byly bílé, neprůhledné, hladké a kruhové s celými okraji, zatímco zapuštěné kolonie byly čočkovité nebo eliptické (**Obrázek 20**). Kolonie na povrchu agaru dosahovaly průměru 2,32 mm, zatímco 0,84 mm v agaru.

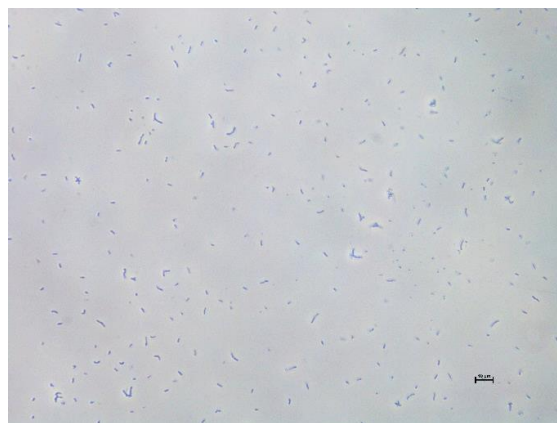


Obrázek 20: Vykultivované kolonie kmenu GLT066. Rozředěná inokula byla přelita WSP agarem (zleva: od nejvyšší koncentrace buněk po nejnižší) (A. Andrášová)

Při kultivaci v WSP bujónu byl zákal mírný se sedimentem na dně zkumavky. Při morfologické analýze bylo potvrzeno, že kmen GLT066 patří do skupiny Gram-pozitivních tyčinek (**Obrázek 21**). Buňky tvořily velmi krátké tyčinky bifidního tvaru, na konci kulaté, netvořící shluky (**Obrázek 22**). Délka těchto krátkých tyčinek se pohybovala v průměru 2,98 μm a šířka byla v průměru 1,17 μm .



Obrázek 21: Kmen GLT066 připravený pomocí Gramova barvení (A. Andryšová)



Obrázek 22: Kmen GLT066 v mikroskopu s fázovým kontrastem, krátké tyčinky (A. Andryšová)

5.1.2 Hodnocení fyziologických vlastností

Na základě testování fyziologických vlastností lze konstatovat, že optimální podmínky pro růst všech testovaných potenciálně nových druhů bifidobakterií byly shledány jako anaerobní prostředí, pH 6,5 a teplota 37 °C.

5.1.2.1 Vztah izolátů k přítomnosti kyslíku

Pro hodnocení vztahu potenciálně nových druhů bifidobakterií ke kyslíku, byly nejprve izoláty kultivovány jako rozetřená kultura na agaru a také přelitím kultury agarem. Za anaerobních podmínek výborně rostly všechny testované kmeny, stejně jako při mikroaerofilních podmínkách ve variantě přelití. V případě mikroaerofilních podmínek a kultivaci na povrchu agaru byly schopny růstu pouze kmeny N50, N74 a N97, zatímco kmeny N115 a GLT066 nikoliv. Při kultivaci za aerobních podmínek nebyl schopen růstu žádný z testovaných kmenů v obou variantách.

Druhým testem pro testování vztahu izolátů k přítomnosti kyslíku byla jejich kultivace v mikrotitračních destičkách (**Tabulka 4**). Tyto výsledky potvrdily předchozí testování v Petriho miskách. Všechny kmeny byly schopny růstu za anaerobních podmínek. Za podmínek mikroaerofilních dobře rostly kmeny N50, N74 a N97, zatímco kmeny N115 a GLT066 nikoliv. Za aerobních podmínek kmeny schopny růstu nebyly s výjimkou kmene N97, který vykazoval drobný růstový potenciál i za těchto podmínek.

Lze tedy shrnout, že buňky rostly nejen za anaerobních podmínek, ale některé i za mikroaerofilních. Za optimální podmínky pro růst lze tedy považovat anaerobní.

Tabulka 4: Hodnocení vztahu bifidobakteriálních izolátů k přítomnosti kyslíku v prostředí

Izolát	Anaerobní		Mikroaerofilní		Aerobní	
	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod
N50	++	++	++	++	–	–
N74	++	++	++	++	–	–
N97	++	++	++	++	+	+
N115	–	+	–	–	–	–
GLT066	+	+	–	–	–	–

Pozn.: Nárůst byl hodnocen tímto způsobem: –, žádný nárůst ($\leq 0,15$); +, slabý nárůst ($0,16-0,29$); ++, dobrý nárůst ($0,30 \leq$). Každé měření bylo provedeno v triplicátech s odečtením hodnot negativních kontrol. Hodnoty byly vyjádřeny jako průměry se směrodatnými odchylkami, které byly následně interpretovány dle stanoveného rozmezí.

5.1.2.2 Vztah izolátů k teplotám

Pro hodnocení vztahu k různým teplotám byly bifidobakteriální kmeny také kultivovány v mikrotitračních destičkách (**Tabulka 5**). Všechny testované kmeny, kromě kmenu N115, byly schopny růst v rozmezí teplot 30–46 °C. Teplota 37 °C byla vyhodnocena jako nejvhodnější pro kultivaci všech testovaných bifidobakterií. Kmen N74 byl schopen růst v nejširším teplotním rozmezí 25–46 °C.

Tabulka 5: Hodnocení růstu bifidobakteriálních izolátů za různých teplotních podmínek

Izolát	N50		N74		N97		N115		GLT066	
	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod
20 °C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25 °C	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
30 °C	++	++	++	++	++	++	–	–	+	+
37 °C	++	++	++	++	++	++	–/+*	–/+*	++	++
46 °C	++	++	+	+	++	++	–	–	+	+
49 °C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Pozn.: Nárůst byl hodnocen tímto způsobem: –, žádný nárůst ($\leq 0,15$); +, slabý nárůst ($0,16-0,29$); ++, dobrý nárůst ($0,30 \leq$). Každé měření bylo provedeno v triplicátech s odečtením hodnot negativních kontrol. Hodnoty byly vyjádřeny jako průměry se směrodatnými odchylkami, které byly následně interpretovány dle stanoveného rozmezí. * kmen N115 nebyl schopen růstu v mikrotitračních destičkách, nicméně byl schopen růstu za anaerobních podmínek na/v WSP agaru.

5.1.2.3 Vztah izolátů k pH

V mikrotitračních destičkách byl hodnocen také vztah testovaných kmenů bifidobakterií k pH (**Tabulka 6**). Různé pH mělo také velký vliv na růst bifidobakterií. Všechny testované kmeny, opět kromě kmenu N115, byly schopny růst v rozmezí hodnot pH 5,0–9,0. Hodnota pH 6,5 byla vyhodnocena jako nejoptimálnější pro kultivaci všech testovaných bifidobakterií. Schopnost růstu v nejširším rozpětí pH 4,5–9,0 vykazovaly kmeny N74 a GLT066, zatímco kmeny N50 a N97 rostly v rozmezí hodnot pH 5,0–9,0.

Tabulka 6: Hodnocení citlivosti bifidobakteriálních izolátů k hodnotám pH

Izolát	N50		N74		N97		N115		GLT066	
	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod
pH 3,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
pH 4,0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
pH 4,5	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+
pH 5,0	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+
pH 6,0	++	++	+	+	+	+	–	–	++	++
pH 6,5	++	++	++	++	++	++	–/+*	–/+*	++	++
pH 7,5	++	++	++	++	+	+	–	–	++	++
pH 8,5	++	++	++	++	+	+	–	–	+	+
pH 9,0	++	++	++	++	+	+	–	–	+	+

Pozn.: Nárůst byl hodnocen tímto způsobem: –, žádný nárůst ($\leq 0,15$); +, slabý nárůst (0,16–0,29); ++, dobrý nárůst ($0,30 \leq$). Každé měření bylo provedeno v triplicátech s odečtením hodnot negativních kontrol. Hodnoty byly vyjádřeny jako průměry se směrodatnými odchylkami, které byly následně interpretovány dle stanoveného rozmezí. * kmen N115 nebyl schopen růstu v mikrotitračních destičkách, nicméně byl schopen růstu za anaerobních podmínek na/v WSP agaru.

6 Diskuse

Bifidobakterie běžně kolonizující trávicí trakt většiny savců a jsou považovány za důležitou součást jejich střevní mikrobioty (Pokusaeva et al. 2011). Avšak můžeme je nalézt i u nejrůznějších druhů hmyzu (Chen et al. 2021; Olofsson et al. 2023) a ptáků (Lugli et al. 2021). V současné době se nové druhy popisují zejména z mikrobioty novosvětských opic (NWM), mezi které patří například tamaríni a lvíčci, jež byli zdrojem izolátů pro popis nového druhu i v této práci. Konkrétně se jednalo o hostitele tamarína sedlového, tamarína vousatého, tamarína bělovousého, tamarína žltorukého a lvíčka zlatého. Také kosman stříbrný, gueráza pláštíková a tamarín pestrý (Lugli et al. 2021) jsou dalšími hostiteli, ze kterých byly v nedávné době nové druhy bifidobakterií popsány. Tento trend popisu nových druhů z NWM potvrzuje i Modrackova et al. (2021), kteří při popisu střevního mikrobiomu NWM a starosvětských (OWM) opic ze zoologických zahrad odhalili přítomnost potencionálně nových druhů bifidobakterií. V této publikaci popisované izoláty (N50, N74, N97, N115 a GLT066) s ponciálem nového druhu proto byly vybrány pro další charakterizaci i v rámci této práce. Také Lugli et al. (2021), Neuzil-Bunesova et al. (2021) a Duranti et al. (2020) popsali nové druhy bifidobakterií z NWM. Tento trend je zřejmě podpořen i vysokým zastoupením bifidobakterií v jejich střevní mikrobiotě, které je až o několik řádů vyšší ve srovnání s počty u OWM (Modrackova et al. 2021). Nicméně některým skupinám zabývajícím se popisem nového druhu se přesto podařilo nalézt a popsat nový druh bifidobakterií i z hostitele patřícího do skupiny OWM, konkrétně například ze šimpanze a kočkodana (Neuzil-Bunesova et al. 2021).

Bifidobakterie jsou Gram-pozitivní, nepohyblivé, nepravidelné tyčinky, většinou striktně anaerobní (Turroni et al. 2012; Bäckhed et al. 2015; Mei et al. 2022). Typický tvar bifidobakterií, jinak také bifidní, jsou krátké nebo dlouhé, zakřivené nebo rovné, válcovitého tvaru na konci zaoblené buňky (Gomes & Malcata 1999; Lee & O'Sullivan 2010). Mohou se formovat do tvarů písmene V nebo Y, spojovat se do řetízků nebo agregátů. Stejně morfológické znaky byly objeveny také u námi popisovaných kmenů, konkrétně u N50, N74, N97 a GLT066. Je zajímavé, že jediný kmen N115 měl své buňky stočené do klubíček, což není typický znak bifidobakterií. Tato morfológická anomálie byla popsána již dříve také u Duranti et al. (2020) u *B. leontopithecii*. Je zajímavé, že tento druh bifidobakterie byl navíc schopen růst i za aerobních podmínek, což je atypické pro bifidobakterie. Morfológické vlastnosti buněk je nezbytné popisovat při zajištění kultivace v optimálních podmínkách, které jsme zajistili pro všechny naše testované izoláty. Byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin za anaerobních podmínek a pH média 6,5.

Při hodnocení schopnosti agregace, bylo zjištěno, že některé naše kmeny neagregují, konkrétně N50 a GLT066. Schopnost agregovat znamená, že se bakterie mohou shlukovat do skupin nebo formovat agregáty (Canzi et al. 2005). Například u druhu *B. bifidum* a *B. longum* byla již dříve popsána agregace (Vlková et al. 2008). Také *B. thermophilum* je druh tvořící snadno rozptýlitelné agregáty (Dong et al. 2000). Obecně je schopnost agregace bakterií spojována s jejich probiotickými vlastnostmi, což potvrzuje i Krausova et al. (2019) u některých kmenů laktobacilů. González-Rodríguez et al. (2012) objevili, že po oštření proteinázou K u *B. bifidum* byla schopnost agregace odstraněna, což naznačuje zapojení povrchově exponovaných proteinů do agregačního fenotypu. Agregace může být důležitá pro bakteriální kolonizaci

a interakci s hostitelským organismem (Canzi et al. 2005). Je důležité si uvědomit, že schopnost agregace se může lišit mezi různými kmeny nebo kmenovými variantami bifidobakterií a může být ovlivněna různými faktory, jako jsou podmínky prostředí, přítomnost dalších mikroorganismů nebo genetické vlastnosti jednotlivých kmenů (Canzi et al. 2005; Vlková et al. 2008). Je tedy možné, že námi pozorované neagregující kmeny, byly ovlivněny prostředím či dalšími faktory a tudíž neagregovaly. Dále bylo v rámci hodnocení kultivačních znaků zjištěno, že kolonie rostoucí na agaru u všech testovaných kmenů vykazovaly shodné charakteristiky. Jednalo se převážně o bílé, lesklé, hladké, kruhové kolonie s plnými okraji. Stejně tak kolonie rostoucí v agaru se u našich kmenů značně podobaly. Zde se jednalo o eliptické nebo čočkovité drobné útvary bílé barvy. Velmi podobný vzhled kolonií pozorovali i Modesto et al. (2020b), Neuzil-Bunesova et al. (2020) a Duranti et al. (2019), zatímco například Eckel et al. (2020) popsali kolonie *B. tibiigranuli* jako vypouklé a neprůhledné bílé a o průměru 1–2 mm (Eckel et al. 2020). Zajímavě popsány byly dříve i kolonie u *B. bohemicum*. Tyto kolonie byly krémové barvy, kruhového tvaru s ostrými celistvými okraji, často s malými nepravidelnými jádry (Killer et al. 2011). Nicméně lze shrnout, že vzhled kolonií bifidobakterií izolovaných z gastrointestinálního traktu na a v agaru při zajištění optimálních podmínek růstu je většinou značně uniformní.

Vzhledem k tomu, že bifidobakterie jsou považovány za striktně anaerobní mikroorganismy (Mei et al. 2022), bylo překvapivé, že některé námi testované kmeny vykazovaly výbornou růstovou schopnost také za mikroaerofilních podmínek. Jednalo se konkrétně o kmeny N50, N74 a N97. Na to poukázali také Neuzil-Bunesova et al. (2020), kde nově popsány druhy *B. moraviense*, *B. oedpodis*, *B. olomucense*, *B. panos* také dobře rostly za mikroaerofilních podmínek. Stejná schopnost byla popsána také u druhů *B. canis* (Neuzil-Bunesova et al. 2020), *B. aemilianum* (Alberoni et al. 2019) a *B. commune* (Praet et al. 2015). Naopak některé dříve popsány druhy bifidobakterií v mikroaerofilních podmínkách nebyly schopny růstu, např. *B. xylocopae* (Alberoni et al. 2019), *B. bohemicum* (Killer et al. 2011) a *B. bombi* (Killer et al. 2009), stejně jako námi testované kmeny N115 a GLT066. Je zajímavé, že kmen N115 dokonce nebyl schopen růst ani v mikrotitrační destičce, zatímco v Petriho miskách na a v agaru a tekutém bujónu rostl velmi dobře. Je proto nezbytné při další charakterizaci tohoto kmene otestovat jeho schopnosti ve větších objemech, a tedy zřejmě i za stabilnějších anaerobních podmínek. Tento kmen nebyl schopen růstu ani v rámci dalších dílčích testů v mikrotitračních destičkách. Je zajímavé, že existují dokonce i výjimky, jako například *B. castoris*, *B. callimiconis* (Duranti et al. 2019) a *B. cebidarum* (Duranti et al. 2020), které jsou schopny růst i za přístupu kyslíku. Za přístupu kyslíku slabě rostl i námi testovaný kmen N97.

Za optimální teplotu růstu pro bifidobakterie se obecně považuje teplota 37 °C (Gomes & Malcata 1999), na což poukazuje také Lugli et al. (2021) a Neuzil-Bunesova et al. (2021). Při této teplotě bifidobakterie vykazují největší růstovou kapacitu. Výjimku uvádějí Chen et al. (2021) a Alberoni et al. (2019) u jimi testovaných kmenů, a to optimální teplotu růstu při 35 °C. Zároveň již bylo také zjištěno, že některé kmeny bifidobakterií živočišného původu jsou schopny růst při vyšších teplotách od 41–43 °C, ve srovnání s kmeny lidského původu, které rostou při 36–38 °C (Ventura et al. 2004). Nicméně to v rámci testování našich kmenů nebylo potvrzeno. Také Olofsson et al. (2023) zmiňují optimální růst při teplotě 37 °C, za anaerobních podmínek. Námi testované kmeny v tom nebyly výjimkou, až na kmen N115.

Zajímavé je, že kmen N115 nebyl schopen růst za žádné z testovaných teplot v mikrotitračních destičkách. Je tedy nezbytné znovu otestovat schopnosti růstu tohoto kmene za různých teplotních podmínek ve větších objemech. Zatímco kmeny N50, N74 a N97 dobře rostly už při 30 °C. Toto pozorovali i Duranti et al. (2020). Chen et al. (2021), dokonce zmiňují, že všechny jimi testované kmeny bifidobakterií rostly v teplotním rozmezí 20–42 °C. Což je větší teplotní rozmezí než u námi testovaných kmenů, které bylo 30–46 °C. Je zajímavé, že námi testované kmeny N50 a N97 při 46 °C vykazovaly dobrý nárůst. Tato teplota se objevuje i u Modesto et al. (2020a), kdy u druhů *B. samiriisciurei* a *B. platyrrhinorum* nejvyšší teplota umožňující jejich růst byla též 46 °C. Dále je zajímavé, že náš kmen N74 vykazoval největší teplotní škálu, neboť slabě rostl už při 25 °C a dokonce i při 46 °C. Stejný teplotní rozsah pro růst pozorovali například i Modesto et al. (2020b) u druhu *B. choloepi*. Většina bifidobakterií je tedy schopna růst nejen za již zmíněných optimálních podmínek při 37 °C, ale dokáže se poměrně značně adaptovat vnějšímu prostředí.

Optimální pH pro růst bifidobakterií je podle Gomes & Malcata (1999) pH 6–7. Tuto hodnotu pH potvrzuje poté dále i Eckel et al. (2020) a Neuzil-Bunesova et al. (2020). Modesto et al. (2020b) zmiňují jako optimální podmínky pro růst konkrétně druhu *B. choloepi* TPY bujón s hodnotou pH 7. Je zajímavé, že za těchto podmínek byl kmen schopen přežít a růst i v mikroaerofilních a aerobních podmínkách. Také naše kmeny rostly i při vyšších hodnotách pH, a to konkrétně pH 7,5, 8,5 a 9,0. Jednalo se o kmeny N50, N74 a GLT066. To potvrzuje i Neuzil-Bunesova et al. (2020), kdy druh *B. canis* rostl i při pH 7,5 a 8,5. Je zajímavé, že náš kmen N97 v těchto hodnotách pH vykazoval jen slabý nárůst. Další naše kmeny překvapivě vykazovaly slabý nárůst již při pH 4,5. Konkrétně se jednalo o kmeny N74, N97 a GLT066. Podobné výsledky prezentují i Eckel et al. (2020), při popisu druhu *B. tibiigranuli*. Za zajištění anaerobních podmínek byl tento druh schopen růst již za pH 4,0. Naopak u Neuzil-Bunesova et al. (2020), Duranti et al. (2020) a Modesto et al. (2020b) za podobných podmínek nebyly kmeny bifidobakterií schopny růstu vůbec. Existuje několik druhů bifidobakterií, které jsou známy svou schopností odolávat nízkému pH, a proto jsou často používány do jogurtových výrobků. Nejčastěji se jedná o druh *B. animalis* subsp. *lactis* (Ranadheera et al. 2010). Také druhy *B. bifidum* (Lourens-Hattingh & Viljoen 2001) a *B. breve* (Li et al. 2019) vykazovaly tyto schopnosti. Při pH 5,0 slabý nárůst vykazoval také náš kmen N50 a navázal tak na kmeny N74, N97 a GLT066. Tato hodnota pH se objevuje i u Duranti et al. (2019). Obecně lze shrnout, že nejširší škálu pH, ve které byl schopen růst, vykazoval kmen N74, který rostl slabě už při pH 4,5 a dobrý růst vykazoval i při pH 9,0. Stejně jako u dalších sledovaných znaků, kmen N115 opět nevykazoval nárůst při žádné z hodnot pH. Je tedy nezbytné při další charakterizaci tohoto kmene provést testy za stabilnějších podmínek a ve větších objemech. Námi testované bifidobakterie tedy preferují neutrální pH, ovšem dokážou přežít a růst i při mírném snížení pH, dokonce i zvýšení.

Obecně je důležité si uvědomit, že bifidobakterie ne vždy tvoří významnou část střevní mikrobioty svého hostitele (Killer et al. 2014; Modesto et al. 2015), a jejich izolace a stanovení počtu tudíž bývá leckdy obtížné. V současné době existuje mnoho přístupů k popisu střevní mikrobioty a také přítomných bifidobakterií. Pro kultivaci bylo vyvinuto již více než 20 médií sloužících jak pro jejich kvantifikaci a izolaci, ale také pro jejich charakterizaci při popisu potenciálně nového druhu. Teprve izolací bakteriálních kmenů v čisté kultuře lze totiž úspěšně charakterizovat jejich kultivační, morfologické, fyziologické a potencionální probiotické

vlastnosti. Jedná se o základní krok pro obecné i hlubší poznání bifidobakteri (Modesto 2018). V rámci popisu probiotických vlastností jsou důležité například schopnosti přežít průchod trávicím traktem (Horáčková et al. 2017), adheze a kolonizace, schopnost konkurence s patogenními mikroorganismy (Bunešová et al. 2012; Savitri & Lata 2021) a produkce antimikrobiálních látek (Ghanbari et al. 2013), které by i naše kmeny mohly potenciálně vykazovat. Je nicméně nezbytné tyto vlastnosti do budoucna dále testovat otestovat. Probiotika se pro jejich příznivý účinek na zdraví hostitele využívají jako doplňky stravy nejen u lidí, ale i zvířat, včetně opic, ze kterých byly naše kmeny izolovány. Konkrétní druhy probiotik používané u opic se mohou lišit v závislosti na specifických potřebách nebo zdravotních problémech dané populace opic (Lecker & Froberg-Fejko 2015; Gaponov et al. 2020). Hostitelsky specifická probiotika pro chov opic založená na bifidobakteriích nicméně zatím nejsou používána. Součástí momentálně používaných probiotik pro opice jsou například laktobacily, konkrétně *Lactobacillus reuteri*, v kombinaci s živými kvasinkami *Sacharomyces boulardii* (Lecker & Froberg-Fejko 2015). Naše bifidobakteriální kmeny by tedy mohly být potenciál pro jejich budoucí aplikaci touto cestou. Nicméně je nezbytné jejich další testování.

Opakem kultivačního přístupu popisu bifidobakterií pocházejících ze střevní mikrobioty je sekvenování nové generace či metagenomové sekvenování (Mailhe et al. 2018) celého mikrobiomu. Tímto způsobem je k popisu nového druhu postupováno od komplexního ke konkrétnímu, kdy jsou po zjištění informací o střevním mikrobiomu navrženy metodické postupy (například specifické substráty), kterými jsou posléze vykultivovány potenciálně nové druhy bifidobakterií, které jsou následně tradičním kultivačním způsobem charakterizovány (Milani et al. 2016; Lugli et al. 2019).

Pro úspěšný popis nového druhu bifidobakterie je nicméně do budoucna nezbytné provést další charakterizace a postupovat dle doporučených minimálních standardů pro popis nového taxonu podle Mattarelli et al. (2014)., Dále budou testovány například také substrátové preference (Degnan & Macfarlane 1991; Amaretti et al. 2006; Theilmann et al. 2019), enzymatický potenciál (Pereira-Caro et al. 2018), produkce metabolitů při utilizaci základních substrátů (Gopal et al. 2001; Garrido et al. 2013b) a bude provedeno také celogenomové sekvenování, které je v současnosti nezbytné pro popis nového druhu (Bottacini et al. 2010) a řada dalších analýz.

7 Závěr

Cílem této práce bylo v literární části shrnout základní informace o rodu *Bifidobacterium* a následný popis metodického postupu při identifikaci potencionálně nového druhu v rámci tohoto rodu. Dále podílet se na fenotypové a genotypové charakterizaci nově popisovaných druhů bifidobakterií na KMVD. Všechny cíle této bakalářské práce byly splněny a hypotéza byla částečně potvrzena. Provedené charakterizace zatím potvrzují, že se jedná o potenciálně nové druhy bifidobakterií, a připěly tak k jejich popisu. Je nicméně nezbytné dále pokračovat v dílčích analýzách dalších vlastností.

Při mikrobiologických rozborech fekálních vzorků z NWM byly detekovány potencionálně nové druhy bifidobakterií. Pro tuto práci bylo vybráno 5 izolátů, u kterých bylo dále ověřeno pomocí MALDI-TOF MS, že se nejedná o již popsany druh a mohly být tedy fenotypově a genotypově charakterizovány. Byla provedena kultivační a morfologická analýza a byly hodnoceny fyziologické vlastnosti. V rámci fyziologických vlastností byl hodnocen vztah izolátů k přítomnosti kyslíku, teplotám a hodnotám pH.

Anaerobní prostředí, teplota 37 °C a pH 6,5 byly stanoveny jako optimální podmínky pro kultivaci všech testovaných kmenů bifidobakterií. Kultury tvořily homogenní zákal se sedimentem na dně zkumavky bez zjevné tvorby agregátů. V rámci kultivační analýzy lze shrnout obdobný trend u všech testovaných kmenů. Kolonie vykultivované na povrchu agaru byly bílé, neprůhledné, hladké, lesklé a kruhové s plnými okraji, zatímco kolonie rostoucí v agaru byly drobné, bílé, čočkovité nebo eliptické. Při morfologické analýze byla potvrzena jejich příslušnost ke Gram-pozitivním bakteriím. Buňky většiny kmenů tvořily krátké tyčinky bifidního tvaru, na konci kulaté, často do tvaru písmene V a Y. Výjimkou byl kmen N115, jehož buňky tvořily tyčinky tvaru C a O. Při testování fyziologických vlastností bylo zjištěno, že všechny kmeny dobře rostly za anaerobních podmínek. Všechny také rotstly za mikroaerofilních podmínek s vyjímkou kmenů N115 a GLT066. Jediný kmen N97 byl schopen slabého růstu i za podmínek aerobních. Testované kmeny byly schopny růstu za poměrně širokého rozpětí pH hodnot a a v rozmezí teplot 30–46 °C. Pro kmen N115 bude do budoucna nezbytné zopakovat testování jeho růstových schopností ve větších objemech se zajištěním stabilnějších podmínek kultivace, neboť v mikrotitračních destičkách nebyl schopen růstu.

Závěrem lze tedy shrnout, že potencionálně nové druhy bifidobakterií vykazovaly typický bifidobakteriální charakter. Do budoucna budou dále analyzovány jejich další vlastnosti, které jsou nezbytné k popisu nového druhu.

8 Seznam použité literatury

- Alberoni D, Gaggia F, Baffoni L, Modesto MM, Biavati B, Di Gioia D. 2019. *Bifidobacterium xylocopae* sp. nov. and *Bifidobacterium aemilianum* sp. nov., from the carpenter bee (*Xylocopa violacea*) digestive tract. *Systematic and Applied Microbiology* **42**:205–216.
- Amaretti A, Tamburini E, Bernardi T, Pompei A, Zanoni S, Vaccari G, Matteuzzi D, Rossi M. 2006. Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: compared growth on single and mixed carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**:654–662.
- Arboleya S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. 2016. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- Bäckhed F et al. 2015. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe* **17**:690–703.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* **307**:1915–1920.
- Berg G et al. 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* **8**:103.
- Biavati B, Mattarelli P. 2006. The family *bifidobacteriaceae*. Pages 322–382 *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer-Verlag.
- Bottacini F et al. 2012. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 Genome Analysis Reveals Clues for Colonization of the Insect Gut. *PLoS ONE* **7**:e44229.
- Bottacini F, Medini D, Pavesi A, Turrone F, Foroni E, Riley D, Giubellini V, Tettelin H, van Sinderen D, Ventura M. 2010. Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology* **156**:3243–3254.
- Bottacini F, Ventura M, van Sinderen D, O’Connell Motherway M. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories* **13**:S4.
- Bunešová V, Domig KJ, Killer J, Vlková E, Kopečný J, Mrázek J, Ročková Š, Rada V. 2012. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* **18**:166–168.
- Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. 2018. The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* **16**:143–155.
- Canzi E, Guglielmetti S, Mora D, Tamagnini I, Parini C. 2005. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **88**:207–219.
- Chen J, Wang J, Zheng H. 2021. Characterization of *Bifidobacterium apousia* sp. nov., *Bifidobacterium choladohabitans* sp. nov., and *Bifidobacterium polysaccharolyticum* sp. nov., three novel species of the genus *Bifidobacterium* from honey bee gut. *Systematic and Applied Microbiology* **44**:126247. Urban & Fischer.
- Cheng L, Kiewiet MBG, Logtenberg MJ, Groeneveld A, Nauta A, Schols HA, Walvoort MTC, Harmsen HJM, de Vos P. 2020. Effects of Different Human Milk Oligosaccharides on

- Growth of Bifidobacteria in Monoculture and Co-culture With *Faecalibacterium prausnitzii*. *Frontiers in Microbiology* **11**.
- Coakley M, Ross RP, Nordgren M, Fitzgerald G, Devery R, Stanton C. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology* **94**:138–145.
- Coenye T, Gevers D, de Peer Y Van, Vandamme P, Swings J. 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:147–167.
- Collins S, Reid G. 2016. Distant Site Effects of Ingested Prebiotics. *Nutrients* **8**:523.
- Cuffaro B et al. 2021. Identification of New Potential Biotherapeutics from Human Gut Microbiota-Derived Bacteria. *Microorganisms* **9**:565.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 1997. Collaborative JPEN-Clinical Nutrition Scientific Publications Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **21**:357–365.
- Cunningham M et al. 2021. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology* **29**:667–685.
- Degnan BA, Macfarlane GT. 1991. Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **84**:151–156.
- Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:119–125.
- Duranti S et al. 2017. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes among Human Gut-Derived Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **83**.
- Duranti S et al. 2019. Characterization of the phylogenetic diversity of five novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium castoris* sp. nov., *Bifidobacterium callimiconis* sp. nov., *Bifidobacterium goeldii* sp. nov., *Bifidobacterium samirii* sp. nov. and *Bifidobacterium dolichotidis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **69**:1288–1298. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.003306> (accessed March 16, 2023).
- Duranti S et al. 2020. Characterization of the phylogenetic diversity of two novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium cebidarum* sp. nov. and *Bifidobacterium leontopithecii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**:2288–2297. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004032> (accessed March 16, 2023).
- Eckel VPL, Ziegler L-M, Vogel RF, Ehrmann M. 2020. *Bifidobacterium tibiigranuli* sp. nov. isolated from homemade water kefir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**:1562–1570.

- Egan M, Van Sinderen D. 2018. Carbohydrate Metabolism in Bifidobacteria. Pages 145–164 The Bifidobacteria and Related Organisms. Elsevier.
- Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beauflis F, Wieërs G, Guery B, Delhaes L. 2020. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10**.
- Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, Looijer-van Langen M, Madsen KL. 2008. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **295**:G1025–G1034.
- Favier CF, de Vos WM, Akkermans ADL. 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* **9**:219–229.
- Gao B, Gupta RS. 2005. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:2401–2412.
- Gao B, Paramanathan R, Gupta RS. 2006. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**:69–91.
- Gaponov NV, Neverova OP, Gorelik OV, Stepanov AV. 2020. Probiotics and animal feed in primates feeding. *E3S Web of Conferences* **222**:02006.
- Garrido D, Dallas DC, Mills DA. 2013a. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology* **159**:649–664.
- Garrido D, Ruiz-Moyano S, Jimenez-Espinoza R, Eom H-J, Block DE, Mills DA. 2013b. Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* isolates. *Food Microbiology* **33**:262–270.
- Ghanbari M, Jami M, Kneifel W, Domig KJ. 2013. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. *Food Control* **32**:379–385.
- Gibson GR et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **14**:491–502.
- Gibson GR, Probert HM, Loo J Van, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* **17**:259–275. Cambridge University Press. Available from https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422404000204/type/journal_article (accessed March 29, 2023).
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition* **125**:1401–1412.
- Gomes AMP, Malcata FX. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* **10**:139–157.

- González-Rodríguez I, Sánchez B, Ruiz L, Turróni F, Ventura M, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A. 2012. Role of Extracellular Transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in Mucin Adhesion and Aggregation. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:3992–3998.
- Gopal PK, Sullivan PA, Smart JB. 2001. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal* **11**:19–25.
- Hill C et al. 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.
- Holdeman L V, Cato EP, Moore WEC. 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Horáčková Š, Mühlhansová A, Plocková M. 2017. Interakce žlučových kyselin a probiotických mikroorganismů. *Chemické Listy* **111**:246–250.
- Hungate RE. 1969. Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. Pages 117–132.
- Jiang T, Mustapha A, Savaiano DA. 1996. Improvement of Lactose Digestion in Humans by Ingestion of Unfermented Milk Containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science* **79**:750–757.
- Kankainen M et al. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:17193–17198.
- Killer J, Havlík J, Bunešová V, Vlková E, Benada O. 2014. *Pseudoscardovia radai* sp. nov., a representative of the family Bifidobacteriaceae isolated from the digestive tract of a wild pig (*Sus scrofa scrofa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:2932–2938.
- Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Koppová I, Havlík J, Benada O, Kott T. 2011. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**:1315–1321.
- Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Rada V, Benada O, Koppová I, Havlík J, Straka J. 2009. *Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:2020–2024.
- Kim M, Oh H-S, Park S-C, Chun J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:346–351.
- Klaassens ES, Boesten RJ, Haarman M, Knol J, Schuren FH, Vaughan EE, de Vos WM. 2009. Mixed-Species Genomic Microarray Analysis of Fecal Samples Reveals Differential

- Transcriptional Responses of Bifidobacteria in Breast- and Formula-Fed Infants. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:2668–2676.
- Konieczna P, Akdis CA, Quigley EMM, Shanahan F, O’Mahony L. 2012. Portrait of an immunoregulatory *bifidobacterium*. *Gut Microbes* **3**:261–266.
- Konopka A. 2009. What is microbial community ecology? *The ISME Journal* **3**:1223–1230.
- Krausova G, Hyrslova I, Hynstova I. 2019. In Vitro Evaluation of Adhesion Capacity, Hydrophobicity, and Auto-Aggregation of Newly Isolated Potential Probiotic Strains. *Fermentation* **5**:100.
- Lattimer JM, Haub MD. 2010. Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients* **2**:1266–1289.
- Lawson PA. 2018. The Phylum Actinobacteria. Pages 1–8 *The Bifidobacteria and Related Organisms*. Elsevier.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **98**:1303–1315.
- Lecker JL, Froberg-Fejko K. 2015. PrimiOtic™ and PrimiOtic Plus™: novel probiotic for primates suffering from idiopathic chronic diarrhea. *Lab Animal* **44**:414–415.
- Lee J-H, O’Sullivan DJ. 2010. Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**:378–416.
- Li M, Jin Y, Wang Y, Meng L, Zhang N, Sun Y, Hao J, Fu Q, Sun Q. 2019. Preparation of *Bifidobacterium breve* encapsulated in low methoxyl pectin beads and its effects on yogurt quality. *Journal of Dairy Science* **102**:4832–4843.
- Li TT, Zhang HX, Gu CT. 2022. *Bifidobacterium mizhiense* sp. nov., isolated from the gut of honeybee (*Apis mellifera*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **72**:005390. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.005390> (accessed March 16, 2023).
- Liu G, Chen H, Chen J, Wang X, Gu Q, Yin Y. 2019. Effects of bifidobacteria-produced exopolysaccharides on human gut microbiota in vitro. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**:1693–1702.
- Lockyer S, Stanner S. 2019. Prebiotics – an added benefit of some fibre types. *Nutrition Bulletin* **44**:74–91.
- Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* **11**:1–17.
- Lugli GA et al. 2014. Investigation of the Evolutionary Development of the Genus *Bifidobacterium* by Comparative Genomics. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:6383–6394.
- Lugli GA et al. 2020. Evolutionary development and co-phylogeny of primate-associated bifidobacteria. *Environmental Microbiology* **22**:3375–3393.

- Lugli GA, Calvete-Torre I, Alessandri G, Milani C, Turrone F, Laiolo P, Ossiprandi MC, Margolles A, Ruiz L, Ventura M. 2021. Phylogenetic classification of ten novel species belonging to the genus *Bifidobacterium* comprising *B. phasiani* sp. nov., *B. pongonis* sp. nov., *B. saguinibicoloris* sp. nov., *B. colobi* sp. nov., *B. simiiventris* sp. nov., *B. santillanense* sp. nov., *B. miconis* sp. nov., *B. amazonense* sp. nov., *B. pluvialisilvae* sp. nov., and *B. miconisargentati* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **44**:126273. Urban & Fischer.
- Lugli GA, Milani C, Duranti S, Alessandri G, Turrone F, Mancabelli L, Tatoni D, Ossiprandi MC, van Sinderen D, Ventura M. 2019. Isolation of novel gut bifidobacteria using a combination of metagenomic and cultivation approaches. *Genome Biology* **20**:96.
- Lugli GA, Milani C, Duranti S, Mancabelli L, Mangifesta M, Turrone F, Viappiani A, van Sinderen D, Ventura M. 2018. Tracking the Taxonomy of the Genus *Bifidobacterium* Based on a Phylogenomic Approach. *Applied and Environmental Microbiology* **84**.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**:1035S-1045S.
- Mailhe M et al. 2018. Repertoire of the gut microbiota from stomach to colon using culturomics and next-generation sequencing. *BMC Microbiology* **18**:157.
- Man WH, de Steenhuijsen P, Bogaert D. 2017. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews Microbiology* **15**:259–270.
- Manning TS, Gibson GR. 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **18**:287–298.
- Masco L, Ventura M, Zink R, Huys G, Swings J. 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1137–1143.
- Mattarelli P, Holzapfel W, Franz CMAP, Endo A, Felis GE, Hammes W, Pot B, Dicks L, Dellaglio F. 2014. Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:1434–1451. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.060046-0> (accessed March 29, 2023).
- Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. 2015. Gut/brain axis and the microbiota. *Journal of Clinical Investigation* **125**:926–938.
- McCracken VJ, Lorenz RG. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. Microreview. *Cellular Microbiology* **3**:1–11.
- Mei Y, Chen H, Yang B, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2022. Research progress on conjugated linoleic acid bio-conversion in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* **369**:109593.

- Milani C et al. 2014. Genomic Encyclopedia of Type Strains of the Genus *Bifidobacterium*. Applied and Environmental Microbiology **80**:6290–6302.
- Milani C, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M. 2016. Genomics of the Genus *Bifidobacterium* Reveals Species-Specific Adaptation to the Glycan-Rich Gut Environment. Applied and Environmental Microbiology **82**:980–991.
- Modesto M. 2018. Isolation, Cultivation, and Storage of Bifidobacteria. Pages 67–98 The Bifidobacteria and Related Organisms. Elsevier.
- Modesto M et al. 2020a. Phylogenetic characterization of two novel species of the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium saimiriisciurei* sp. nov. and *Bifidobacterium platyrrhinorum* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology **43**:126111. Urban & Fischer.
- Modesto M et al. 2020b. Bifidobacteria in two-toed sloths (*Choloepus didactylus*): phylogenetic characterization of the novel taxon *Bifidobacterium choloepi* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **70**:6115–6125.
- Modesto M, Michelini S, Stefanini I, Sandri C, Spiezio C, Pisi A, Filippini G, Biavati B, Mattarelli P. 2015. *Bifidobacterium lemorum* sp. nov., from faeces of the ring-tailed lemur (*Lemur catta*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **65**:1726–1734.
- Modrackova N, Makovska M, Mekadim C, Vlkova E, Tejnecky V, Bolechova P, Bunesova V. 2019. Prebiotic potential of natural gums and starch for bifidobacteria of variable origins. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre **20**:100199.
- Modrackova N, Stovicek A, Burtscher J, Bolechova P, Killer J, Domig KJ, Neuzil-Bunesova V. 2021. The bifidobacterial distribution in the microbiome of captive primates reflects parvorder and feed specialization of the host. Scientific Reports **11**:15273.
- Mozzi F. 2010. Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- Neuzil-Bunesova V et al. 2020. *Bifidobacterium canis* sp. nov., a novel member of the *Bifidobacterium pseudolongum* phylogenetic group isolated from faeces of a dog (*Canis lupus f. familiaris*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **70**:5040–5047. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004378> (accessed March 16, 2023).
- Neuzil-Bunesova V et al. 2021. Five novel bifidobacterial species isolated from faeces of primates in two Czech zoos: *Bifidobacterium erythrocebi* sp. nov., *Bifidobacterium moraviense* sp. nov., *Bifidobacterium oedipodis* sp. nov., *Bifidobacterium olomucense* sp. nov. and *Bifidobacterium panos* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **71**:004573. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004573> (accessed March 16, 2023).

- Olofsson TC, Modesto M, Pascarelli S, Scarafile D, Mattarelli P, Vasquez A. 2023. *Bifidobacterium mellis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honey bee *Apis mellifera*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **73**:005766. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.005766> (accessed March 16, 2023).
- Orban JI, Patterson JA. 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. Journal of Microbiological Methods **40**:221–224.
- O’Sullivan O, Coakley M, Lakshminarayanan B, Conde S, Claesson MJ, Cusack S, Fitzgerald AP, O’Toole PW, Stanton C, Ross RP. 2013. Alterations in intestinal microbiota of elderly Irish subjects post-antibiotic therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **68**:214–221.
- Palleja A et al. 2018. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. Nature Microbiology **3**:1255–1265.
- Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **70**:5607–5612.
- Pereira-Caro G, Fernández-Quirós B, Ludwig IA, Pradas I, Crozier A, Moreno-Rojas JM. 2018. Catabolism of citrus flavanones by the probiotics *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus*. European Journal of Nutrition **57**:231–242.
- Pérez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. 1998. Surface Properties of Bifidobacterial Strains of Human Origin. Applied and Environmental Microbiology **64**:21–26.
- Petherick A. 2010. Development: Mother’s milk: A rich opportunity. Nature **468**:S5–S7.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. Genes & Nutrition **6**:285–306.
- Praet J, Meeus I, Cnockaert M, Aerts M, Smaghe G, Vandamme P. 2015. *Bifidobacterium commune* sp. nov. isolated from the bumble bee gut. Antonie van Leeuwenhoek **107**:1307–1313.
- Qin J et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature **464**:59–65.
- Rada V, Petr J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. Journal of Microbiological Methods **43**:127–132.
- Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. Food Research International **43**:1–7.
- Ravel J et al. 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**:4680–4687.
- Rodríguez CI, Martiny JBH. 2020. Evolutionary relationships among bifidobacteria and their hosts and environments. BMC Genomics **21**:26.

- Rolfe RD. 2000. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *The Journal of Nutrition* **130**:396S-402S.
- Rosselló-Mora R, Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**:39–67. Available from <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x>.
- Rosypal S, Hoďák K, Martinec T, Kocour M. 1981. *Obecná bakteriologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Salam N, Jiao J-Y, Zhang X-T, Li W-J. 2020. Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**:1331–1355.
- Sánchez B, Ruiz L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P, Margolles A. 2013. Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacological Research* **69**:127–136.
- Sarkar A, Mandal S. 2016. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research* **192**:159–171.
- Savitri, Lata P. 2021. *Probiotics for Human Health*. Pages 181–212.
- Schleifer KH, Kandler O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* **36**:407–477. *Am Soc Microbiol*.
- Selber-Hnatiw S et al. 2020. Metabolic networks of the human gut microbiota. *Microbiology* **166**:96–119.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology* **14**:e1002533.
- Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M. 1992. Relationship Between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of *Bifidobacterium* Species. *Journal of Dairy Science* **75**:3296–3306.
- Shreiner AB, Kao JY, Young VB. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology* **31**:69–75.
- Silva AM, Bambirra EA, Oliveira AL, Souza PP, Gomes DA, Vieira EC, Nicoli JR. 1999. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology* **86**:331–336.
- Silva AM, Barbosa FHF, Duarte R, Vieira LQ, Arantes RME, Nicoli JR. 2004. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. *Journal of Applied Microbiology* **97**:29–37.
- Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. 2020. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology* **11**.
- Simões CD, Maukonen J, Kaprio J, Rissanen A, Pietiläinen KH, Saarela M. 2013. Habitual Dietary Intake Is Associated with Stool Microbiota Composition in Monozygotic Twins. *The Journal of Nutrition* **143**:417–423.

- Stiles ME, Holzapfel WH. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**:1–29.
- Stuivenberg GA, Burton JP, Bron PA, Reid G. 2022. Why Are Bifidobacteria Important for Infants? *Microorganisms* **10**:278.
- Sullivan Å, Edlund C, Nord CE. 2001. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases* **1**:101–114.
- Sun Z et al. 2015. Comparative Genomic Analysis of 45 Type Strains of the Genus *Bifidobacterium*: A Snapshot of Its Genetic Diversity and Evolution. *PLOS ONE* **10**:e0117912.
- Tap J et al. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology* **11**:2574–2584.
- Theilmann MC, Fredslund F, Svensson B, Lo Leggio L, Abou Hachem M. 2019. Substrate preference of an ABC importer corresponds to selective growth on β -(1,6)-galactosides in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Journal of Biological Chemistry* **294**:11701–11711.
- Tijjani KI, James M, Altın C. 2020. Probiotics and their attributes in human health therapy. *International Journal of Research -GRANTHAALAYAH* **8**:158–164.
- Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse H-J, Ludwig W, Kämpfer P. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**:249–266.
- Tissier H. 1899. *Le bacterium coli* et la reaction chromophile d'escherich. *Crit. Rev. Soc. Biol* **51**:943–945.
- Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, Karin M, Loomba R, Schnabl B, Knight R. 2018. The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **15**:397–411.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**:1027–1031.
- Turrone F et al. 2010. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:19514–19519.
- Turrone F et al. 2012. Diversity of Bifidobacteria within the Infant Gut Microbiota. *PLoS ONE* **7**:e36957.
- Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2015. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. *Pediatric Research* **77**:229–235.
- Ventura M, Canchaya C, Casale A Del, Dellaglio F, Neviani E, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2006. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**:2783–2792.

- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**:495–548.
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**:205–223.
- Vlková E, Rada V, Šmehilová M, Killer J. 2008. Auto-aggregation and Co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica* **53**:263–269.
- Vlková E, Salmonová H, Bunešová V, Geigerová M, Rada V, Musilová Š. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* **34**:27–33.
- Yatsunenkov T et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**:222–227.
- Zeigler DR. 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1893–1900.