

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Schopnost bakterií využívat syntetická sladidla a cukerné  
alkoholy jako zdroj energie**

**Diplomová práce**

**Bc. Tereza Procházková**

**Výživa a potraviny**

**Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Schopnost bakterií využívat syntetická sladidla a cukerné alkoholy jako zdroj energie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 25.4. 2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D., za cenné rady, ochotu a odbornou pomoc při zpracování diplomové práce. Poděkování patří i celé Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky.

# Schopnost bakterií využívat syntetická sladidla a cukerné alkoholy jako zdroj energie

## Souhrn

Vliv syntetických sladidel a cukerných alkoholů na složení mikrobiomu, je stále více diskutovaným tématem, pro které dosud neexistuje dostatek průkazných vědeckých závěrů. Cílem této diplomové práce bylo testování schopnosti bakterií, které jsou přirozenou součástí trávicího traktu, metabolizovat vybraná umělá sladidla a cukerné alkoholy jako zdroj energie. Celkem bylo otestováno 32 bakterií kmenů Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria a Actinobacteria, jež se největší měrou podílí na složení mikrobiomu. Celkem bylo testováno 8 substrátů, 4 syntetická sladidla a 4 cukerné alkoholy. Experiment byl prováděn *in vitro* podmínkách, za použití API médií, obohacených o jeden z testovaných substrátů, který sloužil jako jediný zdroj energie. Jako pozitivní kontrola bylo použito médium s glukózou a jako negativní kontrola sloužilo samostatné médium. Glukóza i jednotlivá sladidla byla do API médií aplikována ve stejné koncentraci, tedy 1,5 g/l. Vyhodnocení experimentu probíhalo vizuálně, na základě změny optické denzity a barvy média. Ke zjištění intenzity nárůstu bakterií, byla využita McFarlandova stupnice. Ze získaných výsledků vyplývá, že všechna syntetická sladidla a cukerné alkoholy selektivně podporují růst pouze některých bakterií. Testované substráty významně podporovaly růst bakterií rodu *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* a také bakterie *E. faecium*. Syntetická sladidla podporovala růst především bakterií kmene Firmicutes, Bacteroidetes a Actinobacteria. Sorbitol podporoval růst i bakterií kmene Proteobacteria. V případě bakterií *B. bifidum*, *E. coli* a *S. enterica* byla zjištěna kmenová specifita ve schopnosti využívat dané substráty k růstu. Zjištěný nárůst probiotických bakterií naznačuje, že syntetická sladidla a cukerné alkoholy mohou mít prebiotické účinky. Na druhou stranu se také mohou podílet na vzniku či postupu zubních kazů. Z tohoto pohledu může být působení syntetických sladidel a cukerných alkoholů srovnatelné s účinky fermentovatelných sacharidů. Taktéž bylo zjištěno, že při utilizaci substrátů, zejména bakteriemi rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, dochází buď ke tvorbě metabolitů v jiném poměru či ke tvorbě zcela jiných, než v případě glukózy. Ze získaných výsledků vyplývá, že syntetická sladidla a cukerné alkoholy mohou podporovat růst probiotických i patogenních mikroorganismů a ve vztahu k zubním kazům mohou mít kariogenní účinky.

**Klíčová slova:** Syntetická sladidla, cukerné alkoholy, intestinální mikrobiota, zubní kaz, organické kyseliny

# The ability of bacteria to utilize artificial sweeteners and sugar alcohols as a sole energy source

## Summary

Effects of synthetic sweeteners and sugar alcohols on gut microbiota composition is an increasingly discussed topic for which there are not yet enough conclusive scientific conclusions. This diploma thesis aimed to test the ability of bacteria naturally inhabiting digestive tract to metabolize selected artificial sweeteners and sugar alcohols as the sole energy source. A total of 32 bacteria of Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, and Actinobacteria phyla, which are dominant constituents of gut microbiome, were used for the test. A total of 8 substrates, 4 synthetic sweeteners and 4 sugar alcohols were tested. The experiment was performed *in vitro*, using API media enriched with one of the tested substrates. Medium with glucose was used as a positive control and medium without added substrate was used as a negative control. All the substrates including glucose were applied into API media in the same concentration 1.5 g/l. The evaluation of the experiment was performed visually, based on changes in optical density and media color. The McFarland scale was used to determine the intensity of the bacteria growth. The results showed that all synthetic sweeteners and sugar alcohols selectively support the growth only of some bacteria. The tested substrates significantly promoted the growth of *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, and also *E. faecium*. Synthetic sweeteners promoted the growth mainly of Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria. Sorbitol also supported the growth of Proteobacteria. In the case of *B. bifidum*, *E. coli*, and *S. enterica*, the ability to metabolize given substrates was found to be strain specific. Result also suggested that synthetic sweeteners and sugar alcohols may have prebiotic effects. On the other hand, they can also contribute to the development or progression of tooth decay, thus their effects could be considered comparable to carbohydrates. It was also found that *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species produced from these substrates either metabolites in a different ratio or chemical substances other than from glucose. The obtained results showed that synthetic sweeteners and sugar alcohols can support the growth of both, probiotic and pathogenic microorganisms and they can have cariogenic effects concerning tooth decay.

**Keywords:** Artificial sweeteners, sugar polyols, intestinal microbiome, dental carries, organic acids

## Obsah

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Úvod.....  | 8  |
| 2       | Vědecká hypotéza a cíle práce .....                      | 9  |
| 3       | Literární rešerše.....                                   | 10 |
| 3.1     | Mikrobiom .....  | 10 |
| 3.1.1   | Mikrobiom trávicího traktu.....                          | 10 |
| 3.1.1.1 | Mikrobiom dutiny ústní.....                              | 11 |
| 3.1.1.2 | Distribuce mikroorganismů v trávicím traktu .....        | 12 |
| 3.2     | Komenzální mikrobiota trávicího traktu .....             | 13 |
| 3.2.1   | Firmicutes .....   | 13 |
| 3.2.1.1 | Čeleď <i>Clostridiaceae</i> .....                        | 14 |
| 3.2.1.2 | Čeleď <i>Enterococcaceae</i> .....                       | 16 |
| 3.2.1.3 | Čeleď <i>Streptococcaceae</i> .....                      | 17 |
| 3.2.1.4 | Čeleď <i>Lactobacillaceae</i> .....                      | 19 |
| 3.2.2   | Bacteroidetes.....                                       | 21 |
| 3.2.2.1 | Čeleď <i>Bacteroidaceae</i> .....                        | 21 |
| 3.2.3   | Actinobacteria.....                                      | 22 |
| 3.2.3.1 | Čeleď <i>Bifidobacteriaceae</i> .....                    | 22 |
| 3.2.4   | Proteobacteria .....                                     | 24 |
| 3.2.4.1 | Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i> .....                    | 24 |
| 3.3     | Vliv stravy na složení mikrobiomu trávicího traktu ..... | 26 |
| 3.4     | Syntetická sladidla .....                                | 27 |
| 3.4.1   | Acesulfam K .....  | 28 |
| 3.4.2   | Aspartam.....  | 28 |
| 3.4.3   | Sukralóza .....  | 29 |
| 3.4.4   | Sacharin .....   | 29 |
| 3.5     | Cukerné alkoholy .....                                   | 30 |
| 3.5.1   | Erythritol.....  | 30 |
| 3.5.2   | Izomalt .....  | 31 |
| 3.5.3   | Sorbitol .....   | 32 |
| 3.5.4   | Xylitol.....   | 32 |
| 3.6     | Biochemické testy.....                                   | 33 |
| 3.6.1   | API identifikační systém.....                            | 34 |
| 3.6.2   | Acidobazické indikátory.....                             | 34 |
| 4       | Metodika .....   | 36 |
| 4.1     | Substráty.....   | 36 |

|     |                                      |    |
|-----|--------------------------------------|----|
| 4.2 | Seznam testovaných kmenů .....       | 36 |
| 4.3 | Oživení lyofilizovaných kultur ..... | 38 |
| 4.4 | Příprava kultur pro experiment ..... | 39 |
| 4.5 | Příprava substrátů a médií .....     | 40 |
| 5   | Výsledky .....                       | 43 |
| 5.1 | Vyhodnocení výsledků .....           | 43 |
| 6   | Diskuze .....                        | 48 |
| 7   | Závěr .....                          | 51 |
| 8   | Literatura .....                     | 52 |

# 1 Úvod

Syntetická sladidla a cukerné alkoholy jsou stále častěji součástí stravy člověka, kde slouží jako náhrada cukru. Jejich obliba rok od roku roste, stejně tak, jako vzrůstá i počet konzumentů. Rozšiřuje se také sortiment sladidel, s tím, jak jsou objevovány stále nové syntetické látky. Zatímco dříve byla sladidla používána především jedinci s rozvinutým diabetem, tak jsou dnes součástí stravy zdravé populace, dokonce i děti (Baker-Smith et al. 2019). Na rozdíl od cukru totiž sladidla disponují vlastnostmi, které zvyšují jejich atraktivitu pro konzumenty. Většina sladidel nezvyšuje hladinu glykémie, nepůsobí na uvolňování inzulínu, jejich kalorická hodnota je zanedbatelná a také jsou považovány za nekariogenní (Liauchonak et al. 2019). V souvislosti s masivní konzumací sladidel se začal zvyšovat zájem o to, jak vlastně tyto substance působí na lidský organismus. Prvotní výzkumy, zabývající se vlivem sladidel na lidský organismus, se týkaly především karcinogenních účinků, ovlivňování glykémie a působení na uvolňování inzulínu. S tím, jak se začalo ukazovat, že sladidla nejsou vůči lidskému organismu inertní, jak se původně myslelo, se výzkum začal rozšiřovat o testování dalších účinků. Dnes se do popředí dostává zájem především o působení těchto substancí na mikrobiom (Sharma et al. 2016). Mikrobiom totiž zastává důležitou roli v našem organismu a to jak ve vztahu ke zdraví, tak i nemoci člověka. Samotné složení mikrobiomu je dáno mnoha faktory, z nichž strava, je jedním z mála, které je člověk schopen ovlivnit. Konzumací určitých potravin můžeme buď zvyšovat podíl prospěšných mikroorganismů či způsobit dysbiózu, jejímž výsledkem může být nemoc. Jak se zdá i chronická onemocnění, jako je obezita, zánětlivá onemocnění střev či diabetes mellitus 2. typu, mohou být do jisté míry výsledkem zmíněné dysbiózy (Wang et al. 2017). Proto je třeba věnovat složkám potravy, mezi které patří i syntetická sladidla a cukerné alkoholy, zvláštní pozornost.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Umělá sladidla a cukerné alkoholy stále častěji nacházejí uplatnění v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, jako náhražka cukrů, díky nízké energetické hodnotě a vysoké sladivosti. Zdravotní rizika spojená s jejich konzumací jsou velice kontroverzním tématem. Jedním z těchto aspektů je i vliv na složení mikrobioty trávicího traktu a na rozvoj zubního kazu. Předpokládáme, že testovaná sladidla a cukerné alkoholy budou selektivně podporovat růst jen určité skupiny mikroorganismů. Cílem diplomové práce bude testování schopnosti bakterií, které jsou přirozenou součástí dutiny ústní a trávicího traktu, metabolizovat vybraná umělá sladidla a cukerné alkoholy jako zdroj energie.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mikrobiom

Termín mikrobiom je používán již více než 50 let, nicméně až v posledních 15 letech nabral na významu, především z hlediska zdraví člověka. Za mikrobiom považujeme všechny organismy vyskytující se v konkrétním prostředí. U člověka je tímto prostředím trávicí trakt, včetně dutiny ústní, kůže, dýchacího ústrojí, genitálií a dokonce i povrchu očí (Tetro & Allen-Vercoe 2016).

Mikrobiom organismu člověka je tvořen více než 100 biliony symbiotických mikroorganismů a jeho uspořádání hraje důležitou roli ve zdraví a rozvoji nemocí člověka. Střevní mikrobiom je dokonce považován za esenciální orgán, který nese 150krát více genů, než kolika je tvořen genom člověka. Mikrobiom střev se účastní procesu modulace metabolismu, regulace vývoje epitelu a ovlivňování vrozené imunity. Chronická onemocnění, jako je obezita, zánětlivá onemocnění střev, cukrovka, metabolický syndrom či ateroskleróza jsou taktéž spojovány se složením mikrobiomu (Wang et al. 2017).

Funkce mikrobiomu lze obecně shrnout do 4 hlavních: obrana proti patogenům, posílení imunity, metabolizace nestravitelných složek potravy a produkce esenciálních živin. Mikrobiota v trávicím traktu pomáhá hostiteli rozkládat látky, jež nedokáže naštěpit vlastní enzymatickou výbavou a jsou příliš velké, aby mohly být vstřebány. Tímto procesem dochází k produkci energie a esenciálních metabolitů, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), mléčná kyselina a některé vitamíny (Li et al. 2019)

#### 3.1.1 Mikrobiom trávicího traktu

Trávicí trakt je zdaleka nejhustěji osídlený a také i nejvíce prostudovaný ekosystém lidského těla. Odhaduje se, že mikrobiální ekosystém trávicího traktu dospělého jedince je tvořen 1000 až 1500 druhy bakterií, nicméně toto číslo může být i vyšší (Tetro & Allen-Vercoe 2016).

Donedávna panovalo přesvědčení, že k osídlování trávicího traktu dochází až v průběhu porodu, neboť prostředí plodu bylo považováno za sterilní. Pokročilé výzkumy však prokázaly přítomnost mikroorganismů v placentě, plodových obalech, plodové vodě a pupečnickové krvi. Tato zjištění naznačují, že k osídlování gastrointestinálního traktu může docházet již během těhotenství a na složení mikrobioty trávicího traktu tak může mít vliv samotný průběh gravidity. Ve srovnání s mikrobiomem dospělého člověka má mikrobiom novorozence výrazně nižší rozmanitost a vyšší variabilitu mezi jednotlivci. Mikrobiom novorozence dominantně tvoří

kmeny Actinobacteria, Proteobacteria a Firmicutes, s nižší četností výskytu Bacteroidetes. Převahu v mikrobiomu novorozence pak představuje rod *Bifidobacterium* (Actinobacteria) (Greenhalgh et al. 2016).

Samotný způsob porodu, tedy zda došlo k přirozenému porodu vaginální cestou či císařským řezem, je taktéž faktorem ovlivňujícím zastoupení mikroorganismů v trávicím traktu novorozence. Porod císařským řezem je spojován s celkově nižší bakteriální rozmanitostí, nižším výskytem rodů *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Naopak dochází k nárůstu bakterií rodu *Clostridium*. Bakteriální složení je u těchto novorozenců podobné mikrobiomu pokožky matky, zatímco u novorozenců, narozených přirozenou vaginální cestou, odpovídá vaginálnímu mikrobiomu matky. Dalším faktorem je způsob výživy novorozence, neboť mateřské mléko a jeho esenciální složení mají diametrálně odlišné působení na mikrobiom, než jeho náhražky. U kojenců kojených mateřským mlékem byl zjištěn nárůst kmenů Actinobacteria a pokles Firmicutes a Proteobacteria. Naopak u kojenců krmených náhražkami mateřského mléka byl zaznamenán rozvoj patogenních organismů, jako je *Escherichia coli* a *Clostridium difficile*. Esenciální složky mateřského mléka, například imunoglobuliny a oligosacharidy, totiž podporují růst převážně probiotických bakterií, jako je rod *Bifidobacterium* (Greenhalgh et al. 2016). Se zařazením pevné stravy do jídelníčku dítěte, se složení mikrobiomu dále rozvíjí a upravuje a dochází k položení základů pro budoucí uspořádání mikrobiomu dospělého jedince (Tetro & Allen-Vercoe 2016).

U dospělého jedince je zhruba 90 % střevní mikrobioty tvořeno kmeny Firmicutes, které tvoří většinu (64 %), Bacteroidetes (23 %), Proteobacteria (3,66 %) a Actinobacteria (0,4 %). Jednotlivé poměry se však mohou individuálně lišit, například v závislosti na geografických podmínkách či antibiotické léčbě. (Karel & Hoch 2018).

Ve stáří opět dochází ke změnám ve složení mikrobiomu, pravděpodobně v důsledku užívání medikamentů, změny stravovacích návyků a vliv mají také hormonální změny. Oproti mikrobiomu dospělého jedince dochází ke zvýšení poměru kmenů Firmicutes k Bacteroidetes, za současného snížení prospěšných komenzálních bakterií, jako jsou zástupci rodu *Bifidobacterium*. Předpokládá se, že změna v uspořádání bakterií v gastrointestinálním traktu, jde ruku v ruce se zhoršením zdravotního stavu starších lidí (Greenhalgh et al. 2016).

#### 3.1.1.1 Mikrobiom dutiny ústní

Dutina ústní je, po intestinální oblasti, nejvíce různorodým mikrobiálním ekosystémem lidského těla, co se druhového zastoupení týká. Mikrobiom dutiny ústní ovlivňuje nejen lokální, ale i systémové zdraví člověka. Prostředí dutiny ústní poskytuje optimální podmínky pro růst

bakterií a to z důvodu udržování stálé teploty okolo 37 °C a stálého pH v rozmezí 6,5-7, které je udržováno slinami. Sliny také udržují bakterie hydratované a slouží jako médium pro transport živin. Normální mikrobiom dutiny ústní tvoří bakterie, mikroskopické houby, viry, archea a protozoa, které se v dutině ústní vyskytují především ve formě biofilmu. Mezi hlavní bakteriální rody, jenž se nachází ve zdravé dutině ústní, patří například rody *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* či *Campylobacter*. Mezi mikroorganismy pak existuje převážně symbiotický vztah založený na vzájemných výhodách. Mikroorganismy kolonizují dva typy povrchů a to buď tvrdou a měkkou tkáň zubů nebo sliznici. Biofilm pak hraje klíčovou roli při udržování homeostáze v ústech, ochraně dutiny ústní a prevenci rozvoje onemocnění. Změny v uspořádání mikrobiomu dutiny ústní mohou vést ke vzniku zánětu dásní, paradentózy a zubních kazů. Všechna tato onemocnění se vyznačují vysokou prevalencí v lidské populaci (Deo & Deshmukh 2019).

### 3.1.1.2 Distribuce mikroorganismů v trávicím traktu

Pro distribuci bakterií v trávicím traktu je typická vzrůstající převaha anaerobních mikroorganismů, a to směrem od žaludku k tlustému střevu. Počet anaerobních bakterií, nacházejících se v tlustém střevě, pak téměř stonásobně převyšuje počet fakultativně anaerobních a aerobních bakterií (Karel & Hoch 2018). Tlaskalová-Hogenová et al. (2011) uvádí, že v ústní dutině se vyskytuje  $10^{12}$  bakterií, v žaludku již pouze  $10^3$ - $10^4$ , v jejunu se množství bakterií opět zvyšuje až na  $10^6$  a v terminálním ileu až na  $10^9$ . Největší počet bakterií se však vyskytuje v tlustém střevě, kde v 1 gramu střevního obsahu dosahuje počet zhruba  $10^{11}$ .

V oblasti žaludku a duodena dominují především rody *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Streptococcus*, v tenkém střevě se diverzita rozrůstá o rod *Clostridium* a *Bacteroides*. V tlustém střevě pak dominují rody *Clostridium*, *Bacillus*, *Ruminococcus* a *Fusobacterium*. Stav, kdy dochází k nežádoucím kvalitativním i kvantitativním změnám ve složení střevního mikrobiomu, mezi které řadíme i změny metabolické aktivity a změnu v distribuci mikroorganismů, se označuje termínem dysbióza. Bylo zjištěno, že se dysbióza uplatňuje u některých gastrointestinálních, psychiatrických, nádorových a metabolických onemocnění. Antibiotické preparáty jsou pak jedním z faktorů snižujících biodiverzitu střevního mikrobiomu. Dysbióza se může projevat ztrátou diverzity, sníženým výskytem prospěšných mikroorganismů anebo zvýšením podílu patogenních mikroorganismů (Karel & Hoch 2018).

## 3.2 Komenzální mikrobiota trávicího traktu

Komenzalizmus je speciální druh symbiózy, ve které jeden z partnerů ze vztahu benefituje, zatímco druhý není ovlivněn. Příkladem může být produkce specifického růstového faktoru, například vitamínu, pro druhý organismus. Typickým představitelem komenzálního vztahu je mikrobiota člověka (Hartel 2005). Komenzální mikrobiota, která obývá různé části gastrointestinálního traktu, je formována koevolucí s hostitelským druhem. Postupně dochází k vývoji symbiotického vztahu, který však vyžaduje rovnováhu, aby nedocházelo k poškození hostitele a zároveň mohla být tolerována přítomnost prospěšných mikrobů (Li et al. 2019).

Komenzální mikrobiota přispívá k výživě a energetické rovnováze hostitele a k rozvoji nebo udržování silného imunitního systému. Hostitel mikrobům poskytuje niku, ve které mohou přetrvávat a ze které mohou získávat živiny (Littman & Pamer 2011). Komenzální mikrobiota je pro zdraví člověka nezbytná. Nejenže zvyšuje dostupnost živin a podporuje vývoj střevního epitelu, ale také brání a inhibuje invazi patogenů. Mezi mechanismy, kterými komenzální mikrobiota brání v rozvoji patogenů, je především produkce antimikrobiálních látek, například bakteriocinů, změna pH či přímá konkurence o prostor a získání živin. Ke snižování pH prostředí dochází prostřednictvím produkce některých specifických metabolitů. Příkladem je produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) bakteriemi rodu *Lactobacillus* (Tungland 2018).

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1.1, komenzální mikrobiota trávicího traktu náleží do 4 hlavních kmenů: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria a Proteobacteria, z nichž dominantní část komenzální mikrobioty dospělého člověka tvoří právě kmeny Firmicutes a Bacteroidetes. Komenzální mikrobiota není tvořena pouze prospěšnými bakteriemi, ale i patogeny, které však u zdravého jedince tvoří 0,1 % i méně celkového mikrobiomu. Příkladem patogenních bakterií je *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Bacteroides fragilis* či *Clostridium difficile*. Podíl patogenních bakterií se může při narušení rovnováhy zvýšit (Jandhyala et al. 2015).

### 3.2.1 Firmicutes

Firmicutes jsou nejrozmanitější a nejhojnější skupinou gastrointestinální mikrobioty. Běžně tvoří více než polovinu gastrointestinální mikrobioty zdravého dospělého člověka. Kmen Firmicutes je tvořen 4 hlavními třídami: Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichi a Negativicutes. Většinou se jedná o grampozitivní, sporulující i nesporulující bakterie. Nejhojněji se v gastrointestinálním traktu vyskytují bakterie ze třídy Clostridia, ze které jsou početně

nejvýznamnější čeledi *Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae*. Další různorodou skupinou Firmicutes je třída Bacilli, která zahrnuje rody *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Firmicutes zastávají v gastrointestinálním traktu řadu důležitých funkcí, které plní především prospěšné bakterie rodu *Lactobacillus*, nicméně tato skupina zahrnuje také patogenní druhy, například *Clostridium difficile* (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014).

### 3.2.1.1 Čeleď *Clostridiaceae*

Čeleď *Clostridiaceae* je jedna z 19 čeledí řádu Clostridiales, třídy Clostridia. Taxony zařazené do této čeledi jsou obligátně anaerobní tyčinky. Převážně se jedná o grampozitivní bakterie až na některé termofilní druhy, které jsou ve všech fázích růstu gramnegativní. Kromě tyčinkovitých bakterií čeleď zahrnuje bakterie kokoidního či polymorfního tvaru. Většina druhů také tvoří endospory. Ostatní fyziologické vlastnosti jsou velmi variabilní (Vos et al. 2011).

#### 3.2.1.1.1 Rod *Clostridium*

Jedná se o tyčinky, pohyblivé či nepohyblivé, obvykle grampozitivní. Zpravidla jsou chemoorganotrofní, nicméně někteří zástupci mohou být chemoautotrofní či chemolitotrofní. Většina druhů vytváří oválnou či kulovitou endosporu. Optimální podmínky pro růst zahrnují teplotu od 30 do 37°C a pH v rozmezí 6,5 až 7 (Vos et al. 2011). Bakterie rodu *Clostridium* fermentují sacharidy pentózové i hexózové řady, proteiny, laktát, propionát a etanol. Konečnými produkty fermentace jsou 1,2-propandiol, acetát, oxid uhličitý, vodík, etanol, formiát, laktát, propionát, butyrát a valerát, z nichž butyrát je téměř u všech druhů hlavním metabolitem (Oliphant & Allen-Vercoe 2019). Butyrát je zdrojem energie pro střevní buňky a hraje klíčovou roli v regulaci proliferace. Dále chrání před infekcí zvýšením obranných bariér, především stimulací produkce mucinu (Kachrimanidou & Tsintarakis 2020).

##### 3.2.1.1.1.1 *Clostridium butyricum*

*Clostridium butyricum* (Prazmowski, 1880) je rovná tyčinka se zaoblenými konci, pohyblivá, vyskytující se jednotlivě, ve dvojicích či v krátkých řetězcích. Příležitostně se může vyskytovat v dlouhých vláknech. Spory jsou zpravidla oválné, centrální. Růst buněk je výrazně podporován substrátem obsahujícím zkvasitelné sacharidy. *Cl. butyricum* se běžně vyskytuje v půdě, vodě, ale i jako komenzální druh v trávicím traktu člověka i zvířat (Vos et al. 2011). Některé kmeny *Cl. butyricum* se díky produkci butyrátu používají jako probiotikum, jiné jsou

původci kojeneckého botulismu a nekrotizujících enterokolitid u předčasně narozených novorozenců (Cassir et al. 2016).

#### 3.2.1.1.1.2 *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* (syn. *Clostridioides difficile*) (Hall and O'Toole, 1935) je obvykle pohyblivá, peritrichální bakterie. Může se vyskytovat ve formě řetízků skládající se ze dvou až šesti buněk. Spora je oválná, subterminální, zřídka terminální. Optimální teplota pro růst je 30-37 °C, nicméně *Cl. difficile* může růst i při teplotách 25 až 45°C. Bakterie fermentuje většinu sacharidů, výjimkou je například laktóza, sacharóza a galaktóza. Běžně se vyskytuje v půdě, vodě, ale i v genitálním traktu a ve výkalech člověka (Vos et al. 2011). *Cl. difficile* je známý původce život ohrožující pseudomembranózní kolitidy, ke které dochází z důvodu přemnožení této bakterie ve střevech, obvykle po narušení přirozené mikrobioty antimikrobiální léčbou. Pseudomembranózní kolitida je způsobena poškozením buněk epitelu střev v důsledku produkce toxinu A a B touto bakterií. Onemocnění se projevuje vodnatými průjmy, horečkou nebo bolestí břicha a může být doprovázeno komplikacemi jako je sepse a v konečném důsledku i smrt (Delost 2020).

#### 3.2.1.1.1.3 *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* (Veillon a Zuber 1898) je pravidelná tyčinka s tupými konci. Vyskytuje se jednotlivě nebo ve dvojicích buněk. Tvoří velké, oválné, centrálně nebo subterminálně umístěné spory. Optimální podmínky pro růst jednotlivých kmenů se liší, nicméně teplotní optimum se nejčastěji pohybuje v rozmezí od 20 do 45 °C a pH od 5,5 do 8. Na základě produkce čtyř hlavních toxinů (alfa, beta, epsilon a iota) se jednotlivé kmeny rozdělují do 5 skupin: A, B, C, D a E. *Cl. perfringens* je běžnou součástí trávicího traktu člověka a zvířat, nicméně se jedná i o původce mnoha onemocnění především měkkých tkání, jako je plynatá gangréna či klostridiální myonekróza. Významu nabývá i jako původce enteritid ve spojení s otravou z jídla (Parija 2014).

#### 3.2.1.1.1.4 *Clostridium ramosum*

*Clostridium ramosum* (Veillon a Zuber, 1898), je nepohyblivá tyčinka, vyskytující se samostatně, v párech nebo v krátkých řetízkách. Spory jsou tenkostěnné, kulaté, obvykle terminálně umístěné. Optimální teplota růstu je 37 °C. Bakterie je běžnou součástí střevní mikrobioty člověka a je jen zřídka spojována s patogenními účinky (Vos et al. 2011).

### 3.2.1.2 Čeleď *Enterococcaceae*

Čeleď *Enterococcaceae* náleží do třídy Bacilli, řádu Lactobacillales. Kromě uvedené čeledi patří do řádu Lactobacillales také čeledi *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae* a *Streptococcaceae*. Řád zahrnuje grampozitivní tyčinky a koky, které netvoří spory a obvykle se jedná o fakultativně anaerobní bakterie (Vos et al. 2011). Lactobacillales jsou obecně nazývány bakteriemi mléčného kvašení, neboť při fermentaci sacharidů vytváří v různém poměru mléčnou kyselinu (Lonvaud-Funel 2014). Na základě produktů fermentace se bakterie mléčného kvašení rozdělují na heterofermentativní a homofermentativní. Homofermentativní bakterie při fermentaci vytváří výhradně mléčnou kyselinu, zatímco heterofermentativní vytváří kromě mléčné kyseliny i etanol, oxid uhličitý či octovou kyselinu. Mezi homofermentativní patří bakterie rodu *Pediococcus*, *Streptococcus* a některé druhy rodu *Lactobacillus*. Heterofermentativní jsou bakterie rodu *Leuconostoc* a také některé druhy rodu *Lactobacillus* (Moreno & Peinado 2012).

Čeleď *Enterococcaceae* zahrnuje rod *Bavariococcus*, *Catelicoccus*, *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* a *Vagococcus*. Tato čeleď zahrnuje koky vejčitého tvaru, které mohou být ve vztahu ke kyslíku fakultativně anaerobní, anaerobní či mikroaerofilní (Vos et al. 2011).

#### 3.2.1.2.1 Rod *Enterococcus*

Jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní koky. Některé druhy mohou být žlutě pigmentované. Buňky jsou vejčité, vyskytují se jednotlivě, v párech nebo krátkých řetízcích. Některé kmeny mohou být pohyblivé. Bakterie jsou chemoorganotrofní, vybavené fermentativním typem metabolismu. Bakterie jsou schopny fermentovat monosacharidy i polysacharidy. Jelikož se jedná o homofermentativní bakterie mléčného kvašení, vzniká při fermentaci dominantně mléčná kyselina. Optimální teplota pro růst je 30-37°C, některé druhy mohou růst i při vyšších teplotách (Vos et al. 2011). Někteří zástupci rodu *Enterococcus* jsou odolní vůči širokému rozmezí pH i teplot, což zvyšuje jejich konkurenceschopnost vůči ostatním mikroorganismům. Schopnost konkurence se také zvyšuje produkcí bakteriocinů, díky které jsou některé kmeny považovány za probiotické. Někteří zástupci jsou součástí fermentovaných potravin, nicméně rezistence vůči antibiotikům a virulence jsou důvodem, proč nebyl rodu *Enterococcus* udělen status GRAS (Generally recognised as safe). Avšak některé druhy se používají jako probiotika při výrobě veterinárních doplňků výživy (Hanchi et al. 2018).



Bakterie rodu *Enterococcus* jsou běžnou součástí gastrointestinálního traktu, nicméně v případě zavlečení na jiná místa mimo trávicí trakt mohou způsobit infekce. Především se jedná o infekce močových cest, žlučových cest, infekce ran, endokarditidu a infekce v pánevní oblasti. Enterokoky jsou taktéž nozokomiální patogeny, negativně působící v případě dlouhodobého užívání širokospektrálních antibiotik (Wanger et al. 2017).

#### 3.2.1.2.1.1 *Enterococcus faecium*

*Enterococcus faecium* (Orla-Jensen, 1919) může být izolován z potravin, prostředí či trávicího traktu. Významu nabývá jako nozokomiální patogen s přirozenou či získanou rezistencí vůči některým antibiotikům, jako je například vankomycin (Klare et al. 2003). Některé kmeny *E. faecium*, jako je *E. faecium* M74 a *E. faecium* SF-68, jsou pro své probiotické účinky používány ve veterinárních přípravcích, jako je Cernivet (Hanchi et al. 2018).

#### 3.2.1.3 Čeleď *Streptococcaceae*

Čeleď *Streptococcaceae* je dalším zástupcem třídy Baccili, řádu Lactobacillales. Zahrnuje rody *Lactococcus*, *Lactovum* a *Streptococcus* (Vos et al. 2011). Od roku 2017 je do čeledi řazen také rod *Floricoccus* (Chuah et al. 2017). Čeleď sdružuje grampozitivní, vejčité či kulovité koky, které nevytvářejí spory. Ve vztahu ke kyslíku jsou fakultativně anaerobní a k růstu mohou vyžadovat oxid uhličitý (Vos et al. 2011).

#### 3.2.1.3.1 Rod *Streptococcus*

Zástupci rodu *Streptococcus* se vyskytují v páru či uspořádané do řetízků. Prakticky všechny druhy jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, disponující fermentativním metabolismem. Bakterie rodu *Streptococcus* patří mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení a při fermentaci glukózy je dominantním metabolitem mléčná kyselina. Při fermentaci sacharidů může minoritně vznikat i mravenčí a octová kyselina, možná je však i produkce etanolu. Kromě sacharidů fermentují také mucin. Optimální teplotou pro růst je 37 °C, nicméně teplotní minimum a maximum se může lišit v závislosti na konkrétním druhu. Podmínky pro optimální růst běžně zajišťují komplexní média. Mnoho druhů tohoto rodu náleží mezi komenzální mikroorganismy, jiné mohou být vysoce patogenní (Vos et al. 2011)

#### 3.2.1.3.1.1 *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* (Clarke, 1924), se vyskytuje v párech nebo ve formě řetízků o krátké až střední délce. Za určitých podmínek může vytvářet i krátké tyčinky. Po anaerobní

kultivaci na krevním agaru tvoří šedé nebo bílé kolonie, které jsou nepravidelné či kruhové. V případě kultivace na agaru obsahující sacharózu vznikají kolonie obklopené rozpustnými exopolysacharidy (Vos et al. 2011). *S. mutans* dosahuje optimálního růstu v teplotním rozmezí od 35 do 37 °C, nicméně může růst i při vyšších teplotách. Nejčastěji je izolován z ústní dutiny člověka, konkrétně ze zubního plaku. Izolovat jej však lze i z výkalů. Je považován za patogenní druh, který se podílí především na vzniku zubního kazu. Jako oportunní patogen je však spojován i s infekční endokarditidou (Hossain 2014).

#### 3.2.1.3.1.2 *Streptococcus sanguinis*

*Streptococcus sanguinis* (White a Niven, 1946) může mít buňky uspořádané do krátkých řetízků či párů koků. Optimální teplotou pro růst je 37 °C. Jedná se o nepohyblivou bakterii, která je izolována především z dutiny ústní, kde je primárním kolonizátorem zubního plaku. *S. sanguinis* je primárně komenzálním druhem, nicméně je taktéž spojován se vznikem zubních kazů a také infekční endokarditidy a to v případě, že pronikne do krevního oběhu (Hossain 2014).

#### 3.2.1.3.1.3 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Orla-Jensen, 1919) se vyskytuje v páru nebo ve formě dlouhých řetízků. Buňky jsou vejčité či kulovité. Bakterie je schopna růstu i při teplotě 45 °C a přežívá záhřev na teplotu 65 °C po dobu 30 minut (Vos et al. 2011). Přirozeně se vyskytuje v mléčných výrobcích a je hojně používán jako startovací kultura při jejich výrobě. Společně s bakterií *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je součástí tzv. jogurtové kultury (Uriot et al. 2017). Jako primární produkt při fermentaci mléčných výrobků vzniká mléčná kyselina. Kromě mléčné kyseliny vznikají i sekundární metabolity jako je acetaldehyd a exopolysacharidy, které ovlivňují aroma a strukturu fermentovaných výrobků. Za určitých podmínek fermentace může dojít také ke vzniku mravenčanu a octanu (Markakiou et al. 2020).

Přesto, že není doposud spolehlivě objasněno, zda tento druh je či není schopný kolonizovat lidský gastrointestinální trakt, jsou popisovány jeho pozitivní účinky na lidský organismus. Příkladem je schopnost zlepšovat trávení laktózy u jedinců s laktózovou intolerancí či produkce látek, snižujících zánětlivou reakci v intestinální oblasti (Burton et al. 2017)

#### 3.2.1.4 Čeleď *Lactobacillaceae*

Čeleď *Lactobacillaceae* taktéž náleží do třídy Bacilli, řádu Lactobacillales. Zahrnuje rody *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* a *Pediococcus* (Vos et al. 2011). Nicméně v roce 2020 došlo ke kompletní reklasifikaci a do čeledi je nyní řazeno více než 23 rodů (Zheng et al. 2020).

Jednotliví zástupci čeledi se liší tvarem buněk, které mohou být dlouhé, štíhlé, zahnuté, či se může jednat o krátké koryneformní kokobacily nebo kulovité buňky. Společným znakem je tvorba řetízků, vyjma zástupců rodu *Pediococcus*, které vytváří páry nebo tetrády. Bakterie nevytvářejí spory, jsou grampozitivní, vybavené fermentačním metabolismem (Vos et al. 2011).

##### 3.2.1.4.1 Rod *Lactobacillus*

Jedná se o skupinu fakultativně anaerobních bakterií, variabilních tvarů buněk. Druhy rodu *Lactobacillus*, patří mezi bakterie mléčného kvašení, kde alespoň polovinu vytvořených uhlíkatých produktů tvoří laktát, který není obvykle dále fermentován (Vos et al. 2011). Kromě sacharidů fermentují také 1,2-propandiol. Vyjma mléčné kyseliny je fermentací produkován také acetát, etanol, oxid uhličitý, formiát, propanol a propionát (Oliphant & Allen-Vercoe 2019). Optimální podmínky pro růst zahrnují teplotu spadající do teplotního rozmezí 30 až 40 °C a pH od 5,5 do 6,2. Zástupce tohoto rodu lze nalézt v mléčných produktech, obilných výrobcích, ovoci, nakládané zelenině, siláži, vodě i půdě. U člověka i zvířat jsou součástí mikrobiomu střev a dutiny ústní (Vos et al. 2011). U některých druhů rodu *Lactobacillus* bylo zjištěno, že se mohou, prostřednictvím produkce kyselin, podílet na postupu již existujících zubních kazů. Jedná se například o *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei* či *L. rhamnosus* (Ahirwar et al. 2019).

##### 3.2.1.4.1.1 *Lactobacillus rhamnosus*

*Lactobacillus rhamnosus* (Hansen, 1968) je tyčinkovitá, nepohyblivá, fakultativně heterofermentativní bakterie. Vyskytuje se v mléčných výrobcích a je součástí trávicího traktu člověka. Jedná se o jednu z nejvíce prozkoumaných probiotických bakterií, která je schopna přežít kyselé prostředí žaludku a působení žlučových kyselin. *L. rhamnosus* prokazatelně chrání před infekcemi močových cest a je využíván v terapii zánětlivých onemocnění střev (Parian et al. 2018).

#### 3.2.1.4.1.2 *Lactobacillus johnsonii*

*Lactobacillus johnsonii* (Fujisawa, 1992) je obligátně homofermentativní probiotická bakterie, s buňkami tvaru dlouhých či krátkých tyčinek. Vyskytuje se jednotlivě či v párech, někdy v krátkých řetízcích. Je součástí normální intestinální a vaginální mikrobioty člověka (Vos et al. 2011).

#### 3.2.1.4.1.3 *Lactobacillus brevis*

*Lactobacillus brevis* (Orla-Jensen, 1919) je obligátně heterofermentativní, probiotická bakterie. Buňky tvaru tyčinek se vyskytují samostatně nebo uspořádané do krátkých řetízků. Používá se k výrobě fermentovaných produktů, avšak za určitých okolností může i potraviny znehodnocovat (Teixeira 2014).

#### 3.2.1.4.1.4 *Lactobacillus acidophilus*

Obligátně homofermentativní *Lactobacillus acidophilus* (Moro, 1900) se vyskytuje samostatně, v párech či krátkých řetízcích. Jedná se o nepohyblivou tyčinku se zaoblenými konci buněk. Bakterie může být izolována z trávicího traktu člověka i zvířat, z ústní dutiny a pochvy. V potravinách se vyskytuje v mléčných výrobcích, víně a kvásku. Jedná se o probiotický druh s mnoha pozitivními účinky, jako je prevence cestovatelských a novorozeneckých průjmů a snížení gastrointestinálních potíží u jedinců s laktózovou intolerancí (Gopal 2011).

#### 3.2.1.4.1.5 *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*

*Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* (Orla-Jensen, 1919) je probiotická, nepohyblivá tyčinka se zaoblenými konci. Tato obligátně homofermentativní bakterie, fermentující pouze některé sacharidy, je schopná růstu i při 48-52 °C. Této vlastnosti se využívá při výrobě jogurtů, mozzarely či ementálu. (Vos et al. 2011).

#### 3.2.1.4.1.6 *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* (Orla-Jensen, 1916) je nepohyblivá, probiotická bakterie se zakulacenými konci buněk. Buňky bakterie se mohou formovat v řetízky. Jedná se o fakultativně heterofermentativní bakterii. Hexózy jsou konvertovány téměř výhradně na mléčnou kyselinu. Pentózy jsou metabolizovány na mléčnou a octovou kyselinu. Bakterie se vyskytuje v mléčných výrobcích, siláži a lidském intestinálním traktu. Taktéž je součástí mikrobioty dutiny ústní a pochvy (Gobbetti & Minervini 2014).

#### 3.2.1.4.1.7 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

Fakultativně heterofermentativní bakterie *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Collins, Phillips a Zaroni, 1989) je nepohyblivá tyčinka, vyskytující se jednotlivě či v řetízkách. Může být izolována z mléčných produktů, odpadních vod, siláže a trávicího traktu člověka. Bakterie je využívána jako probiotikum či synbiotikum (Jones 2017).

### 3.2.2 Bacteroidetes

Bakterie, které patří do kmene Bacteroidetes se vyskytují hojně v gastrointestinálním traktu. V 1 gramu střevního obsahu se nachází až  $10^{11}$  buněk. Kolonizace gastrointestinálního traktu bakteriemi Bacteroidetes začíná již u kojenců, neboť je jejich růst podporován nestravitelnými oligosacharidy (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014).

Kmen Bacteroidetes zahrnuje čtyři třídy: Bacteroidia, Cytophagia, Flavobacteria a Sphingobacteria, z nichž nejpočetnější je třída Flavobacteria, která sdružuje zhruba čtyřikrát více druhů než ostatní třídy. Mezi početné řády tohoto kmene patří Bacteroidales, Flavobacteriales, Chitinophagales a Sphingobacteriales (Thomas et al. 2011).

#### 3.2.2.1 Čeleď *Bacteroidaceae*

Čeleď *Bacteroidaceae* patří do třídy Bacteroidia a řádu Bacteroidales. Zahrnuje rody *Acetofilamentum*, *Acetothermus*, *Bacteroides* a *Phocaeicola*. Do čeledi patří rovné, anaerobní, gramnegativní tyčinky, které nevytvářejí spory (Trujillo et al. 2015).

##### 3.2.2.1.1 Rod *Bacteroides*

Jedná se o skupinu obligátně anaerobních, nepohyblivých bakterií tvaru tyčinek se zaoblenými konci buněk. Bakterie vytváří velkou kapsuli, ale nevytváří spory. Jsou chemoorganotrofní, fermentující sacharidy, proteiny a sukcinát. Produktem fermentace je 1,2-propandiol, oxid uhličitý, vodík, etanol, propionát, formiát, sukcinát a acetát (Oliphant & Allen-Vercoe 2019). Optimálního růstu dosahují při teplotě 37 °C a pH blízcím se hodnotě 7. Bakterie jsou běžnou součástí lidského trávicího traktu či ženského pohlavního ústrojí. Někteří zástupci mohou být původci infekcí, především tedy v trávicím traktu, jiní mohou mít probiotické vlastnosti (Parte et al. 2011).

##### 3.2.2.1.1.1 *Bacteroides thetaiotaomicron*

*Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso, 1919), bakterie pleiomorfního tvaru buněk, vyskytující se jednotlivě nebo v párech. Některé kmeny tohoto druhu mohou být vybaveny kapsulí.

Bakterie je komenzálním druhem intestinálního mikrobiomu, nicméně se jedná i o oportunní patogen (Parte et al. 2011). Pozitivní význam této bakterie spočívá v trávení polysacharidů a glykanů a v podpoře imunitního systému hostitele. Bakterie taktéž produkuje organické kyseliny s krátkým řetězcem, které mohou být hostitelem využity jako zdroj energie (Porter et al. 2018). K patogennímu působení dochází, pokud se bakterie dostane mimo své přirozené prostředí trávicího traktu. V takovém případě může docházet ke vzniku bakterenémie či abscesů (Wexler 2007).

#### 3.2.2.1.1.2 *Bacteroides fragilis*

*Bacteroides fragilis* (Veillon a Zuber, 1898) se vyskytuje jednotlivě nebo v párech buněk. Bakterie vytváří kapsuli. Je schopna růstu v teplotním rozmezí od 25 do 45 ° C, při pH 8,5, nicméně většina kmenů dosahuje rychlejšího růstu při hodnotě pH 7. Přestože se jedná o obligátně anaerobní bakterii, jsou buňky schopny přežít vystavení vzduchu až po dobu 8 hodin. Tato částečná aerotolerance, spolu s produkcí kapsulárních polysacharidů, které jsou odolné vůči fagocytóze, patří mezi faktory zvyšující patogenitu. Enterotoxin, který některé kmeny této bakterie také produkuje, má mnoho patologických účinků na buňky střevní sliznice. Tento enterotoxin je spojován s infekcemi v trávicím traktu, jako je například apendicitida či s infekcí peritonea a urogenitálního traktu. *B. fragilis* však zůstává primárně komenzálním druhem, který je součástí normální střevní mikrobioty člověka (Parte et al. 2011).

### 3.2.3 Actinobacteria

Kmen Actinobacteria se hojně vyskytuje v gastrointestinálním traktu. Sdružuje grampozitivní bakterie, které náleží do šesti hlavních tříd: Acidimicrobia, Actinobacteria, Coriobacteriia, Nitrospirae, Rubrobacteria a Thermoleophilia. Významná je především třída Actinobacteria, do které náleží řád Bifidobacteriales, který je, zejména s rodem *Bifidobacterium*, jedním z prvních, osídlujících gastrointestinální trakt. Dalšími početnými řády, patřícími do třídy Actinobacteria, jsou Actinomycetales a Corynebacteriales (Lawson 2018).

#### 3.2.3.1 Čeleď *Bifidobacteriaceae*

Čeleď *Bifidobacteriaceae* náleží do řádu Bifidobacteriales. Zahrnuje rody *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bifidobacterium*, *Bombiscardovia*, *Galliscardovia*, *Gardnerella*, *Neoscardovia*, *Parascardovia*, *Pseudoscardovia* a *Scardovia*. Čeleď sdružuje pleiomorfní tyčinky, vyskytující se jednotlivě nebo v mnohobuněčných řetězcích či shlucích. Buňky

nevytváří kapsule ani spory, jsou nepohyblivé a až na výjimku grampozitivní. Jsou to převážně anerobní bakterie, nicméně některé druhy rodu *Bifidobacterium* mohou tolerovat kyslík, avšak pouze za současné přítomnosti oxidu uhličitého (Biavati 2015).

#### 3.2.3.1.1 Rod *Bifidobacterium*

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou až na výjimky grampozitivní, striktně anaerobní či mikroaerofilní bakterie. Optimálního růstu dosahují v teplotním rozmezí od 35 do 39 °C. Bakterie jsou chemoorganotrofní a disponují fermentativním typem metabolismu. Při utilizaci sacharidů dochází k tvorbě kyselin, především octové, mléčné a mravenčí kyseliny, ale ne ke tvorbě plynu. Vyskytují se u zvířat i lidí jako součást přirozené mikrobioty ve střevech a v dutině ústní, nalézt je můžeme i v potravinách. Až na výjimky, kterými jsou například některé bifidobakterie spojené se vznikem zubního kazu, se nejedná o patogenní organismy (Dworkin et al. 2006).

Zástupci tohoto rodu jsou považováni za jedny z prvních mikroorganismů, které osídlují lidský trávicí trakt. Speciálně *B. longum*, *B. breve* a *B. bifidum* byly identifikovány jako jedna z dominantních složek střevního mikrobiomu u kojených dětí. Tyto druhy včetně *B. adolescentis* vykazují probiotické účinky (Charalampopoulos & Rastall 2009). Probiotické účinky spočívají například v podpoře zvýšení metabolické aktivity a imunitní odpovědi epiteliálních buněk či potlačení růstu koliformních bakterií, produkujících plyn. Zvýšený výskyt koliformních bakterií v intestinální oblasti novorozenců je předpokladem pro vznik novorozeneckých kolik (Simone et al. 2014).

##### 3.2.3.1.1.1 *Bifidobacterium bifidum*

*Bifidobacterium bifidum* (Tissier, 1900) je bakterie rozmanitých tvarů, vyskytující se ve dvou biovarech: a a b. Biovar a převládá v trávicím traktu dospělých jedinců, zatímco biovar b převládá v trávicím traktu novorozenců. Jednotlivé varianty se od sebe liší fermentací sacharidů, jako je sacharóza a maltóza. Některé kmeny produkují bakteriocin, bifidocin B, který působí proti rozvoji patogenních grampozitivních bakterií. Pro své probiotické účinky je hojně využívána při výrobě fermentovaných mléčných výrobků (Parte et al. 2012).

##### 3.2.3.1.1.2 *Bifidobacterium adolescentis*

*Bifidobacterium adolescentis* (Reuter, 1963) je probiotický druh převládající v trávicím traktu dospělých jedinců. Jsou známy čtyři biovary (a, b, e a d), lišící se sérologickými vlastnostmi a fermentací manitolu a sorbitolu (Parte et al. 2012).

#### 3.2.3.1.1.3 *Bifidobacterium breve*

Druh *Bifidobacterium breve* (Reuter, 1963) zahrnuje bakterie s nejtenšími a nejkratšími buňkami napříč rodem *Bifidobacterium*. Tato probiotická bakterie vykazuje imuno-stimulační účinky a antimikrobiální aktivitu vůči lidským patogenům. Díky výskytu v mateřském mléce dominantně osídluje trávicí trakt kojenců (Bozzi Cionci et al. 2018).

#### 3.2.3.1.1.4 *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*

*Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* (Reuter, 1963) je probiotická, tyčinkovitá bakterie, osídlující lidský trávicí trakt. Převažuje v gastrointestinálním traktu dětí, kde tvoří až 90 % mikrobioty. Toto číslo se s věkem snižuje až na přibližně 3 % v dospělém věku (Kuslovic et al. 2020).

### 3.2.4 Proteobacteria

Kmen Proteobacteria je skupina gramnegativních bakterií, která v gastrointestinálním traktu není příliš hojná, neboť tvoří asi 1 % celkové mikrobioty. Proteobacteria tvoří 5 tříd: alfa, beta, gama, delta a epsilonproteobacteria. Převládající skupinou je třída Gammaproteobacteria, s čeledí *Enterobacteriaceae* (Rajilić-Stojanović & de Vos 2014).

#### 3.2.4.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* náleží do třídy Gammaproteobacteria a řádu Enterobacteriales. Čeleď zahrnuje gramnegativní rovné tyčinky, které jsou až na výjimku pohyblivé díky peritrichózním bičíkům. Bakterie nevytvářejí endospory a jsou schopné růstu v přítomnosti či absenci kyslíku. Jedná se o chemoorganotrofní bakterie, vybavené respiračním i fermentačním metabolismem (Garrity et al. 2007).

Mezi významné rody náležící do čeledi *Enterobacteriaceae* patří *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* a další (Rock & Donnenberg 2014).

##### 3.2.4.1.1 Rod *Escherichia*

Jedná se o skupinu aerobních či fakultativně anaerobních, rovných, cylindrických tyčinek, vyskytujících se jednotlivě či v párech. Některé druhy jsou schopny pohybu pomocí peritrichózních bičíků, některé jsou nepohyblivé. Bakterie jsou chemoorganotrofní, disponující respiračním i fermentačním metabolismem. Optimálního růstu dosahují na médiích obsahující pepton, masový extrakt a na McConkey agaru, nejčastěji při teplotě 25-35 °C. Při fermentaci



substrátu tvořeném polyhydroxyalkoholy a sacharidy, například D-glukózou, často dochází ke tvorbě kyselin a plynu (Garrity et al. 2007).

#### 3.2.4.1.1.1 *Escherichia coli*

Pravděpodobně nejvýznamnějším druhem tohoto rodu je *Escherichia coli*. Jedná se o fakultativně anaerobní druh, který se vyskytuje především jako běžná součást mikrobioty střev člověka a homoiotermních zvířat (Hancock et al. 2010). Bakterie rozkládá proteiny a sacharidy za vzniku acetátu, oxidu uhličitého, vodíku, etanolu, sukcinátu, mravenčí a mléčné kyseliny. Vznikat může také 1,2-propandiol a 2,3-butandiol (Oliphant & Allen-Vercoe 2019). Některé kmeny mohou způsobovat mnohá, různě závažná onemocnění, jako je infekce močových cest, průjem či meningitida, jiní patří mezi kmeny probiotické (Hancock et al. 2010).

Mezi patogeny patří zástupci 6 kategorií: *E. coli* enteropatogenní (EPEC), enterohemoragické (EHEC), enterotoxigenní (ETEC), enteroagregativní (EAEC), enteroinvazivní (EIEC) a difúzně adherentní (DAEC) (Kaper et al. 2004).

Naopak *E. coli* Nissle 1917 je díky svým antagonistickým účinkům vůči patogenním mikroorganismům součástí probiotických preparátů, užívaných hlavně při onemocnění střev (Cartwright 2003).

#### 3.2.4.1.2 Rod *Salmonella*

Zástupci rodu *Salmonella* jsou fakultativně anaerobní, nesporulující, rovné tyčinky. Díky přítomnosti bičíků se jedná o pohyblivé organismy. Jsou vybaveny fermentativním i oxidativním typem metabolismu. Při fermentaci sacharidů vznikají kyseliny nebo kombinace kyselin a plynu. Například monosacharid glukóza je fermentován za vzniku mravenčanu, etanolu, acetátu či laktátu. Bakterie jsou schopny růstu v teplotním rozmezí od 7 do 48 °C, s optimem při 37 °C a pH 6,5-7,5 (Garrity et al. 2007).

##### 3.2.4.1.2.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Je známo přinejmenším 1443 sérovarů bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Kauffmann a Edwards, 1952), které obývají trávicí trakt člověka a teplotokrevných živočichů. Mezi nejvýznamnější z nich patří sérovar Enteritidis (Kauffman and Edwards, 1952) a sérovar Typhimurium (Loeffler, 1892) (Garrity et al. 2007). *S. Enteritidis* osídluje trávicí trakt člověka, drůbeže a hlodavců a *S. Typhimurium* je součástí mikrobioty člověka, drůbeže, prasat, skotu a hlodavců (Dworkin et al. 2006).

Krom přirozené mikrobioty jsou oba sérovary intracelulárními patogeny, způsobující infekce. K infekcím dochází při požití více než 50 000 buněk bakterií prostřednictvím kontaminované potravy či vody. Inkubační doba je obvykle v rozmezí od 6 do 72 hodin. Mezi projevy infekce patří akutní nástup horečky, bolesti břicha, průjmu, nevolnosti a zvracení. Konkrétně *S. Typhimurium* je bakterie odolná vůči kyselému prostředí žaludku, které překonává aktivací acido-tolerantní odpovědi, díky které je schopna udržovat pH vnitřního prostředí na vyšších hodnotách, než je pH okolního prostředí (Fàbrega & Vila 2013).

Zdrojem infekce *S. Enteritidis* jsou nejčastěji slepičí vejce, jejichž obsah nebyl pro konzumaci dostatečně tepelně opracován. Ke vstupu bakterie do vajec dochází ještě před vytvořením skořápky prostřednictvím infekce ovarii drůbeže. Proto jsou vejce zdrojem infekce i v případě neporušené skořápky. Na rozdíl od člověka probíhá infekce u drůbeže většinou asymptomaticky (Agron et al. 2001).

#### 3.2.4.1.3 Rod *Klebsiella*

Jedná se o skupinu fakultativně anaerobních, nepohyblivých, rovných tyčinek, uspořádaných jednotlivě, v párech či do krátkých řetízků. Buňky jsou obklopeny hydrofilní, polysacharidovou kapsulou. Bakterie disponují respiračním i fermentačním metabolismem. Glukóza je fermentována za vzniku kyselin a plynů. Optimální teplota pro růst je obvykle 30 až 37 °C (Garrity et al. 2007).

##### 3.2.4.1.3.1 *Klebsiella aerogenes*

*Klebsiella aerogenes* (Hormaeche a Edwards, 1960) je běžnou součástí trávicího traktu člověka, lze ji však nalézt i v močových či dýchacích cestách. Její genetické predispozice k adaptaci na vnější podmínky a stres přispěly k rozvoji rezistence této bakterie vůči antibiotikům. *K. aerogenes* totiž vyniká schopností přizpůsobovat svůj metabolismus různým prostředím a hostitelům. Klinického významu nabývá jako nozokomiální patogen, způsobující infekci dýchacích a močových cest (Davin-Regli 2015).

### 3.3 Vliv stravy na složení mikrobiomu trávicího traktu

Strava je jedním z faktorů, které významnou mírou určují složení mikrobiomu a jeden z mála, které je člověk schopen ovlivnit. Jak již bylo diskutováno v kapitole 3.1.1, významný vliv stravy na složení mikrobiomu, se začíná projevovat již po porodu, neboť byly zjištěny rozdíly v uspořádání mikrobiomu u dětí kojených mateřským mlékem a u dětí krmených náhražkami mateřského mléka. I během dospělosti zůstává strava nejdůležitějším činitelem,

ovlivňujícím složení mikrobiomu. Vyšší příjem ovoce a zeleniny a tedy i vlákniny, je obecně spojován s vyšší rozmanitostí mikrobioty. U jedinců přijímajících velké množství nerozpustných sacharidů dochází k nárůstu mikroorganismů metabolizujících sacharidy, tedy převážně bakterie kmene Firmicutes. Naopak strava bohatá na živočišné produkty vede ke snížení zástupců kmene Firmicutes a zvýšení podílu Bacteroidetes a Proteobacteria. V dnešní době je konzumována především strava bohatá na živočišné bílkoviny, cukr, škroby a chudá na vlákninu. Konzumace této tzv. západní stravy vede ke zvýšení bakterií kmene Bacteroidetes (Jandhyala et al. 2015).

Singh et al. (2017) udává, že stravou lze modifikovat poměr ve výskytu dominantních kmenů. Dlouhodobá špatná životospráva může v extrémních případech vést až ke vzniku různých onemocnění. Například chronické onemocnění, kterým je obezita, je spojováno se změnou poměru mezi kmeny Bacteroidetes a Firmicutes, kdy byl u obézních jedinců zjištěn výrazně vyšší nárůst kmenů Firmicutes. Gomes et al. (2018) tvrdí, že vyšší výskyt bakterií kmene Firmicutes koreluje s vyšším procentem tělesného tuku a se zvýšeným ziskem energie z potravy.

Kromě základních složek, se v potravinách vyskytují i přídavné látky, které dle posledních výzkumů taktéž mohou ovlivňovat uspořádání mikrobiomu. Například benzoová kyselina, používaná jako konzervant, snižuje podíl bakterií mléčného kvašení a také podíl bakterií koliformních. Mezi přídavné látky patří i syntetická sladidla a cukerné alkoholy. I u nich je předpokládán účinek na uspořádání mikrobioty (Gultekin et al. 2019).

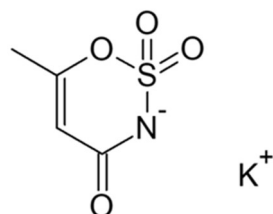
### **3.4 Syntetická sladidla**

Syntetická sladidla představují skupinu sladce chutnajících sloučenin, jež po požití v podstatě nepřispívají energetickou hodnotou. Syntetická sladidla jsou často nazývána jako nenutriční, nízkokalorická či nekalorická. Tento druh sladidel se vyznačuje vysokou intenzitou sladivosti, která může být v porovnání s cukrem až 11000krát vyšší. Z tohoto důvodu jsou přidávány do nápojů a potravin ve velice malé koncentraci. Syntetická sladidla jsou definována jako potravinová aditiva, a proto je jejich používání upraveno legislativou. Používání umělých sladidel se za poslední desetiletí dramaticky zvýšilo. Nejpoužívanějším umělým sladidlem je sukralóza, jež dávno předstihla aspartam, který byl na trhu dominantní. Mezi výrobky slazené umělými sladidly patří především dietní nápoje, jogurty, žvýkačky, mražené dezerty, pekařské výrobky, cereálie a cukrářské výrobky. Sladidla se navzájem odlišují chuťovým profilem, fyzikálními a chemickými vlastnostmi, a proto se jejich použití různí (Goran et al. 2014).

### 3.4.1 Acesulfam K

Acesulfam K je bílý krystalický prášek. Po chemické stránce se jedná o draselnou sůl (viz Obrázek 1), se systematickým názvem 6-methyl-2,2-dioxo-2H-1,2λ6,3-oxathiazin-4-olat draselný. Acesulfam K je dnes součástí mnoha potravin, nápojů, přípravků pro ústní hygienu či farmaceutických produktů. Často je kombinován s jinými sladidly (především s aspartamem), aby bylo docíleno ideální sladké chuti daného produktu. Je přidáván do výrobků pro diabetiky, jako jsou cukrovinky, pudinky, konzervy a pečivo. Jelikož se jedná o potravinové aditivum, je na obalech značen jako E950 (Barclay et al. 2014).

Komerčně je prodáván pod názvem Sunette, Sweet One nebo Swiss Sweet (Newton 2009).



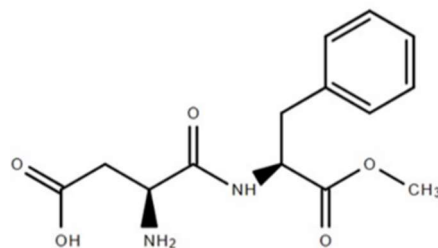
Obrázek 1 Acesulfam K

### 3.4.2 Aspartam

Aspartam je methylester dvou aminokyselin - fenylalaninu a kyseliny asparagové (viz Obrázek 2). Jeho syntéza probíhá za použití L enantiomeru fenylalaninu (Myers 2007).

Aspartam se jako umělé sladidlo prodává pod názvem NutraSweet či Equal. Potravinový průmysl jej používá především v dietních nápojích, kde z důvodu jeho toxicity pro jedince s fenylketonurií musí být jeho přítomnost označena. Aspartam je teplotně nestálý. Zahříváním se aspartam rozkládá na výchozí sloučeniny a ztrácí tak svou sladkou chuť. Proto nemůže být přidáván do pekařských výrobků (McGuire & Beerman 2012).

V Evropě je aspartam schválen též jako potravinové aditivum a na obalech se značí kódem E 951 (Barclay et al. 2014).

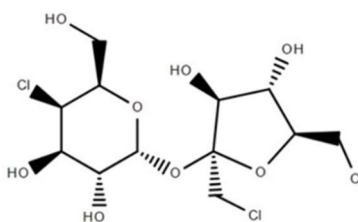


Obrázek 2 Aspartam

### 3.4.3 Sukralóza

Sukralóza je bílý krystalický prášek se sumárním vzorcem  $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$  (viz Obrázek 3), vysoce rozpustný ve vodě a ethanolu. Po chemické stránce se jedná o substituovaný disacharid. Má příjemnou sladkou chuť, podobnou sacharóze. Sukralóza se vyrábí selektivní chlorací v pozici 1 a 6 molekuly fruktózy a v pozici 4 molekuly glukózy. Chlorace způsobuje vyšší odolnost glykosidické vazby vůči kyselé a enzymatické hydrolýze. Odolnost glykosidické vazby je také důvodem neschopnosti lidského těla metabolizovat sukralózu jako zdroj energie. Je vysoce teplotně stabilní, přidává se do pekařských výrobků, nápojů a dietních potravin (O'Brien-Nabors 2016).

Na trhu se prodává pod obchodním názvem Splenda a na obalech potravin se její přítomnost značí kódem E 955 (Barclay et al. 2014).



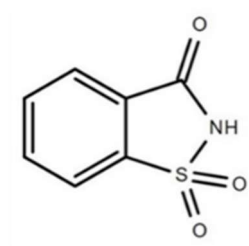
Obrázek 3 Sukralóza

### 3.4.4 Sacharin

Sacharin je bílá pevná krystalická látka se sumárním vzorcem  $C_7H_5NO_3S$ . Po chemické stránce se jedná o imid 2-sulfobenzoové kyseliny (viz Obrázek 4). Je teplotně stabilní a chemicky nereaguje s ostatními potravinovými ingrediencemi. Sacharin lze syntetizovat prvotní reakcí mezi toluenem a chlorsulfonovou kyselinou, při které vzniká sulfonamid. Jeho oxidací vzniká kyselina benzoová, jejímž zahříváním vzniká cyklický imid. Při použití

sacharinu ve vyšších koncentracích se objevuje hořká, až kovová pachut', a proto je kombinován s jinými sladidly (Okoduwa et al. 2013).

Sacharin je dnes schválen jako potravinové aditivum ve více než 100 zemích světa. Na obalech potravin je značen kódem E 954 a komerčně se vyrábí pod názvem Sweet'N Low nebo Sugar Twin. Přidává se do nápojů, marmelád, salátových dresinků, sterilované zeleniny a cukrovinek (Barclay et al. 2014).



Obrázek 4 Sacharin

### 3.5 Cukerné alkoholy

Cukerné alkoholy jsou sloučeniny získané redukcí aldo a keto skupin cukrů na hydroxylové skupiny. Cukerné alkoholy jsou také označovány jako polyoly, polyalkoholy či vícesytné alkoholy. Některé z polyolů se přirozeně vyskytují v mnoha druzích ovoce a zeleniny, nicméně pro potravinářské odvětví jsou vyráběny průmyslově katalytickou hydrogenací či fermentací. Cukerné alkoholy svými chemickými, fyzikálními a biologickými vlastnostmi připomínají cukry. Z tohoto důvodu se některé z nich používají jako náhražky cukru, neboť sladce chutnají a mohou mít i nižší kalorickou hodnotu. Kromě nižší kalorické hodnoty také jen zanedbatelně ovlivňují hladinu krevního cukru (deMan et al. 2018).

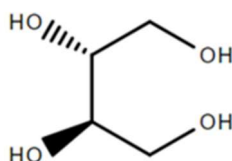
Ze skupiny cukerných alkoholů byl pro výzkum vybrán erythritol, izomalt, sorbitol a xylitol.

#### 3.5.1 Erythritol

Erythritol je sladidlem ze skupiny cukerných alkoholů. Vyskytuje se přirozeně v některých druzích ovoce a fermentovaných potravinách. Vyráběn je průmyslově fermentací glukózy. V některých státech, jako je Japonsko nebo státy Evropské Unie, může být jeho kalorická hodnota redukována na 0 kcal/g. Jeho sladivost se rovná asi 60 % sladivosti sacharózy (Tiefenbacher 2017).

Erythritol je acyklický cukerný alkohol tvořený čtyřmi uhlíky, z nichž každý nese hydroxylovou skupinu (viz Obrázek 5). Jedná se o achirální molekulu bez optické rotace. Je to

bílá krystalická látka bez zápachu, která nepoutá a neudrzuje vzdušnou vlhkost. Erythritol je používán jako nízkokalorické sladidlo v mléčných produktech, zmrzlinách, pudincích, bonbonech a cereálních tyčinkách, kde nahrazuje cukr. V dietních výrobcích může být kombinován i s jinými sladidly, především s aspartamem a acesulfamem K. Je přidáván do žvýkaček a bonbonů, neboť stejně jako xylitol evokuje v ústech chladivý pocit. Erythritol také zvyšuje stabilitu výrobků při pečení a prodlužuje skladovatelnost (Varzakas et al. 2012). Jako potravinové aditivum nese označení E 968 (Tiefenbacher 2017).



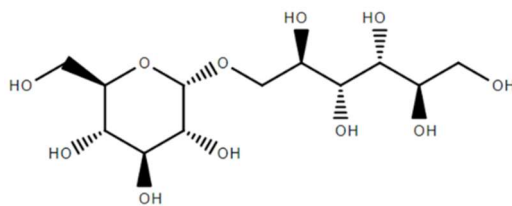
Obrázek 5 Erythritol

### 3.5.2 Izomalt

Izomalt je cukerný alkohol odvozený od sacharózy se sumárním vzorcem  $C_{12}H_{24}O_{11}$  (viz Obrázek 6). Je tvořen ekvimolárním množstvím 2 izomerů označovaných jako glukomanitol a glukosorbitol. Jedná se o bílý nehygroskopický prášek, který vyniká svou tepelnou stabilitou a rezistencí vůči chemické degradaci, která je přisuzována stabilní glykosidické vazbě (McNutt & Sentko 2003).

Má čistou, sladkou chuť podobnou sacharóze, přitom dosahuje pouze 45% až 60% sladivosti v porovnání s cukrem. Často je používán ve směsi různých sladidel, neboť má schopnost tlumit kovovou příchuť některých z nich. Izomalt zvyšuje glykémii jen velmi málo, a proto je vhodnou náhradou sacharózy pro diabetiky. Kalorická hodnota dosahuje pouze 2 kcal/g. Pro své vlastnosti je používán jako náhražka cukru nejen v potravinách, ale i ve farmaceutickém průmyslu. Izomalt je nejčastěji součástí žvýkaček, bonbónů a čokolád. Jako přídatná látka je na obalech potravin značen jako E 953 (Mitchell 2008).

V potravinách má úlohu protispékavé látky, objemového a glazovacího činidla, stabilizátoru a zahušťovadla (McNutt & Sentko 2003).



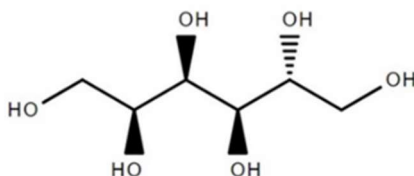
Obrázek 6 Izomalt

### 3.5.3 Sorbitol

Sorbitol je cukerný alkohol hexitolové řady se šesti uhlíky a šesti hydroxylovými skupinami (viz Obrázek 7). Je vyráběn katalytickou hydrogenací glukózy, při které vzniká i malé množství mannitolu, což je další alkoholický cukr hexitolové řady. Přírodně je sorbitol formován v listech a ovoci jako meziprodukt syntézy škrobu, celulózy, sorbózy či vitamínu C. Nachází se především ve švestkách, hruškách a broskvích. Ve formě prášku se sorbitol uplatňuje jako sladidlo v potravinách pro diabetiky, žvýkačkách a čokoládě. Sorbitolový sirup se využívá jako stabilizátor vlhkosti v cukrářských výrobcích, majonézách a dresincích, rybích produktech, kandovaném ovoci a zmrzlínách. Sirup se používá v 5-10% koncentraci, zatímco práškový v 10-100% koncentraci (Varzakas et al. 2012).

Přestože se přírodně vyskytuje v mnoha druzích ovoce, je komerčně vyráběn z kukuřice, pšenice, brambor a tapioky. Sorbitol dosahuje asi 60% sladivosti sacharózy a je používán jako náhražka cukru v redukčních dietách a diabetických výrobcích (Barclay et al. 2014)

Sorbitol je potravinovým aditivem a na obalech výrobků nese označení E 420 (Tiefenbacher 2017).



Obrázek 7 Sorbitol

### 3.5.4 Xylitol

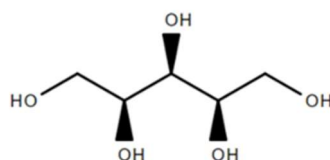
Xylitol je cukerný alkohol pentitolové řady, mající pět uhlíků a pět hydroxylových skupin (viz Obrázek 8). Některými vlastnostmi, jako je například sladivost, se podobá



sacharóze, a proto je často používán jako její náhražka. Jedná se o přírodní produkt, který je denně přijímán v poměrně malém množství. Xylitol je přirozenou součástí veškerého rostlinného materiálu. Nejvíce xylitolu se nachází ve švestkách, jahodách a kvěťáku, kde dosahuje množství až 1,0 g na 100 gramů sušiny. Jelikož se volný xylitol v přírodě vyskytuje v malém množství, je vyráběn průmyslově z rostlinných materiálů bohatých na xylany. Xylany jsou v prvním kroku hydrolyzovány na xylózu, jejíž následnou redukcí vzniká čistý krystalický xylitol. Krystalický xylitol byl poprvé připraven v roce 1942, nicméně tato látka byla chemikům známa přinejmenším od roku 1890. Navzdory jeho dlouhé historii v organické chemii, je dnes považován za nově přichodící látku, která má perspektivu v medicíně a ve výživě. Xylitol má stejně jako další acyklické polyoly dvě identické  $\text{CH}_2\text{OH}$  skupiny a neobsahuje žádnou karbonylovou skupinu, díky čemuž je stabilnější a nevstupuje do Maillardových reakcí (Mäkinen 2013).

Xylitol byl používán již během druhé světové války, kdy sloužil jako náhrada sacharózy, jejíž dostupnost byla velice nízká. V tomto období byl získáván především z břízy. Dnes je sladidlem určeným zejména pro diabetiky, neboť má jen minimální efekt na hladinu krevního cukru. Pro jeho antikariogenní účinky (zabraňující rozvoji zubního kazu) se přidává do žvýkaček, ale i bonbonů. (Khan & Hooser 2012).

V Evropě byl xylitol schválen jako potravinové aditivum s označením E 967 (Tiefenbacher 2017).



Obrázek 8 Xylitol

### 3.6 Biochemické testy

Biochemické testy slouží k testování biochemického potenciálu mikroorganismů za účelem jejich identifikace a charakterizace. Principem těchto testů je rozdílná schopnost bakterií metabolizovat různé substráty. Tato schopnost se odvíjí od enzymové výbavy daného mikroorganismu a může sloužit jako charakteristický nebo doprovodný znak pro identifikaci (Ochei & Kolhatkar 2000).

Jedním ze základních typů biochemických testů jsou testy využívající substráty jako zdroje uhlíku. Principem těchto testů je použití média bez zdroje uhlíku, ve kterém bakterie

nejsou schopny růstu, a jeho doplnění o jeden samostatný substrát, který má být testován. Tento substrát pak představuje jediný zdroj uhlíku, tedy jediný zdroj energie. V případě, že je daný substrát metabolizován, jeho degradace se projeví barevnou změnou indikátoru. Nárůst kultury je také doprovázen zvýšením optické denzity, tedy tvorbou zákalu (Ford 2019)

Test využití substrátu jako zdroje uhlíku je podstatou experimentu diplomové práce. K tomuto testu byla využita metoda Analytical profile index (API) od společnosti bioMérieux.

### **3.6.1 API identifikační systém**

Analytical profile index (API) testy umožňují stanovení několika biochemických reakcí současně (Delost 2020). API testy byly vyvinuty pro identifikaci gramnegativních i grampozitivních bakterií a kvasinek. Obvykle jsou ve formě miniaturizovaných kitů, které obsahují 20 až 50 biochemických testů. Při utilizaci substrátů testovaným mikroorganismem nejčastěji dochází k produkci kyselin. Produkované kyseliny vyvolají snížení pH média, které je detekováno barevnou změnou indikátoru, obsaženého v médiu. Získané výsledky testu pak slouží k identifikaci nebo k dotváření biochemického profilu testovaného mikroorganismu (Ford 2019).

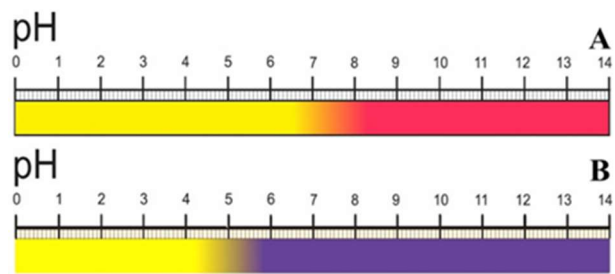
### **3.6.2 Acidobazické indikátory**

Acidobazické indikátory jsou slabé kyseliny nebo zásady, které informují o změně pH prostředí, a to na základě barevné změny. Barevná změna je pak dána dvěma tautomerními formami indikátoru, z nichž jedna je disociovaná a druhá nedisociovaná. Obě formy se liší zbarvením a hodnotami pH při kterých se uplatňují. Disociovaná forma dominuje v kyselějším pH a nedisociovaná při zásaditém pH (Kotyk & Slavík 2020).

V této práci byly jako acidobazické indikátory použity fenolová červeň a bromkresolová violet.

Fenolová červeň a bromkresolová violet patří do skupiny sulfonftaleinových indikátorů. Tento typ indikátorů je stále více používán, a to díky jejich výrazné barevné změně a intenzitě. Fenolová červeň, chemicky fenolsulfonftalein, je acidobazický indikátor, u kterého dochází k barevné změně mezi hodnotami pH 6,4-8,2. Čím vyšší je pH, tím je barva červenější (viz Obrázek 9). Naopak směrem k nižším hodnotám pH je patrné žloutnutí. Jedná se o tmavě červený až hnědý krystalický prášek, dobře rozpustný v alkoholu, ale málo rozpustný ve vodě. Bromkresolová violet, tedy 5,5-dibrom-o-kresolsulfonftalein, je indikátor, jehož barevná změna mezi fialovou a žlutou je patrná v rozmezí hodnot pH 5,2-6,8. Bromkresolová violet se vyskytuje ve formě oranžovo-žlutého nebo cihlového prášku, který je dobře rozpustný

v alkoholu a v ředěných roztocích alkalických hydroxidů, ale špatně rozpustný ve vodě (Bishop 2013).



Obrázek 9 Rozsah pH acidobazických indikátorů, A: fenolová červeň, B: bromkresolová violet

## 4 Materiál a metody

V experimentální části byla testována schopnost bakterií využít syntetická sladidla a cukerné alkoholy, v tekutém API médiu v *in vitro* podmínkách. Při výzkumu byla použita sladidla, která jsou běžnou součástí potravin, kde slouží jako náhražka sacharózy. Jako experimentální organismy byly vybrány bakterie, které jsou přirozenou součástí mikrobioty trávicího traktu a ústní dutiny člověka. Abychom zjistili, zda se jedná o druhově či kmenově specifickou vlastnost, bylo u některých druhů testováno více kmenů.

### 4.1 Substráty

V experimentální části bylo testováno 8 substrátů: aspartam, acesulfam K, sukralóza, sacharin, izomalt, sorbitol, xylitol a erythritol (viz Obrázek 10). Všechny použité substráty byly dodány v sypké formě, o 100% chemické čistotě, jež byla uvedena výrobcem na obalu.



Obrázek 10 Použité substráty

### 4.2 Seznam testovaných kmenů

Experimentální organismy byly rozděleny na základě taxonomické příslušnosti do kmenů Firmicutes (Tabulka 1), Bacteroidetes (Tabulka 2), Proteobacteria (Tabulka 3) a Actinobacteria (Tabulka 4).

Tabulka 1 Seznam bakterií kmene Firmicutes

| Firmicutes   |                           |
|--|---------------------------|
| Bakterie   | Původ                     |
| <i>Clostridium butyricum</i><br>DSMZ 10702                           | sbírkový kmen             |
| <i>Clostridium difficile</i><br>CCM 3593                             | sbírkový kmen             |
| <i>Clostridium perfringens</i><br>DSMZ 11778                         | sbírkový kmen             |
| <i>Clostridium ramosum</i><br>DSMZ 1402                              | sbírkový kmen             |
| <i>Enterococcus faecium</i><br>CCM 6226                              | sbírkový kmen             |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i><br>DSMZ 20079                       | sbírkový kmen             |
| <i>Lactobacillus brevis</i><br>CCM 3805                              | sbírkový kmen             |
| <i>Lactobacillus casei</i><br>DSMZ 20011                             | sbírkový kmen             |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp.<br><i>bulgaricus</i> Milcom 40 | sbírka společnosti Milcom |
| <i>Lactobacillus Johnsonii</i><br>DSMZ 10533                         | sbírkový kmen             |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp.<br><i>paracasei</i>              | sbírkový kmen             |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i><br>Milcom 598                         | sbírka společnosti Milcom |
| <i>Streptococcus mutans</i><br>CCM 7409                              | sbírkový kmen             |
| <i>Streptococcus sanguinis</i><br>CCM 4047                           | sbírkový kmen             |
| <i>Streptococcus thermophilus</i><br>Milcom 55                       | sbírka společnosti Milcom |

ATCC- Americká sbírka typových kultur

CCM- Česká sbírka mikroorganismů

DSMZ- Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury

Tabulka 2 Seznam bakterií kmene Bacteroidetes

| Bacteroidetes                                     |               |
|---|---------------|
| Bakterie  | Původ         |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i><br>ATCC 29741 | sbírkový kmen |
| <i>Bacteroides fragilis</i><br>ATCC 25285         | sbírkový kmen |

ATCC- Americká sbírka typových kultur

Tabulka 3 Seznam bakterií kmene Proteobacteria

| Proteobacteria   |   |
|--|---|
| Bakterie   | Původ   |
| <i>Escherichia coli</i><br>CCM 2024                          | sbírkový kmen   |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922                        | sbírkový kmen   |
| <i>Escherichia coli</i> D                                    | izolát z trávicího traktu dospělého člověka             |
| <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917                          | probiotický preparát                                    |
| <i>Escherichia coli</i> O45                                  | sbírka mikroorganismů<br>Mikrobiologického ústavu AV ČR |
| <i>Klebsiella aerogenes</i><br>CCM 7797                      | sbírkový kmen   |
| <i>Salmonella enterica</i> sérovar<br>Enteritidis ATCC 13076 | sbírkový kmen   |
| <i>Salmonella enterica</i> sérovar<br>Typhimurium LT2        | sbírka mikroorganismů<br>Mikrobiologického ústavu AV ČR |
| <i>Salmonella</i> sp. M                                      | izolát z mletého masa                                   |

ATCC- Americká sbírka typových kultur

CCM- Česká sbírka mikroorganismů

Tabulka 4 Seznam bakterií kmene Actinobacteria

| Actinobacteria  |               |
|---|---------------|
| Bakterie  | Původ         |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i><br>DSMZ 20083         | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i><br>DSMZ 20082              | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i><br>DSMZ 20215              | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i><br>DSMZ 20239              | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium breve</i><br>ATCC 15700                | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium longum</i> ssp.<br>infantis DSMZ 20088 | sbírkový kmen |

ATCC- Americká sbírka typových kultur

DSMZ- Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury

### 4.3 Oživení lyofilizovaných kultur

Oživovány byly kmeny *S. mutans* a *S. sanguinis*. Vialka s lyofilizovanou kulturou (viz Obrázek 11) byla nahřata nad plamenem kahanu a následně zchlazena sterilním fyziologickým roztokem, předem připraveným v injekční stříkačce. Vlivem změny teplot došlo k rozbití skla

vialky. Sterilní pinzetou byla odstraněna krycí vata, pelet byl rozmíchán v 1 ml příslušného média (dle pokynů sbírky) pomocí sterilní stříkačky a 0,4 ml bylo převedeno do penicilinky s 9 ml stejného kultivačního média.



**Obrázek 11 Lyofilizovaná kultura**

Kapka kultury byla nanesena také na předem připravené agarové plotny a rozetřena sterilní mikrobiologickou kličkou. Petriho misky byly kultivovány dnem vzhůru, aby bylo zabráněno kondenzaci vody. Kultivace probíhala v anaerobních podmínkách při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

#### **4.4 Příprava kultur pro experiment**

Pro experiment byly použity čerstvě narostlé kultury, kultivované ve Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid) obohaceném o sojový pepton (5 g/l), cystein (0,5 g/l) a Tween 80 (1 ml/l). Médium bylo připravené metodou podle Hungate (1969) a sterilováno v autoklávu při 121 °C 15 min. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Po uplynutí doby kultivace byla mikroskopicky (Nikon Instruments Europe B. V) ověřena čistota (viz Obrázek 12).



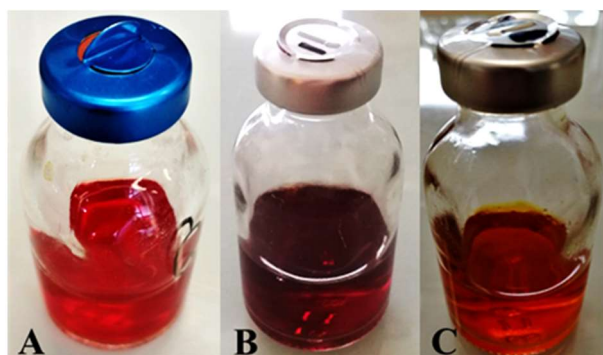
**Obrázek 12 Ověření čistoty kultur**

Následně bylo 5 ml kultury odebráno sterilní stříkačkou a převedeno do centrifugační zkumavky Eppendorf. Kultury byly odstředěny při 12 000 otáčkách po dobu 2 minut. Ze zkumavek byl poté slit supernatant a pelet byl resuspendován v 5 ml příslušného API média bez substrátu pomocí vortexu. Takto připravené suspenze byly použity k inokulaci experimentu.

## 4.5 Příprava substrátů a médií

Pro kultivaci bakterií byla použita tekutá API média (viz Obrázek 13), jejichž složení se lišilo v závislosti na druhu. Média byla připravena dle receptu, který uvádí výrobce komerčních API médií, bioMérieux. Složení jednotlivých médií a seznam bakterií, pro které byla použita, jsou uvedeny v Tabulce 5.

Médium API 50 CHL a API 20 A byly připraveny anaerobně. V médiu API 50 CHL byl indikátor bromkresolová violeť v případě bakterií *B. bifidum* DSMZ 20215, *B. bifidum* DSMZ 20239, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei* a *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* nahrazen fenolovou červení, která reaguje barevnou změnou při vyšším pH.



Obrázek 13 Média A - API 50 CHB/E, B - API 50 CHL, C - API 20 A

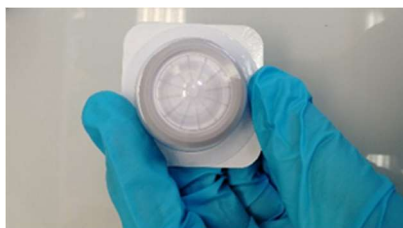
Pro přípravu API médií byly všechny složky převedeny do destilované vody a ponechány cca 10 – 20 minut povařit, aby došlo k jejich úplnému rozpuštění. Následně byla ověřena hodnota pH pomocí pH papírků. V případě potřeby bylo pH upraveno přidávkem 1M roztoku NaOH na požadovanou hodnotu. Všechny substráty byly v médiu obsaženy v koncentraci 1,5 g/l a vyjma aspartamu, přidány do média společně s ostatními složkami.

Po mírném vychladnutí byla média dávkována po 9 ml do vialek pomocí automatické pipety. Do části vialek bylo dávkováno samostatné API médium bez substrátu, pro pozdější aplikaci roztoku aspartamu, přípravu pozitivní a negativní kontroly a pro přípravu bakteriální suspenze. Vialky určené pro kultivaci anaerobních mikroorganismů byly umístěny na 10 minut do vodní lázně o teplotě blízké se bodu varu a následně syceny/probublány oxidem uhličitým. Všechny vialky pak byly uzavřeny pryžovou zátkou a pertlovacím víčkem, které mělo pro každý substrát jinou barvu či bylo vybaveno rozlišovacím symbolem, a sterilovány v autoklávu 15 min při 121 °C.

Pro přípravu vialek s aspartamem byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1,5g/l. X gramů aspartamu bylo smícháno v x ml destilované vody a homogenizováno v ultrazvukové



lázni. Takto připravený zásobní roztok byl poté sterilován prostřednictvím membránového filtru (Roth, PES, sterile) (viz Obrázek 14), o velikosti pórů 0,22 mikrometru a dávkován do vialek s médiem bez substrátu v množství 0,1 ml pro dosažení požadované koncentrace aspartamu 1,5 g/l média.



**Obrázek 14 Membránový filtr**

Pro přípravu pozitivní kontroly byl připraven zásobní roztok glukózy a to totožným způsobem, který byl použit při přípravě zásobního roztoku aspartamu. Připravený roztok byl aplikován také v množství 0,1 ml do vialek se samostatným médiem. Jako negativní kontrola byly použity zbylé vialky s médiem bez substrátu.

Vialky byly v následujícím kroku inokulovány 0,3 ml připravené bakteriální suspenze a kultivovány při teplotě 37 °C 48 hodin.

Veškeré experimenty byly uskutečněny ve 3 opakováních a hodnoceny po 24 a 48 hodinách kultivace. V případě zjištění nárůstu kultur, byla znovu mikroskopicky ověřena morfologie buněk, aby bylo vyloučeno pomnožení, tedy případná kontaminace. Pro kontrolu bylo také u vybraných kultur změřeno výsledné pH supernatantu pomocí pH papírků.

Tabulka 5 Složení API médií

| Médium       | Složení                                     | Rody  |
|--------------|---|---|
| API 50 CHB/E | Síran amonný 2 g                            | <i>Escherichia</i><br><i>Enterococcus</i><br><i>Klebsiella</i><br><i>Salmonella</i><br><i>Streptococcus</i> |
|              | Kvasničný extrakt 0,5 g                     |   |
|              | Trypton 1 g                                 |   |
|              | Hydrogen fosforečnan disodný 3,22 g         |   |
|              | Dihydrogen fosforečnan draselný 0,12 g      |   |
|              | *Trace elements 10 ml                       |   |
|              | Fenolová červeň 0,17 g                      |   |
|              | Destilovaná voda 1000 ml                    |   |
|              | pH 7,4-7,8                                  |   |
| API 50 CH/L  | Polypepton 10 g                             | <i>Bacteroides</i><br><i>Bifidobacterium</i><br><i>Lactobacillus</i>  |
|              | Kvasničný extrakt 5 g                       |   |
|              | Tween 80 1 ml                               |   |
|              | Hydrogenfosforečnan draselný 2 g            |   |
|              | Octan sodný 5 g                             |   |
|              | Citronan amonný 2 g                         |   |
|              | Síran hořečnatý 0,20 g                      |   |
|              | Síran manganatý 0,05 g                      |   |
|              | Bromkresolová violet/Fenolová červeň 0,17 g |   |
|              | Destilovaná voda 1000 ml                    |   |
|              | pH 6,7-7,1                                  |   |
| API 20 A     | Trypticase 5 g                              | <i>Clostridium</i>  |
|              | Kvasničný extrakt 5 g                       |   |
|              | Chlorid sodný 2,5 g                         |   |
|              | L-tryptofan 0,2 g                           |   |
|              | L-cystein 0,4 g                             |   |
|              | Hemin 0,005 g                               |   |
|              | Vitamin K1 0,01 g                           |   |
|              | Sulfid sodný 0,1 g                          |   |
|              | Fenolová červeň 0,17 g                      |   |
|              | Destilovaná voda 1000 ml                    |   |
|              | pH 6,9-7,3                                  |   |

\*Složky trace elements solution uvedené na 1 l:

|  |
|--|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 2860 mg                       |
| MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O 1810 mg               |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 222 mg                |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 390 mg |
| CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O 79 mg                 |

## 5 Výsledky

Vyhodnocení experimentu bylo prováděno vizuálně. Podstatou bylo hodnocení barevné změny indikátoru a optické denzity (viz Obrázek 15), které vypovídají o schopnosti růstu konkrétního bakteriálního kmene v přítomnosti testovaného substrátu a jeho využití jako zdroje energie. Intenzita barevné změny indikátoru také vypovídá o pH výsledných metabolitů.



Obrázek 15 Změna barvy média (A: negativní kontrola, B: kultura+substrát, C: pozitivní kontrola

K hodnocení změny denzity média byla použita McFarlandova stupnice (bioMérieux). Každému stupni McFarlandovy stupnice pak odpovídá určitý počet buněk, tedy kolonii tvořících jednotek (KTJ). Následující Tabulka 6 udává průměrný počet buněk v jednotlivých referenčních zkumavkách.

Tabulka 6 McFarlandova stupnice (Sutton 2011)

| Stupeň zákalu | KTJ ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) |
|---------------|---------------------------------|
| 0,5           | <300                            |
| 1             | 300                             |
| 2             | 600                             |
| 3             | 900                             |
| 4             | 1200                            |
| 5             | 1500                            |

Zákal 0,5 až 2 byl považován za slabý nárůst, zákal 3 za střední nárůst a zákal 4 a 5 představoval intenzivní nárůst bakterií. Při vyhodnocení byl pouze intenzivní nárůst považován za potvrzení skutečného využití daných substrátů k růstu.

### 5.1 Vyhodnocení výsledků

Využití substrátů jednotlivými bakteriemi kmene Firmicutes a Bacteroidetes po 24 a 48 hodinách kultivace zobrazuje Tabulka 7. Z výsledků je patrné, že ze všech testovaných zástupců kmene Firmicutes dosáhly nejrychlejšího růstu bakterie *Cl. butyricum*, *Cl. perfringens*, *E. faecium* a také někteří zástupci rodu *Lactobacillus*, konkrétně *L. brevis*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. paracasei* a *L. rhamnosus*. Uvedené bakterie dokázaly využít všechny testované substráty,

neboť ve všech případech došlo ke vzniku intenzivního zákalu již po 24 hodinách kultivace. U bakterií *S. mutans*, *S. sanguinis* a *Cl. difficile* byl zjištěn rychlý, intenzivní růst pouze v přítomnosti sorbitolu.

Mezi zástupci kmene Bacteroidetes, tedy *B. thetaiotaomicron* a *B. fragilis*, nebyly zjištěny rozdíly ve schopnosti využívat testované substráty k růstu. U obou druhů došlo k intenzivnímu růstu již po 24 hodinách a to v přítomnosti všech substrátů.

Využití substrátů jednotlivými bakteriemi kmene Proteobacteria a Actinobacteria po 24 a 48 hodinách kultivace zobrazuje Tabulka 8. U testovaných bakterií kmene Proteobacteria se nejvíce projevila selektivita testovaných substrátů, neboť byl intenzivní růst zjištěn pouze u některých bakterií a to pouze v přítomnosti některých substrátů. Zjištěným společným rysem všech testovaných bakterií byl rychlý, intenzivní růst v přítomnosti sorbitolu, který se projevil již po 24 hodinách kultivace. Sorbitol tak výrazně podporoval růst patogenních kmenů *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. sp M*, také ale probiotického druhu *E. coli* Nissle. Růst *E. coli* D, *E. coli* Nissle a *K. aerogenes* byl výrazně podporován také izomaltem a u bakterie *E. coli* CCM 2024 došlo k intenzivnímu růstu i v přítomnosti acesulfamu, aspartamu a xylitolu. Aspartam a acesulfam dokázala využít k růstu také *E. coli* O45. Z výsledků je také možné vidět rozdíly mezi jednotlivými kmeny druhu *E. coli* a také mezi sérotypy bakterie *S. Enterica* ve schopnosti využívat dané substráty, což dokládá kmenovou specifitu.

U zástupců kmene Actinobacteria bylo zjištěno, že v přítomnosti všech testovaných substrátů, dosáhly nejrychlejšího růstu pouze bakterie *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215 a *B. longum* ssp. *infantis* DSMZ 20088. U obou bakterií došlo ke vzniku intenzivního nárůstu již po 24 hodinách kultivace. U ostatních bakterií byl růst významně podporován pouze některými substráty. Příkladem je bakterie *B. bifidum* DSMZ 20239, jejíž růst byl výrazně podporován pouze aspartamem a izomaltem a bakterie *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, která dosáhla rychlého nárůstu pouze v médiu s obsahem sorbitolu a xylitolu. U zbylých testovaných bakterií kmene Actinobacteria byl růst výrazně pomalejší. U bakterie *B. bifidum* bylo otestováno více kmenů tohoto druhu a bylo zjištěno, že se jednotlivé kmeny výrazně liší ve schopnosti využít dané substráty k růstu. Tyto výsledky naznačují, že se stejně jako u *E. coli* a *Salmonella* sp. i u *B. bifidum* jedná o kmenově specifickou vlastnost.

Taktéž bylo zjištěno, že v porovnání s pozitivní kontrolou, došlo u většiny bakterií při vzniku intenzivního zákalu v přítomnosti testovaných substrátů k viditelně nižšímu poklesu pH. Výrazný rozdíl byl patrný především u bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. To naznačuje jisté rozdíly v produkci primárních metabolitů.

Ze všech testovaných substrátů byl nejvíce využit k růstu sorbitol, v jehož přítomnosti došlo k rychlému vzniku intenzivního zákalu u 25 z celkových 32 testovaných bakterií. Naopak nejmenší využití ze skupiny cukerných alkoholů je patrné u erythritolu. Ze skupiny syntetických sladidel byl růst bakterií nejvíce podporován aspartamem. Ze všech testovaných syntetických sladidel také nejvíce podporoval růst probiotických bakterií. Nejméně pak byla metabolizována sukralóza a sacharin. Z celkového porovnání utilizace syntetických sladidel a cukerných alkoholů vyplývá, že cukerné alkoholy byly metabolizovány větším počtem bakterií.

Tabulka 7 Výsledky kultivace bakterií kmene Firmicutes a Bacteroidetes

| Firmicutes   |           |    |          |    |            |    |         |    |          |    |          |    |           |    |         |    |
|--|-----------|----|----------|----|------------|----|---------|----|----------|----|----------|----|-----------|----|---------|----|
| Bakterie   | Substrát  |    |          |    |            |    |         |    |          |    |          |    |           |    |         |    |
|  | Acesulfam |    | Aspartam |    | Erythritol |    | Izomalt |    | Sacharin |    | Sorbitol |    | Sukralóza |    | Xylitol |    |
| Kultivace (h)  | 24        | 48 | 24       | 48 | 24         | 48 | 24      | 48 | 24       | 48 | 24       | 48 | 24        | 48 | 24      | 48 |
| <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702              | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Clostridium difficile</i> CCM 3593                | F3        | F3 | F1       | F3 | F2         | F5 | F1      | F5 | F2       | F5 | F5       | F5 | F1        | F1 | F2      | F5 |
| <i>Clostridium perfringens</i> DSMZ 11778            | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Clostridium ramosum</i> DSMZ 1402                 | F1        | F1 | F3       | F3 | F2         | F2 | F1      | F1 | F1       | F1 | F2       | F2 | F1        | F1 | F2      | F3 |
| <i>Enterococcus faecium</i> CCM 6226                 | F4        | F5 | F4       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F4        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSMZ 20079          | F3        | F3 | F3       | F3 | F3         | F4 | F3      | F3 | F3       | F3 | F3       | F4 | F3        | F3 | F3      | F3 |
| <i>Lactobacillus brevis</i> CCM 3805                 | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Lactobacillus casei</i> DSMZ 20011                | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Milcom 40            | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> DSMZ 10533            | F3        | F3 | F2       | F3 | F3         | F3 | F1      | F5 | F1       | F2 | F3       | F3 | F2        | F2 | F3      | F3 |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Milcom 598            | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Streptococcus mutans</i> CCM 7409                 | -         | F4 | F2       | F4 | -          | F4 | F2      | F4 | F2       | F4 | F5       | F5 | F3        | F4 | F2      | F4 |
| <i>Streptococcus sanguinis</i> CCM 4047              | -         | F4 | F2       | F4 | F2         | F4 | F2      | F2 | F2       | F3 | F5       | F5 | F3        | F4 | -       | F3 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> Milcom 55          | F1        | F2 | F1       | F2 | F2         | F3 | F1      | F3 | F1       | F2 | F2       | F3 | F1        | F2 | F2      | F3 |

| Bacteroidetes                             |           |    |          |    |            |    |         |    |          |    |          |    |           |    |         |    |
|---|-----------|----|----------|----|------------|----|---------|----|----------|----|----------|----|-----------|----|---------|----|
| Bakterie                                  | Substrát  |    |          |    |            |    |         |    |          |    |          |    |           |    |         |    |
|   | Acesulfam |    | Aspartam |    | Erythritol |    | Izomalt |    | Sacharin |    | Sorbitol |    | Sukralóza |    | Xylitol |    |
| Kultivace (h)                             | 24        | 48 | 24       | 48 | 24         | 48 | 24      | 48 | 24       | 48 | 24       | 48 | 24        | 48 | 24      | 48 |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 29741 | F4        | F5 | F4       | F5 | F5         | F5 | F4      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F4        | F5 | F4      | F5 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285    | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |

|         |       |              |       |                   |
|---------|-------|--------------|-------|-------------------|
| Legenda | -     | žádný nárůst | F3    | střední nárůst    |
|         | F1-F2 | slabý nárůst | F4-F5 | intenzivní nárůst |

Tabulka 8 Výsledky kultivace bakterií kmene Proteobacteria a Actinobacteria

| Proteobacteria                           |           |    |          |    |            |    |         |    |          |    |          |    |           |    |         |    |
|--|-----------|----|----------|----|------------|----|---------|----|----------|----|----------|----|-----------|----|---------|----|
| Bakterie                                 | Substrát  |    |          |    |            |    |         |    |          |    |          |    |           |    |         |    |
|  | Acesulfam |    | Aspartam |    | Erythritol |    | Izomalt |    | Sacharin |    | Sorbitol |    | Sukralóza |    | Xylitol |    |
| Kultivace (h)                            | 24        | 48 | 24       | 48 | 24         | 48 | 24      | 48 | 24       | 48 | 24       | 48 | 24        | 48 | 24      | 48 |
| <i>Escherichia coli</i> CCM 2024         | F5        | F5 | F5       | F5 | F3         | F5 | F3      | F3 | F2       | F3 | F5       | F5 | F3        | F3 | F4      | F5 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       | -         | F4 | -        | F3 | -          | F3 | F3      | F4 | F3       | F3 | F5       | F5 | -         | F3 | F1      | F2 |
| <i>Escherichia coli</i> D                | -         | F5 | F2       | F4 | -          | F3 | F4      | F5 | F3       | F4 | F5       | F5 | F3        | F5 | F2      | F4 |
| <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917      | -         | F4 | F2       | F4 | -          | F4 | F5      | F5 | F2       | F3 | F5       | F5 | -         | F5 | F2      | F4 |
| <i>Escherichia coli</i> O45              | F5        | F5 | F5       | F5 | F3         | F5 | F3      | F3 | F3       | F3 | F5       | F5 | F3        | F3 | F3      | F4 |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> CCM 7797     | -         | F4 | F2       | F4 | -          | F5 | F5      | F5 | F2       | F3 | F5       | F5 | F2        | F5 | F2      | F5 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 | -         | F3 | -        | F3 | -          | F2 | F2      | F5 | F2       | F3 | F5       | F5 | -         | F3 | -       | F2 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2        | F3        | F4 | F3       | F5 | F3         | F3 | F2      | F3 | F2       | F3 | F5       | F5 | F2        | F2 | F2      | F2 |
| <i>Salmonella</i> sp. M                  | -         | F3 | F1       | F2 | -          | F3 | F2      | F5 | F3       | F4 | F5       | F5 | F2        | F4 | -       | F2 |

| Actinobacteria  |           |    |          |    |            |    |         |    |          |    |          |    |           |    |         |    |
|---|-----------|----|----------|----|------------|----|---------|----|----------|----|----------|----|-----------|----|---------|----|
| Bakterie  | Substrát  |    |          |    |            |    |         |    |          |    |          |    |           |    |         |    |
|   | Acesulfam |    | Aspartam |    | Erythritol |    | Izomalt |    | Sacharin |    | Sorbitol |    | Sukralóza |    | Xylitol |    |
| Kultivace (h)   | 24        | 48 | 24       | 48 | 24         | 48 | 24      | 48 | 24       | 48 | 24       | 48 | 24        | 48 | 24      | 48 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083                 | F2        | F2 | F3       | F5 | F1         | F3 | F2      | F2 | F3       | F4 | F3       | F5 | F1        | F5 | F2      | F3 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> DSMZ 20082                     | F1        | F5 | F1       | F5 | F2         | F2 | F1      | F5 | F1       | F4 | F3       | F5 | F1        | F5 | F2      | F5 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> DSMZ 20215                     | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> DSMZ 20239                     | F1        | F1 | F5       | F5 | F1         | F1 | F4      | F5 | F3       | F4 | F1       | F1 | F1        | F1 | F2      | F3 |
| <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700                       | F1        | F5 | F1       | F5 | F2         | F2 | F3      | F5 | F1       | F4 | F5       | F5 | F2        | F4 | F4      | F4 |
| <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i> DSMZ 20088 | F5        | F5 | F5       | F5 | F5         | F5 | F5      | F5 | F5       | F5 | F5       | F5 | F5        | F5 | F5      | F5 |

|         |       |              |       |                   |
|---------|-------|--------------|-------|-------------------|
| Legenda | -     | žádný nárůst | F3    | střední nárůst    |
|         | F1-F2 | slabý nárůst | F4-F5 | intenzivní nárůst |

## 6 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo testování schopnosti bakterií, které jsou běžnou součástí mikrobiomu trávicího traktu a dutiny ústní, využívat vybraná syntetická sladidla a cukerné alkoholy jako zdroj energie. Ve výzkumu bylo otestováno celkem 32 bakterií a 8 různých sladidel, které v jednotlivých médiích sloužily jako jediný zdroj uhlíku.

Při vyhodnocení byl pouze intenzivní nárůst považován za potvrzení skutečného využití daných substrátů k růstu. U všech bakterií, u kterých nebyl zjištěn intenzivní nárůst již po 24 hodinách kultivace, bylo předpokládáno, že jejich růst nebude dále významný, neboť dojde k vyčerpání živin bakteriemi, které jsou schopny substráty využít rychleji.

Experimentem bylo zjištěno, že veškerá testovaná syntetická sladidla a cukerné alkoholy výrazně podporovaly růst především bakterií rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* a také bakterie *Enterococcus faecium*. Všechna testovaná syntetická sladidla a také erythritol a xylitol podporovali růst převážně bakterií kmene Firmicutes, Bacteroidetes a Actinobacteria. Pouze izomalt a sorbitol výrazně podporovaly růst, včetně již uvedených kmenů, také bakterií kmene Proteobacteria.

Nárůst probiotických bakterií rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a taktéž druhů *Clostridium butyricum* a *E. coli* Nissle poukazuje na možné prebiotické účinky syntetických sladidel a cukerných alkoholů. Prebiotické účinky sacharinu uvádí například studie prováděná na selatech, ve které byl po zkrmování sacharinu zjištěn zvýšený nárůst bakterií rodu *Lactobacillus* (Daly et al. 2014). Na možné prebiotické účinky sorbitolu zase poukazuje studie Sarmiento-Rubiano et al. (2007), která prokázala nárůst bakterií rodu *Lactobacillus* po podávání sorbitolu myším. Ve studii bylo také zjištěno, že utilizací sorbitolu došlo k nárůstu koncentrace butyrátu. Zvýšená koncentrace butyrátu poukazuje i na možné pomnožení klostridií.

Pomnožení klostridií v přítomnosti sorbitolu je v souladu s výsledky naší práce, neboť byl prokázán výrazný nárůst *Cl. butyricum*, *Cl. perfringens* a *Cl. difficile* v médiu s obsahem tohoto substrátu. Intenzivní nárůst patogenního druhu *Cl. difficile* v přítomnosti sorbitolu poukazuje na možné nebezpečí konzumace tohoto sladidla v průběhu dysbiózy či antibiotické léčby. Samotná antibiotika totiž mohou narušit normální uspořádání střevního mikrobiomu a může docházet k přemnožení této bakterie ve střevech. Přemnožení *Cl. difficile* pak může vést k život ohrožující kolitidě (Mullish & Williams, 2018). Schopnost *Cl. difficile* využívat sorbitol k růstu byla prokázána ve studii Pruss & Sonnenburg (2021). Tyto závěry naznačují, že konzumací sorbitolu může docházet k pomnožení *Cl. difficile* ve střevech.



Kromě bakterií rodu *Clostridium*, sorbitol také výrazně podporoval růst patogenních sérovarů bakterie *S. Enterica*, patogenních kmenů *E. coli* a také bakterie *K. aerogenes*.

Nárůst probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* v dutině ústní je však spojován i s možným kariogenním účinkem těchto bakterií. Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou dokonce, po bakterii *S. mutans*, považováni za bakterie s největším kariogenním efektem. Nejedná se o přímé iniciátory zubních kazů, hrají ale důležitou roli v postupu již existujících zubních kazů (Ahirwar et al. 2019). Pro vznik zubních kazů a jejich další postup je důležitý pokles pH v dutině ústní pod kritickou hodnotu, při které dochází k demineralizaci zubní skloviny nebo dentinu. Za kritickou hodnotu pH při které dochází k demineralizaci zubní skloviny je považováno rozmezí 5,2-5,5. Kritickou hodnotou pH pro demineralizaci dentinu je rozmezí 6-6,9 (Delgado & Olafsson, 2017). K poklesu pH v ústní dutině nejčastěji dochází při konzumaci snadno fermentovatelných sacharidů, jejich rozkladem bakteriemi dochází ke vzniku organických kyselin. Mezi druhy s kariogenním potenciálem je řazen například *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, a *L. rhamnosus* (Ahirwar et al. 2019). Experimentem bylo zjištěno, že testované druhy s kariogenním potenciálem, způsobují pokles pH média a to v přítomnosti veškerých testovaných syntetických sladidel a cukerných alkoholů. Hodnota pH média byla experimentálně změřena u druhu *L. casei* po 24 hodinách kultivace v médiu s obsahem sorbitolu, xylitolu a aspartamu. Naměřené pH odpovídalo u sorbitolu hodnotě 5, u xylitolu hodnotě 6 a u aspartamu hodnotě 5,5. V případě pozitivní kontroly s obsahem glukózy pokleslo pH na hodnotu 5. Tyto výsledky naznačují, že sorbitol má, ve vztahu k zubním kazům, silnější kariogenní účinky, než xylitol a aspartam a jeho účinky na vznik zubních kazů jsou tak srovnatelné s působením běžných cukrů.

Významným zjištěním je také nárůst kariogenního druhu *Streptococcus mutans* v přítomnosti sorbitolu, který byl doprovázen poklesem pH, jenž po změření odpovídalo hodnotě 5. Sorbitol je ve velké míře používán ve žvýkačkách a přípravcích pro ústní hygienu a to díky domnělému nekariogennímu efektu (Burt 2006). Zjištěný nárůst *S. mutans* v přítomnosti sorbitolu a také výrazný pokles pH naznačují, že používání těchto produktů s obsahem sorbitolu může mít opačný efekt a tyto produkty mohou naopak vznik zubních kazů podporovat. Tento závěr je v souladu se studií Burt (2006), která taktéž potvrdila schopnost růstu *S. mutans* v přítomnosti sorbitolu. Studie Haukioja et al. (2008), kromě nárůstu *S. mutans* potvrdila také schopnost rychle okyselit médium z důvodu produkce kyselin. Vzhledem k tomu, že v přítomnosti erythritolu a acesulfamu nedošlo po 24 hodinách ke vzniku zákalu, který by vypovídal o růstu *S. mutans*, je předpokládáno, že kariogenní účinek těchto substrátů bude ze všech testovaných sladidel a cukerných alkoholů nejnižší. Studie de Cock et al. (2016), také

potvrzuje, že erythritol nepodporuje růst *S. mutans* a dokonce uvádí, že je erythritol schopen růst této bakterie inhibovat. Stejně tak O'Donnell & Kearsley (2012) uvádí, že acesulfam K nepodporuje růst *S. mutans*, což je v souladu s naším zjištěním.

Nárůst bakterií v médiu se substráty, byl doprovázen zjištěnou změnou denzity a barvy média. Barva média však dle pH škály indikátorů u většiny bakterií a substrátů odpovídala vyššímu pH, než v případě pozitivní kontroly s obsahem glukózy. Výrazný rozdíl byl patrný především u bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. To vede k domněnce, že rozkladem umělých sladidel a cukerných alkoholů vznikají buď rozdílné metabolity, než při štěpení sacharidů, nebo stejné metabolity v jiném poměru. Tyto domněnky mohou být podnětem pro další výzkum metabolitů, produkovanými bakteriemi při utilizaci syntetických sladidel a cukerných alkoholů.

Získané výsledky naznačují, že syntetická sladidla a cukerné alkoholy mohou podporovat růst jak probiotických, tak i patogenních druhů bakterií a ve vztahu k zubním kazům mohou být považovány za kariogenní substance.

## 7 Závěr

V této práci bylo zjištěno, že bakterie, které jsou běžnou součástí mikrobiomu člověka, jsou schopny syntetická sladidla a cukerné alkoholy využívat k růstu. Všechna syntetická sladidla a cukerné alkoholy výrazně podporovaly růst bakterií rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* a také bakterie *Enterococcus faecium*. U rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Clostridium* však nedošlo k intenzivnímu růstu u všech testovaných druhů. V případě bakterií *B. bifidum*, *E. coli* s *S. enterica* byly zjištěny i rozdíly v rámci jednotlivých kmenů stejného druhu. Výsledky tak potvrzují hypotézu, že syntetická sladidla a cukerné alkoholy selektivně podporují růst pouze některých bakterií. K růstu docházelo jak u patogenních, tak i probiotických bakterií. Taktéž bylo zjištěno, že při utilizaci syntetických sladidel a cukerných alkoholů dochází ve většině případů k mírnějšímu poklesu pH, než v případě utilizace glukózy. Tato zjištění naznačují, že při metabolizaci syntetických sladidel a cukerných alkoholů vznikají zcela jiné metabolity, než v případě utilizace glukózy nebo metabolity stejné, avšak v jiném poměru. Vzhledem ke zjištění, že syntetická sladidla a cukerné alkoholy podporují růst patogenních i probiotických bakterií, nelze říci, zda mají z pohledu uspořádání mikrobiomu pouze prospěšné či pouze negativní účinky. Úloha syntetických sladidel a cukerných alkoholů ve stravě člověka tak zůstává nejasná.

## 8 Literatura

- Ahirwar SS, Gupta M, Snehi SK. 2019. Dental caries and lactobacillus: role and ecology in the oral cavity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **10**:4818-4829.
- Baker-Smith CM, de Ferranti SD, Cochran WJ. 2019. The Use of Nonnutritive Sweeteners in Children. *Pediatrics* **144**:2765-2783.
- Barclay A, Sandall P, Shwide-Slavin C. 2014. The ultimate guide to sugars and sweeteners: Discover the taste, use, nutrition, science, and lore of everything from agave nectar to xylitol. The Experiment, New York.
- Biavati B. 2015. Bifidobacteriaceae. Pages 1-2 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, Hoboken.
- Bishop E. 2013. Indicators: International Series of Monographs in Analytical Chemistry. Elsevier Science, Oxford.
- Bozzi Cionci N, Baffoni L, Gaggia F, Di Gioia D. 2018. Therapeutic Microbiology: The Role of *Bifidobacterium breve* as Food Supplement for the Prevention/Treatment of Paediatric Diseases. *Nutrients* **10**:1723-1750.
- Burt BA. 2006. The use of sorbitol-and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. *The Journal of the American Dental Association*. **137**:190-196.
- Burton JP, Chanyi RM, Schultz M. 2017. Chapter 19-Common Organisms and Probiotics: *Streptococcus thermophilus* (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). Pages 165–169 in Floch MH, Ringel Y, Allan Walker W, editors. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Academic Press, Boston.
- Cartwright P. 2003. *Probiotics for Crohn's & Colitis*. Prentice Publishing, Chippenham.
- Cassir N, Benamar S, La Scola B. 2016. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* **22**:37-45.
- Daly K, Darby AC, Hall N, Nau A, Bravo D, Shirazi-Beechey SP. 2014. Dietary supplementation with lactose or artificial sweetener enhances swine gut *Lactobacillus* population abundance. *British Journal of Nutrition*. **111**:30-35.
- Davin-Regli A. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology* **6**:392-402.

- de Cock P, Mäkinen K, Honkala E, Saag M, Kennepohl E, Eapen A. 2016. Erythritol Is More Effective Than Xylitol and Sorbitol in Managing Oral Health Endpoints. *International Journal of Dentistry* **2016**:1-15.
- Delgado AJ, Olafsson VG. 2017. Acidic oral moisturizers with pH below 6.7 may be harmful to teeth depending on formulation: a short report. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* **9**:81-83.
- Delost MD. 2020. *Introduction to Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences*. Jones & Bartlett Learning, Burlington.
- deMan JM, Finley JW, Hurst WJ, Lee CY. 2018. *Principles of Food Chemistry*. Springer International Publishing, New York.
- Deo PN, Deshmukh R. 2019. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* **23**:122-128.
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. 2006. *The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer, New York.
- Fàbrega A, Vila J. 2013. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews* **26**:308-341.
- Ford M. 2019. *Medical Microbiology*. Oxford University Press, Oxford.
- Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. 2007. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer Science & Business Media, New York.
- Gobbetti M, Minervini F. 2014. LACTOBACILLUS *Lactobacillus casei*. Pages 432-438 in Batt AC, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, Oxford.
- Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. 2018. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes* **9**:308-325.
- Gopal PK. 2011. Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. Pages 91-95 in Fuquay JW, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. Academic Press, San Diego.
- Goran MI, Tappy L, Lê KA. 2014. *Dietary Sugars and Health*. CRC Press, Boca Roca.

- Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, Wilmes P. 2016. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environmental Microbiology* **18**:2103-2116.
- Gultekin F, Oner ME, Savas HB, Dogan B. 2019. Food additives and microbiota. *Northern Clinics of Istanbul* **7**:192-200.
- Hancock V, Vejborg RM, Klemm P. 2010. Functional genomics of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation. *Molecular Genetics and Genomics* **284**:437-454.
- Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. 2018. The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns-An Update. *Frontiers in Microbiology* **9**:1791-1807.
- Hartel PG. 2005. Microbial Processes: Environmental Factors. Pages 448-455 in: Hillel D, editor. *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford.
- Haukioja A, Söderling E, Tenovuo J. 2008. Acid Production from Sugars and Sugar Alcohols by Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria in vitro. *Caries Research* **42**:449-453.
- Hossain Z. 2014. Bacteria: *Streptococcus*. Pages 535-545 in Motarjemi Y, editor. *Encyclopedia of Food Safety*. Academic Press, Waltham.
- Charalampopoulos D, Rastall RA. 2009. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer Science & Business Media, New York.
- Chuah LO, Yap KP, Shamila-Syuhada AK, Thong KL, Ahmad R, Liong MT, Rusul G. 2017. *Floricoccus tropicus* gen. nov., sp. nov. and *Floricoccus penangensis* sp. nov. isolated from fresh flowers of durian tree and hibiscus. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **67**:4979-4985.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* **21**:8787-8803.
- Jones RM. 2017. Chapter 9-The Use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health. Pages 99-108 in: Floch MH, Ringel Y, Allan Walker W. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Academic Press, Boston.
- Kachrimanidou M, Tsintarakis E. 2020. Insights into the Role of Human Gut Microbiota in *Clostridioides difficile* Infection. *Microorganisms* **8**:200-216.

- Kaper J, Nataro J, Mobley H. 2004. Pathogenic Escherichia coli. Nature reviews. Microbiology. **2**:123-140.
- Karel L, Hoch J. 2018. Nemoci střev. Grada Publishing, Praha.
- Khan SN, Hooser SB. 2012. Common Toxicologic Issues in Small Animals. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Saunders, Philadelphia.
- Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in Enterococcus faecium. Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects **88**:269-290.
- Kotyck A, Slavík J. 2020. Intracellular pH and its Measurement. CRC Press, Boca Raton.
- Kuslovic A, Vanilssen A, Nilstrem R. 2020. Lékařská mikrobiologie I: Patogeny a lidský mikrobiom. Cambridge Stanford Books, Cambridge.
- Lawson PA. 2018. Chapter 1-The Phylum Actinobacteria. Pages 1-8 in Mattarelli P, Biavati B, Holzapfel WH, Wood BJB, editors. The Bifidobacteria and Related Organisms. Academic Press, London.
- Li N, Ma WT, Pang M, Fan QL, Hua JL. 2019. The Commensal Microbiota and Viral Infection: A Comprehensive Review. Frontiers in Immunology **10**:1551-1567.
- Liauchonak I, Qorri B, Dawoud F, Riat Y, Szewczuk MR. 2019. Non-Nutritive Sweeteners and Their Implications on the Development of Metabolic Syndrome. Nutrients **2019**:644-663.
- Littman DR, Pamer EG. 2011. Role of the Commensal Microbiota in Normal and Pathogenic Host Immune Responses. Cell Host & Microbe **10**:311-323.
- Lonvaud-Funel A. 2014. Leuconostocaceae Family. Pages 455-465 in Batt CA, Tortorello ML, editors. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). Academic Press, Oxford.
- Mäkinen K. 2013. Biochemical Principles of the Use of Xylitol in Medicine and Nutrition with Special Consideration of Dental Aspects. Springer Basel, Basel.
- Markakiou S, Gaspar P, Johansen E, Zeidan AA, Neves AR. 2020. Harnessing the metabolic potential of Streptococcus thermophilus for new biotechnological applications. Current Opinion in Biotechnology **61**:142-152.
- McGuire M, Beerman KA. 2012. Nutritional Sciences: From Fundamentals to Food. Cengage Learning, Wadsworth.

McNutt K, Sentko A. 2003. ISOMALT. Pages 3401-3408 in Caballero B, editor. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). Academic Press, Oxford.

Mitchell H. 2008. Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. Wiley, Oxford.

Moreno J, Peinado R. 2012. Enological Chemistry. Academic Press, San Diego.

Mullish BH, Williams HR. 2018. Clostridium difficile infection and antibiotic-associated diarrhoea. Clinical Medicine **18**:237-241.

Myers RL. 2007. The 100 Most Important Chemical Compounds: A Reference Guide. Greenwood Press, Westport.

Newton DE. 2009. Food Chemistry. Facts On File. Infobase Publishing, New York.

O'Brien-Nabors L. 2016. Alternative Sweeteners. CRC Press, Boca Roca.

Ochei J, Kolhatkar A. 2000. Medical Laboratory Science : Theory And Practice. McGraw Hill Education, New Delhi.

O'Donnell K, Kearsley M. 2012. Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. Wiley, Hoboken.

Okoduwa S. I. R, Ebiloma UG, Baba J, Ajide S. 2013. The Metabolism and Toxicology of Saccharin. Info **1**:14-19.

Oliphant K, Allen-Vercoe E. 2019. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. Microbiome **7**:1-15.

Parian AM, Mullin GE, Langhorst J, Brown AC. 2018. Chapter 50-Inflammatory Bowel Disease. Pages 501-516 in Rakel D, editor. Integrative Medicine (Fourth Edition). Elsevier, Albuquerque.

Parija SC. 2014. Textbook of Microbiology & Immunology - E-book. Elsevier Health Sciences, New Delhi.

Parte A, Krieg NR, Ludwig W, Whitman WB, Hedlund BP, Paster BJ, Staley JT, Ward N, Brown D. 2011. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Springer, New York.



- Parte A, Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer, New York.
- Porter NT, Luis AS, Martens EC. 2018. *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Trends in Microbiology* **26**:966-967.
- Pruss KM, Sonnenburg JL. 2021. *Clostridium difficile* exploits a host metabolite produced during toxin-mediated infection. *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2021.01.14.426744.
- Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews* **38**:996-1047.
- Rock C, Sonnenberg MS. 2014. Human Pathogenic Enterobacteriaceae. Pages 1-6 in Caplan MJ, editor. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, Amsterdam.
- Sarmiento-Rubiano L, Zúñiga Cabrera M, Pérez Martínez G, Yebra M. 2007. Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Research in microbiology* **158**:694-701.
- Sharma A, Amarnath S, Thulasimani M, Ramaswamy S. 2016. Artificial sweeteners as a sugar substitute: Are they really safe? *Indian Journal of Pharmacology* **48**:237-240.
- Simone M, Gozzoli C, Quartieri A, Mazzola G, Di Gioia D, Amaretti A, Raimondi S, Rossi M. 2014. The Probiotic *Bifidobacterium breve* B632 Inhibited the Growth of Enterobacteriaceae within Colicky Infant Microbiota Cultures. *BioMed Research International* **2014**:1-7.
- Singh RK, et al. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine* **15**:73-74.
- Sutton S. 2011. Measurement of cell concentration in suspension by optical density. *Journal of Validation Technology* **17**:46-49.
- Teixeira P. 2014. LACTOBACILLUS *Lactobacillus brevis*. Pages 418-424 in Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, Oxford.
- Tetro, J, Allen-Vercoe E. 2016. *The Human Microbiome Handbook*. Destech Publications, Lancaster.
- Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M, Michel G. 2011. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology* **2**:93-94.

Tiefenbacher KF. 2017. *The Technology of Wafers and Waffles I: Operational Aspects*. Academic Press, San Diego.

Tlaskalová-Hogenová et al. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology* **8**:110-120.

Trujillo ME, Dedysh S, DeVos P, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey FA, Whitman WB. 2015. Bacteroidaceae. Pages 1-2 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, Hoboken.

Tungland B. 2018. *Human Microbiota in Health and Disease*. Academic Press, London.

Uriot O, Denis S, Junjua M, Roussel Y, Dary-Mourot A, Blanquet-Diot S. 2017. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? *Journal of Functional Foods* **37**:74-89.

Varzakas T, Labropoulos A, Anestis S. 2012. *Sweeteners: Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology*. Taylor & Francis, Boca Roca.

Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman W. B. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.

Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. 2017. *The Human Microbiota in Health and Disease*. *Engineering* **3**:71-82.

Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. 2017. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*. Elsevier, Amsterdam.

Wexler HM. 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews* **20**:593-621.

Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **70**:2782-2858.