

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Výskyt a význam rodu *Bifidobacterium bifidum* u člověka**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Lucie Kaňová**

**Obor studia: AMD**

**Vedoucí práce: Ing. Věra Bunešová, PhD.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Výskyt a význam rodu *Bifidobacterium bifidum* u člověka" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Věře Bunešové, Ph.D. za její cenné rady, poskytnutí potřebné literatury a čas, který mi věnovala.

# Výskyt a význam rodu *Bifidobacterium bifidum* u člověka

## Souhrn

Pro rovnovážné složení střevní mikrobioty je zapotřebí její správné kvalitativní i kvantitativní osídlení. Pokud dojde k nerovnováze ve střevní mikrobiotě, může nastat zánětlivé onemocnění střev. Kvalitativní a kvantitativní zastoupení mikroorganismů je do jisté míry ovlivnitelné endogenními a exogenními faktory.

Mezi bakterie, které příznivě působí na trávicí trakt člověka, patří rod *Bifidobacterium* sp. Jejich přítomnost je dána zejména věkem. Nejvyšší množství se nachází u kojenců, kteří konzumují mateřské mléko. U těchto dětí převažují druhy, jako je *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum*. *B. bifidum* je druh charakteristický pro člověka a vykazuje specifické substrátové preference. Navíc druhu *B. bifidum* se přisuzují příznivé účinky, jako je působení proti *Helicobacter pylori*. Také chrání před stresem nebo blahodárně působí proti syndromu dráždivého tračníku. Právě pro tyto a jiné účinky je žádoucí podpořit jejich výskyt ve střevní mikrobiotě člověka.

V této diplomové práci je zahrnuto mikrobiologické osídlení trávicího traktu člověka. Zejména je pak věnována pozornost druhu *B. bifidum*. Je zde popsána charakteristika druhu, jeho výskyt, význam a detekce se střevní mikrobiotě.

Prvním cílem práce bylo ověřit, zda z rodu *Bifidobacterium* pouze druh *B. bifidum* má schopnost utilizace mucinu. V posledních letech se rod *Bifidobacterium* rozšířil o nové druhy jak lidského, tak zvířecího původu. Ověřili jsme, že pouze druh *B. bifidum* je schopen využít mucin.

Dalším cílem výzkumu byla identifikace *B. bifidum* ve vzorcích stolice od dvou typů dárců. Jedna skupina dárců zahrnovala lidi stravující se pouze vegetariánskou stravou, druhou skupinou byli lidé s konvenčním stravováním. Druhá skupina lidí nevyřazovala ze svého jídelníčku žádné běžné potraviny a na rozdíl od vegetariánů konzumovali ještě maso a masné výrobky. Vyšší přítomnost celého rodu *Bifidobacterium* ani konkrétního druhu *B. bifidum* nebyla prokázána na základě rozdílnost diet. Rod *Bifidobacterium* byl identifikován u všech dárců, zatímco *B. bifidum* byl přítomen u 40 % sledovaných.

Posledním cílem byla detekce a identifikace bifidobakterií u pacientů trpící Crohnovou chorobou. Charakteristikou tohoto onemocnění je zánětlivé poškození kterékoli části trávicího traktu, přičemž nejčastěji se jedná o střevo. Léčba je prováděna například pomocí enterální

výživy. U těchto pacientů nebyl druh *B. bifidum* identifikován. Také bylo zjištěno, že tato dieta snižuje celkové kvantitativní zastoupení bifidobakterií.

**Klíčová slova:** *B. bifidum*, mucin, kultivace, PCR

# Occurrence and significance of the species *Bifidobacterium bifidum* for humans

## Summary

For balanced intestinal microbiota composition, it is important that both its qualitative and quantitative settlements are right. If the microbiota composition is not balanced an inflammatory bowel disease may occur. Qualitative and quantitative microorganism representation is to some extent influenced by endogenous and exogenous factors.

The genus *Bifidobacterium* belongs to the bacteria that favorably affect the digestive tract. Their presence is mainly given by one's age. They are found in the highest numbers in infants consuming breast milk. Species *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium bifidum* are among those bacteria predominating in these infants. *B. bifidum* is a species that is typical for human and has specific substrate preferences. Some positive effects are also attributed to *B. bifidum*, such as contributing to the body's defense against *Helicobacter pylori*, relieving of stress and beneficially affecting irritable bowel syndrome. Because of these and other effects of *B. bifidum* it is desirable to support their presence in human intestinal microbiota.

This thesis covers the microbiological settlement of the digestive tract with focus on *B. bifidum* species and describes the characteristics of the species, its occurrence, significance and its detection in the intestinal microbiota.

The thesis's first goal has been to verify whether the species *B. bifidum* is the only one of the *Bifidobacterium* genus that can utilise mucin. Even though the *Bifidobacterium* genus has been expanded by new species of both human and animal origin, only *B. bifidum* is able to utilize mucin.

Another goal of this research has been to identify *B. bifidum* in stool samples from 2 types of donors. The first donor group was comprised of people eating only vegetarian food, while the second one consisted of people eating conventionally, not excluding any common food nor meat and meat products. Higher presence of the whole *Bifidobacterium* genus or *B. bifidum* specifically has not been demonstrated based on the diversity of diet. The *Bifidobacterium* genus has been identified in all donors, while *B. bifidum* has been present in 40% of the monitored cases.

The last goal was to detect and identify bifidobacteria in patients suffering from the Crohn's disease. This disease is characterised by inflammation of any part of the digestive tract, most often intestine. For example it can be treated enteral nutrition. In these patients *B.*

*bifidum* has not been identified. It has also been concluded that this diet lowers the total quantitative representation of bifidobacteria.

**Key words:** *B. bifidum*, mucin, cultivation, PCR

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Hypotéza .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Mikroflóra trávicího traktu člověka.....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Osídlení mikroorganismů v trávicím traktu.....	11
3.1.1.1 Dutina ústní.....	11
3.1.1.2 Jícen.....	12
3.1.1.3 Žaludek.....	12
3.1.1.4 Tenké střevo.....	12
3.1.1.5 Tlusté střevo.....	13
3.1.1.6 Konečník.....	13
<b>3.2 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....</b>	<b>13</b>
3.2.1 Charakteristika bifidobakterií .....	14
3.2.1.1 Buněčná stěna bifidobakterií.....	14
3.2.1.2 Metabolismus bifidobakterií .....	14
3.2.1.3 Vztah k teplotě a pH.....	15
<b>3.3 Výskyt a druhové zastoupení bifidobakterií u člověka .....</b>	<b>15</b>
3.3.1 Druh <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	16
3.3.1.1 Enzymatická aktivita <i>B. bifidum</i> .....	17
3.3.2 Substrátová specifita <i>B. bifidum</i> .....	17
3.3.2.1 Mateřské mléko.....	17
3.3.2.2 Oligosacharidy mateřského mléka .....	18
3.3.2.3 Mucin .....	19
<b>3.4 Dietní faktory ovlivňující mikrobiologické osídlení trávicího traktu .....</b>	<b>20</b>
3.4.1 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) .....	21
3.4.2 Vliv stravování na mikrobiologické osídlení střev .....	21
3.4.2.1 Vegetariánství .....	22
3.4.2.2 Veganství.....	22
3.4.2.3 Konvenční stravování.....	23
3.4.3 Vliv obezity na mikrobiotu.....	23
3.4.4 Vliv hladovění na výskyt bifidobakterií a dalších střevních bakterií.....	24
3.4.5 Potenciál <i>B. bifidum</i> v prevenci a léčbě onemocnění TT .....	24
3.4.5.1 Crohnova choroba .....	25



<b>3.5</b>	<b>Detekce bifidobakterií ve vzorcích stolice .....</b>	<b>26</b>
3.5.1	Růstové média pro rod <i>Bifidobacterium</i> .....	27
3.5.2	Identifikace bifidobakterií pomocí detekce enzymu F6PPK .....	28
3.5.3	MALDI TOF .....	28
3.5.4	Genetická analýza bifidobakterií .....	29
3.5.4.1	Izolace DNA z čistých kultur .....	29
3.5.5	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	30
3.5.5.1	Vizualizace PCR .....	31
3.5.6	Sangerova metoda sekvenování DNA .....	33
3.5.7	DGGE .....	34
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Testování schopnosti utilizace mucinu bakteriemi rodu <i>Bifidobacterium</i> ..</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Původ vzorků stolice pro detekci <i>B. bifidum</i> .....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Původ vzorků od zdravých dárců (vegetariánská a konvenční dieta) .....	36
4.2.2	Původ vzorků od jedinců trpících Crohnovou chorobou .....	37
<b>4.3</b>	<b>Izolace bakteriální DNA ze stolice .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4</b>	<b>Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Použitá média pro detekci bifidobakterií ve stolici .....</b>	<b>40</b>
<b>4.6</b>	<b>Postup rozboru stolice .....</b>	<b>41</b>
<b>4.7</b>	<b>Příprava čistých kultur .....</b>	<b>43</b>
<b>4.8</b>	<b>Kontrola selektivity mucinového média .....</b>	<b>43</b>
<b>4.9</b>	<b>Identifikace izolátů pomocí MALDI TOF MS .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>API testování čistých kultur .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Výsledky detekce pomocí rodově a druhově specifické PCR .....</b>	<b>44</b>
5.2.1	Ověřování použitých primerů .....	44
5.2.2	Přítomnost bifidobakterií v závislosti na různém typu diety .....	45
<b>5.3</b>	<b>Počty a identifikace MO u pacientů s Crohnovou chorobou .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>74</b>

# 1 Úvod

Správné složení střevní mikrobioty napomáhá k udržení zdravého stravu jedince. Při její nerovnováze pak může dojít až k zánětlivému onemocnění střev. Kvalitativní zastoupení MO je dáno několika faktory, mezi které patří způsob porodu, geografická oblast, ve které se jedinec nachází, ale i množství a různorodost stravy.

Mezi prospěšné bakterie, které napomáhají k prevenci onemocnění a k bezproblémovému průchodu stravy střevem jsou bifidobakterie. Jejich přítomnost a množství není během života stejné. Nejvyšší množství se nachází u kojenců a malých dětí. U těchto dětí převažují druhy, jako je *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum*. Kojenci, kteří konzumují mateřské mléko, tak dostanou do svého střeva vhodné oligosacharidy, které slouží jako prebiotika a tak selektivně podporují růst *B. bifidum* a *B. longum* subsp. *infantis*. Množství těchto bakterií je při kojení stabilní a dokáže chránit dítě před adhezí patogeních organismů. Během dospívání ubývá četnost bifidobakterií a v trávicím traktu převládají jiné mikroorganismy. Mnoho dospělých tak ve své střevní mikrobiotě nemá *B. bifidum* vůbec nebo jen v malém množství. Naopak zde převládá *B. adolescentis* a *B. longum* subsp. *longum*.

Nicméně druh *B. bifidum* jako jediný druh z rodu *Bifidobacterium* je schopen využívat střevní mucin. Této nepravidelné bakterii se přisuzují příznivé účinky díky jejím vlastnostem a produktům. Dokáže působit proti patogenní bakterii *Helicobacter pylori*, účinně působí na vedlejší účinky stresu a pacientům s Crohnovou chorobou napomáhá ke zlepšení jejich stavu. Právě pro tyto účinky a řadu dalších je ve snaze podpořit jejich výskyt ve střevní mikrobiotě člověka.

## 2 Cíl práce

Prvním cílem práce je ověřit, zda z rodu *Bifidobacterium* pouze druh *B. bifidum* má schopnost utilizace mucinu. Hlavním cílem práce bude detekovat druh *B. bifidum* u různých skupin jedinců podle jejich stravovacích návyků a typu diety. Pomocí molekulárně-genetických testů a selektivních medií určených pro druh *B. bifidum*, bude detekováno kvalitativní a kvantitativní zastoupení tohoto druhu ve vzorcích stolice.

### 2.1 Hypotéza

Druh *B. bifidum* je jediným druhem z rodu *Bifidobacterium* se schopností utilizace mucinu. Předpokládáme, že na výskyt a kvantitativní zastoupení *B. bifidum* ve střevní mikrobiotě bude vliv stáří hostitele, zdravotní stav, kvalita a kvantita diety.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mikroflóra trávicího traktu člověka

Celkové množství mikroorganismů u dospělého jedince je v počtu  $10^{14}$ . Střevní mikrobiota, která se vyskytuje u dospělého člověka, je složena z kmenů *Firmicutes* (79,4 %), *Bacteroides* (16,9 %), *Aktinobacteria* (1 %), *Proteobacterie* (0,1 %) a *Verrucomicrobia* (0,1 %). Většina nalezených mikroorganismů patří k rodům *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Coprabacillus* a *Bifidobacterium* (Tap et al., 2009). Střevní mikrobiota u zdravého jedince je v kvalitativní i kvantitativní rovnováze. Při narušení této rovnováhy dochází k tzv. dysbióze, která může způsobit zánětlivé onemocnění střev (Sokol et al, 2016). Zastoupení jednotlivých mikroorganismů v trávicím traktu nemají všichni lidé stejné. Rozdílnosti mikrobioty v populaci může způsobit geografická oblast, ve které se jedinci nachází, nebo také díky různosti stravy (Lloyd-Price et al., 2016).

Přirozená mikrobiota trávicího traktu se během života jedince mění. Dříve se předpokládalo, že trávicí trakt je během vývoje plodu v těle matky sterilní (Orrhage, 1999), podle novější studie však byla zjištěna přítomnost mikroorganismů v těle dítěte již během jeho vývoje v těle matky. Pravděpodobně se mikroorganismy do těla plodu dostaly přes placentu nebo plodovou vodu (Collado et al., 2016). Složení mikroorganismů nacházejících se v trávicím traktu novorozence je také značně ovlivněno způsobem porodu; a tedy existuje rozdíl v osídlení mikroorganismů mezi dětmi, které byly narozeny císařským řezem, a dětmi, které byly narozeny vaginální (přirozenou) cestou. Novorozenci narození přirozenou cestou jsou kolonizováni zejména od matky její vaginální a střevní mikrobiotou (Grönlund et al., 1999). Oproti tomu děti přivedené na svět císařským řezem nepřicházejí do styku s vaginálními ani fekálními mikroorganismy matky a jsou častěji kolonizovány jinými mikroorganismy. Někdy se může jednat o patogeny, kterým je například *Clostridium difficile*. U těchto dětí byly zjištěny například nižší počty bifidobakterií (Penders et al., 2006). Celkově mají tyto děti značně nižší přirozené mikrobiální osídlení (Biasucci et al. 2010). Mikroorganismy předané novorozenci od matky hrají důležitou roli v odolnosti proti kolonizaci patogenních mikroorganismů tím, že mají značný vliv na rozvoj lidského imunitního systému uvnitř i vně střeva (Smith et al., 2007). Další významná změna během vývoje střevní mikrobioty nastává v počátku života. Nicméně, během prvních dvou let se mikrobiota ve střevech relativně ustálí (Voreades et al., 2014).

Důležitým faktorem pro efektivní vývoj střevní mikrobioty je kojení. Mateřské mléko představuje pro kojence vhodnou výživu. Dokáže podporovat růst bifidobakterií, které modulují imunitní systém (Fanaro et al., 2003 and Solís et al., 2010). To dokazuje studie, kde byly děti krmeny umělou výživou. Tyto děti byly více osídleny *Escherichia coli*, *C. difficile*, *Bacteroides* sp. a laktobacily (Penders et al., 2006).

Během dospívání se některé rody mikroorganismů zredukuje. Například tomu tak je u rodu *Bifidobacterium*, který je typický a dominující zejména u kojenců a malých dětí. V průběhu dospívání narůstá množství grampozitivních aerobů, methanogenů nebo bakteroidů (Gibson and Roberfroid, 1995). Takové složení má za následek zvýšení produkce sirovodíku a snížení obsahu mastných kyselin, jako je kyselina máselná, propionová, octová a mléčná. V tomto období dochází ke zhoršení kolonické mukózy důsledkem jejího horšího prokrvení (Kvietys and Granger, 1981). Také je zvyšována absorpce chloridu sodného (Binder and Mehta, 1989).

### **3.1.1 Osídlení mikroorganismů v trávicím traktu**

Pomocí trávicího traktu získává naše tělo potřebné látky k životu. Potrava, kterou konzumujeme ústy, se dále dostává přes hltan a jícen do žaludku, kde vlivem přítomnosti kyseliny chlorovodíkové převládá kyselé prostředí. Potravina je zde trávena a postupuje dál přes pylorus (vrátník) do tenkého střeva. Zde dochází k dalšímu trávení a vstřebávání živin do organismu. Nestrávené zbytky se dostanou dále do tlustého střeva, ve kterém probíhá další vstřebání živin společně s vodou. Nevstřebačná trávenina se dostane do konečníku a je vyloučena z těla ven.

#### **3.1.1.1 Dutina ústní**

Prvním místem kontaktu potravin s trávicí soustavou je dutina ústní. Mikrobiota, která se zde vyskytuje, je složena převážně z grampozitivních, anaerobních a aerobních koků. Mikroorganismy vyskytující se v dutině ústní jsou: *Actinomyces* sp., *Candida* sp., *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli*, *Fusobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Neisseria* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Pripionibacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Streptococcus* sp. (*gamma hemolytic*) a *Veillonella* sp. (Zilberstein et al., 2007).

### 3.1.1.2 Jícen

Z dutiny ústní se potrava dostane přes hltan do jícnu, který dále ústí do žaludku. V jícnu byly detekovány *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Peptococcus* sp. v koncentraci od  $10^1$  do  $10^2$  KTJ/g (Zilberstein et al., 2007).

### 3.1.1.3 Žaludek

Jednou z vlastností žaludku je vylučování žaludeční šťávy ze stěn žaludeční sliznice. Tato bezbarvá tekutina má pH kolem hodnoty 2. V závislosti na požitém množství potravin i její skladbě se mění celkové pH v žaludku. I když kyselé prostředí působí baktericidně, některé mikroorganismy jsou schopny projít i přes kyselé prostředí dál do tenkého střeva. Nebezpečí tak pro konzumenta představují určité druhy rodů *Salmonella* a *Shigella*, nebo *E. coli*. Ty mají odhadovanou infekční dávku kolem 10 KTJ/g (Kothary et al., 2001). Častým patogenním organismem, nebezpečným pro člověka je *Helicobacter pylori*, který způsobuje gastritidu nebo rakovinu žaludku (Fox and Wang, 2001).

Mezi nejčastěji kultivované mikroorganismy v žaludku byly izolovány bakterie patřící do rodů *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus* v množství  $10^2$  –  $10^4$  KTJ/g. Další nalezené žaludeční organismy patřily do rodů *Granulicatella*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Deinococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Vibrio*, *Streptophyta*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Methylobacterium* a *Propionibacterium* (Delgado et al., 2013).

### 3.1.1.4 Tenké střevo

Tenké střevo je složeno ze tří částí: dvanáctník, lačnick a kyčelník. Při trávení slouží pro konečné zpracování tráveniny, která se dostane ze žaludku přes vrátník do dvanáctníku. Tam ústí ze slinivky enzymy a žluč z jater, která je potřebná k dalšímu štěpení potravin. Významnou částí tenkého střeva jsou výběžky ze sliznice – klky. Díky tomu je plocha střeva dostatečně velká a tak dochází ke vstřebávání většiny živin. V této části trávicího traktu byly detekovány mikroorganismy *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *E. coli*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* sp., *Propionibacterium* sp., *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp., *Veillonella* sp., *Bacillus* sp., *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Candida* sp., *Fusobacterium* sp., *Peptococcus* sp., *Rodothorula* sp., *Staphylococcus* sp., *Torulopsis* sp. a s největším zastoupením *Veillonella* sp.

Druhou částí tenkého střeva je lačnick (*jejunum*), ve kterém byly nalezeny mikroorganismy *Bacteroides* sp., *Candida* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *E. coli*,

*Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Fusobacterium fusiformes*, *Fusobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* sp., *Leptotrichia* sp., *Peptococcus* sp., *Propionibacterium* sp., *Proteus* sp., *Rodothorula* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. a *Veillonella* sp.

Pro kyčelník (*ileum*) je typické mikrobiální osídlení s *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Candida* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *E. coli*., *Enterobacter* sp., *Fusobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* sp., *Peptococcus* sp., *Peptococcus* sp., *Peptococcus* sp., *Peptococcus* sp., *Proteus* sp., *Rodothorula* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. a *Vellinella* sp. (Zilberstein et al., 2007).

#### 3.1.1.5 Tlusté střevo

Z kyčelníku, jako poslední části tenkého střeva, jsou nestrávené zbytky přesunuty do tlustého střeva. Zde dochází k resorpci vody a tedy k zahuštění nestrávených zbytků. Toto místo je bohaté na mikroorganismy, které zde mají důležitou roli. Bifidobakterie tvoří například některé vitaminy skupiny B, jako je thiamin, pyridoxin nebo niacin (Cronin et al., 2011). V této části TT jsou tvořeny bakteriemi i další vitaminy jako je B12 a D. Dalším úkolem střevní mikrobioty v tlustém střevě je fermentace polysacharidů. Největší zastoupení mikroorganismů v tlustém střevě jsou *Bacteroides* sp., *Candida* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacteriu* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Fusobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* sp., *Peptococcus* sp., *Propionibacterium* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. a *Veillonella* sp. (Zilberstein et al., 2007).

#### 3.1.1.6 Konečník

Nestravitelné zbytky s minimem vody jsou z tlustého střeva přesunuty do konečníku. V této části jsou detekovány tyto mikroorganismy *Bacteroides* sp., *Candida* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *E. coli*., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Fusobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* sp., *Peptococcus* sp., *Propionibacterium* sp., *Proteus* sp., *Rodothorula* sp., *Staphylococcus* sp. a *Veillonella* sp. (Zilberstein et al., 2007).

## 3.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* byl poprvé popsán francouzským pediatrem Henry Tissierem roku 1900, který zkoumal bakterie nacházející se u dětí, které trpěly průjmy, a jejich vzorky srovnal se vzorky bakterií u zdravých dětí. Nemocné děti měly nedostatek bakterií, mající tvar písmene Y. Tissier popsal morfologii nově nalezených bakterií a pojmenoval je *Bacillus*

*bifidus* (Tissier, 1900). V roce 1957 byl tento kmen oddělen od rodu *Lactobacillus* (Biavati et al., 2000). Nyní patří do rodu *Bifidobacterium*, kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteridae*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* (Felis and Dellaglio, 2007).

### 3.2.1 Charakteristika bifidobakterií

Rod *Bifidobacterium* jsou grampozitivní striktně anaerobní nepohyblivé bakterie mající tvar nepravidelných tyčinek, které netvoří spory. Vyskytují se jednotlivě i ve shlucích. Jsou kataláza negativní s výjimkou u *Bifidobacterium indicum* a *Bifidobacterium asteroides* (Felis and Dellaglio, 2007).

#### 3.2.1.1 Buněčná stěna bifidobakterií

Buněčná stěna bifidobakterií je typická pro grampozitivní bakterie. Skládá se ze silné peptidoglykanové vrstvy, která obsahuje polysacharidy, bílkoviny a kyselinu teichovou. Složení aminokyselin tetrapeptidů v murein není pro všechny bifidobakterie stejné. Nejčastější zastoupení aminokyselin je L-alanin, kyselina D-glutamová, L-ornitin a D-alanin. U některých kmenů je L-ornitin nahrazen lysinem. Mezi sacharidy tvořící buněčnou stěnu patří glukóza, galaktóza nebo často i rhamnóza (Biavati et al., 2000).

#### 3.2.1.2 Metabolismus bifidobakterií

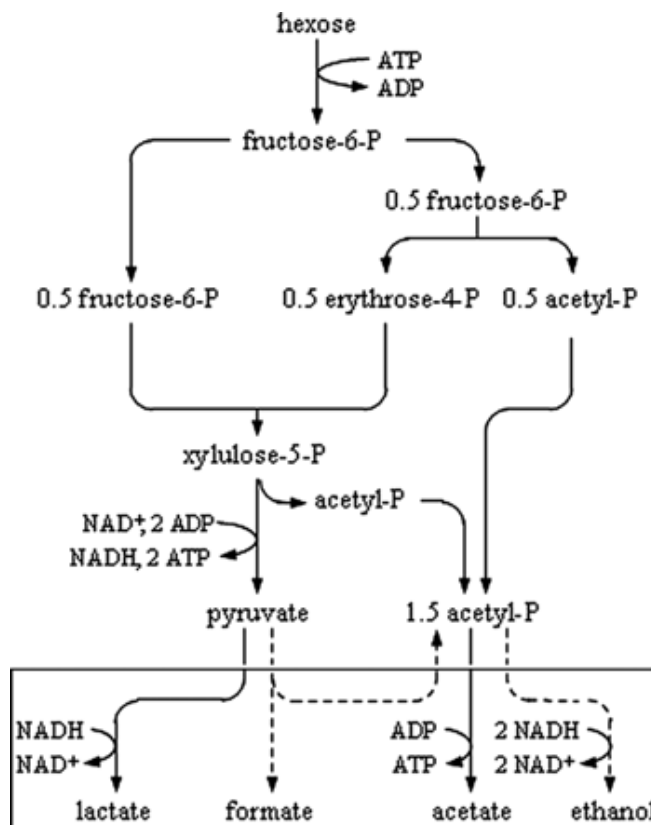
Rod *Bifidobacterium* dokáže rozkládat různé polysacharidy a oligosacharidy získané ze stravy, které se dostanou až do tlustého střeva. Ty jsou hydrolyzovány na monosacharidy a následně díky fruktózo-6-fosfátové dráze (bifid shunt) za pomoci enzymu fruktoso-6-fosfát-fosfoketoláza (EC. 4.1.2.22) fermentovány na erythroso-4-fosfát a acetyl-1-fosfát (Scardovi and Trovatelli, 1965; De Vries et al., 1967), z kterých pak vznikají krátké řetězce mastných kyselin, jako je kyselina mléčná, octová, mravenčí nebo jantarová, a i některé produkují i etanol (Van der Meulen et al., 2006). Bifidobakterie neprodukují ovšem plyny (Felis and Dellaglio, 2007).

V největším zastoupení konečných produktů jsou kyselina mléčná a octová. Obecně platí, že z jednoho molu hexózy vzniká 1,5 molu kyseliny octové a 1 mol kyseliny mléčné (Sela a kol., 2008). Tento poměr však může být rozdílný, závisí na zdroji sacharidů (Palframan et al., 2003). Příkladem je degradace inulinu, při které se zvyšuje tvorba kyseliny octové na úkor kyseliny mléčné.



Znalosti o metabolismu bifidobakterií napomáhají k využívání těchto mikroorganismů jako probiotikum (Van der Meulen et al., 2006).

Obrázek č. 1: Metabolismus bifidobakterií (Amaretti et al., 2007)



### 3.2.1.3 Vztah k teplotě a pH

Optimální teplota pro růst bifidobakterií je od 37 do 41 °C. To ovšem neplatí pro druh *Bifidobacterium thermacidophilum*, který roste i při teplotě 49,5 °C (Dong et al., 2000). Optimální hodnota pH se pohybuje pro většinu bifidobakterií od 6,5 do 7. Existují ale i výjimky, jako je například *B. thermacidophilum*, u kterého byl zaznamenán růst i při hodnotě pH 4,5 (Biavati et al., 2000).

## 3.3 Výskyt a druhové zastoupení bifidobakterií u člověka

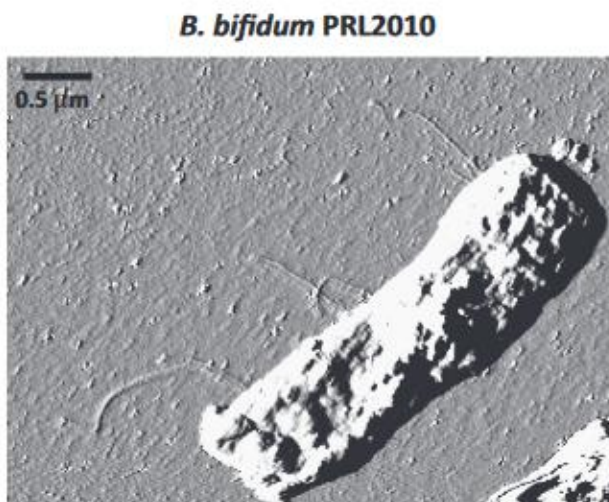
Některé druhy bifidobakterií jsou součástí trávicího traktu. Nalézt je můžeme ve stolici (Biavati et al., 1986), pochvě (Schell et al., 2002) nebo v dutině ústní (Crociani et al., 1996). Přítomnost i množství bifidobakterií se během života jedince mění. Nejpočetnější jsou u kojenců a malých dětí. V tomto věku převažují jisté druhy, jako například *Bifidobacterium longum*, který zaujímá 56,2 %, a *Bifidobacterium bifidum* s 10,7 % z celkového počtu nalezených bifidobakterií (Turrone et al., 2012). S věkem množství bifidobakterií klesá.

V dospělosti jich má člověk pouze kolem 3 % z celkového zastoupení v mikrobiotě (Franks et al., 1998), kdy převažuje opět *B. longum*, ovšem už jen v 38,2 %, a *Bifidobacterium adolescentis* v 20 %, ze zmíněných 3% všech bifidobakterií. Mezi bakterie běžně nalezené ve stolici člověka můžeme řadit také *Bifidobacterium catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* a *Bifidobacterium breve*. Ty také zaujímají poměrně velkou část. Ve velice nízkém zastoupení pak můžeme nalézt *Bifidobacterium saeculare*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium angulatum* (Turroni et al., 2012). V posledních třech letech byly popsány v trávicím traktu člověka dva nové druhy, a to *Bifidobacterium kashiwanohense* (Morita et al., 2011), který byl později potvrzen v Africe ve stolici anemických dětí (Vazquez-Gutierrez et al., 2015) a *Bifidobacterium faecale* (Choi et al., 2014). I přesto, že v dospělosti množství bifidobakterií klesá, zůstává relativně stabilní.

### 3.3.1 Druh *Bifidobacterium bifidum*

Kmeny *B. bifidum* jsou typické zejména pro kojence. Také byly detekovány u dospělých, jen v nižší koncentraci (Turroni et al., 2012). Vhodná teplota pro kultivaci *B. bifidum* je za anaerobních podmínek při 37 °C. Nachází se v tenkém a tlustém střevě (Turroni et al., 2012), mateřském mléce (Martín et al., 2009) a často v pochvě (Xia et al., 2016).

Obrázek č. 2: *B. bifidum* pořízena pomocí atomového silového mikroskopu (Ventura et al., 2012)



### 3.3.1.1 Enzymatická aktivita *B. bifidum*

*B. bifidum* je druh, který má jedinečné enzymy. Ty jsou schopny štěpit hexozy pomocí enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy (Scardovi and Trovatelli, 1965) stejně jako ostatní bifidobakterie. Navíc také dokáží působit na základní strukturu mucinu, přesněji na O-glykany. Znamé jsou také enzymy endo-alfa-N-acetylgalactosaminidasa (EngBF),  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidasa (NagBb) a alfa-N-acetylglucosaminidasa (AgnB). AgnB je typickým enzymem, který štěpí GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal (N-acetyl- $\beta$ -d-glucosamin- $\alpha$ -1,4-D-galactosa) struktury přítomné v mucinu. Zjistilo se, že by mohl být důležitý pro přizpůsobení gastroduodenálního mucinu a také by mohl být využit pro výrobu probiotických oligosacharidů z prasečího žaludečního hlenu (Shimada et al., 2015).

### 3.3.2 Substrátová specifita *B. bifidum*

Pro druh *B. bifidum* jsou typické některé substrátové preference, jako je mateřské mléko a jeho oligosacharidy, a jak již bylo zmíněno výše, mucin, který je obsažen ve slinách a z vnitřní strany sliznic.

#### 3.3.2.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko (MM) je produkováno pomocí mléčných žláz. Slouží k výživě novorozence a je považováno za tu nejlepší výživu pro dítě. Prvním mlékem je kolostrum. Tvoří se hned po porodu. Je bohaté na imunoglobuliny a obsahuje nižší množství laktózy. Během několika dnů se změní v mléko zralé. To je složeno z vody, tuku, bílkovin, sacharidů a minerálních látek. Důležitou součástí MM jsou bioaktivní faktory a mikroorganismy. Hlavním cílem mléka je splnění nutričních hodnot pro výživu kojence. Mimo splnění těchto požadavků také chrání před respiračním onemocněním (Duijts et al., 2010), atopickou dermatitidou, akutním zánětem středního ucha, gastrointestinálními infekcemi nebo onemocněním dolních dýchacích cest (Chung et al., 2007). Ochranná vlastnost mateřského mléka je velmi důležitá pro zdravý vývoj novorozence. Mezi bioaktivní faktory, které se zasluhují o obranyschopnost organismu, patří nukleotidy, mastné kyseliny, oligosacharidy, růstové faktory (epidermální růstový faktor, transformující růstový faktor beta 2), imunoglobuliny, cytokiny, imunitní buňky, lysozym, laktoferin, laktahedrin a další (Field, 2005). Některé složky slouží také jako zdroj energie pro růst prospěšných bakterií. Optimální doba kojení se uvádí po dobu prvních 6 měsíců života s pokračujícím kojením až do 2 let (WHO/UNICEF, 2016).

Některé složky MM jsou ovlivňovány faktory. Příkladem je studie o způsobu porodu, ve které byly porovnávány matky, které rodily císařským řezem a matky, které rodily vaginální cestou. Matky rodící císařským řezem mají nižší hodnoty bifidobakterií ve svém mléce (Khodayar-Pardo et al., 2014). Další výzkum se zaměřil na ženy rodící prvně a ženy rodící opakovaně. Podle výzkumu prvorodičky produkovaly mléko s vyšším množstvím adiponektinu, hormonu, který ovlivňuje metabolismus sacharidů a lipidů. Také zvyšuje citlivost tkání k inzulinu. U těchto rodiček bylo oproti vícerodičkám zase nižší množství růstového hormonu (EFG), který stimuluje růst buněk oproti vícerodičkám matek (Bernstein and Hinde, 2016).

Mateřské mléko je jedním z hlavních zdrojů bakterií, se kterými se kojenec setkává. Kojenec do věku jednoho roku vypije přibližně 800 ml mateřského mléka za den, což představuje  $10^5$  až  $10^7$  bakterií denně (Heikkilä and Saris, 2003).

Mezi nejčastěji izolované bakterie v MM byl rod *Staphylococcus* (*S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. australis*), *Streptococcus* (*S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. animalis*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. gastricus*, *L. helveticus*, *L. oris*, *L. paracasei*, *L. peores*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. vaginalis*), *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. gallinarum*), *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*) a *Propionibacterium* (*P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum*) (Fernández et al., 2013).

#### 3.3.2.1.1 Vliv obezity na mikrobiologické složení mléka

Obezita je jedním z vlivů působících na konečné složení mléka. U matek, které byly 6 měsíců po porodu, a které měly vyšší BMI (body mass index), bylo zjištěno vyšší množství některých bakterií, konkrétně *Lactobacillus*, *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*), a nižší počty u rodu *Bifidobacterium* (Cabrera-Rubio et al., 2012). Zvýšená hmotnost rodiček také ovlivňuje epidermální růstový faktor (EFG), který byl nalezen v nižších hodnotách. Oproti tomu vyšší hodnoty byly nalezeny u transformujícího růstového faktoru beta 2 (TGF- $\beta_2$ ) (Bernstein and Hinde, 2016).

#### 3.3.2.2 Oligosacharidy mateřského mléka

Mateřské mléko obsahuje značné množství oligosacharidů. Ty patří mezi bioaktivní sloučeniny. Jsou to nestravitelné glykany a tak se dostanou přes celou trávicí soustavu až do

tlustého střeva. Tam dokáží modulovat střevní mikrobiotu. Mohou působit jako navazující prvek pro patogeny nebo mohou sloužit jako prebiotika. Jsou třetí pevnou nejzastoupenější složkou MM (LoCascio et al., 2010).

Primární složky oligosacharidů mateřského mléka (HMOs) jsou D-glukóza, D-galaktózu, L-fukosu, N-acetylglukosamin a kyselina sialová.

Podle výzkumu bylo zjištěno, že kojené děti mají zvýšený podíl bifidobakterií ve srovnání s dětmi, které jsou krmeny umělou výživou (Balmer and Wharton, 1989). Předpokládá se, že právě HMOs fungují jako prebiotika a selektivně podporují růst bifidobakterií. Tyto bakterie ochraňují střevní sliznici prostřednictvím produkce acetátu, hostitel je tak chráněn před letální infekcí (Fukuda et al., 2001). Nedávné studie potvrdily, že některé kmeny bifidobakterií vykazují enzymy, které jsou schopny metabolizovat HMOs. Příkladem jsou *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bacteroides fragilis* a kmeny *Bacteroides vulgatus*. Ty byly schopné metabolizovat mléčné oligosacharidy s vysokou účinností (Marcobal et al., 2010). Oproti tomu například *B. bifidum* nedokáže zcela využít HMOs. Účinně dokáže zpracovávat pouze glukózu a galaktózu na energii. Fukosa, glukosamin a kyselina sialová není touto bakterií využívána (Ward et al., 2007). I tak dokáže *B. bifidum* využívat HMOs jako jediný zdroj uhlíku (Asakuma et al., 2011; Turroni et al., 2010). Příkladem je kmen *B. bifidum* CM 1254, který dokáže využít 16,26 % z celkových HMOs (LoCascio et al., 2009). Oligosacharidy jsou nejprve zpracovány extracelulárně, a to především prostřednictvím vylučovaných glykosylových hydroláz, které rozrušují vazby HMOs. Z oligosacharidů tak vznikají monosacharidy a disacharidy. *B. bifidum* pak metabolizuje konečné produkty intracelulárně pomocí fruktózo-6-fosfátové dráhy (Kitaoka, 2012).

### 3.3.2.3 Mucin

Mucin je složen z glykoproteinů s vysokou molekulovou hmotností. Je produkován sekrečními epiteliárními buňkami a je součástí hlenu. Největší složkou hlenu je voda. Ta zaujímá až kolem 95 %, zbytek tvoří glykoproteiny, elektrolyty, protilátky a nukleové kyseliny (Macfarlane et al., 2005). Mezi nejčastějšími aminokyselinami nalezenými přibližně z 60 % v mucinu byly serin, threonin, prolin, alanin, glycin (Lan et al., 1990). Velké množství mucinu je přítomno ve slinách a na sliznicích. Přítomnost mucinu ve slinách napomáhá k snadnějšímu polykání potravy a chrání ústa, hltan a jícn před mechanickým poškozením. Ve střevech působí také jako ochrana. V lumen střeva má význam pro prevenci adheze

a vázání mnoha patogenů, toxinů a dalších škodlivých činitelů (Macfarlan et al., 2005). Hlen slouží jako zdroj živin pro růst bakterií (Derrien et al., 2004). Konkrétně mucin slouží jako zdroj uhlíku (Ruas-Madiedo et al., 2008). Na základě této substrátové specifity bylo navrženo i selektivní médium pro *B. bifidum* (Pechar et al., 2014). I přes to, že v mucinu dobře rostou bifidobakterie, které jsou součástí probiotik, bylo zjištěno, že právě probiotika způsobují degradaci mucinu (Zhou et al., 2001), což by mohlo mít za následek změny slizniční bariéry střeva. *B. bifidum* byl jediný druh mezi 29 testovanými druhy *Bifidobacterium*, který byl schopen fermentovat prasečí žaludeční hlen (Crociani et al., 1994). Salyers et al. v roce 1977 popsal, že kmeny *Ruminococcus torques* a *B. bifidum* byly schopny částečně fermentovat mucin (Salyers et al., 1977). Později bylo upřesněno, že kmen *B. bifidum* je schopen degradovat více než 80 % z molekulové hmotnosti mucinu, a to nejspíše díky přítomnosti dvou genů kódujících extracelulární glykosidázy - AFCA a engBF (Ruas-Madiedo et al., 2008).

### **3.4 Dietní faktory ovlivňující mikrobiologické osídlení trávicího traktu**

Konzumovaná strava má značný vliv na osídlení mikroorganismů ve střevech. Je známo, že některé bakterie působí příznivě na lidské zdraví, například u některých bifidobakterií a lactobacilů bylo dokázáno, že produkují konjugovanou kyselinu linolenovou (CLA) nebo gama aminomáselnou kyselinu (GABA). CLA zabraňuje ztučnění jater a napomáhá ke schopnosti snížit množství tělesného tuku (Wall et al., 2009).

Některé potraviny obsahující vlákninu nebo polyfenoly, výrazně ovlivňují relativní četnost přítomných bakterií a jejich metabolickou aktivitu (Louis et al. 2007; Tuohy et al. 2012). Strava s dostatkem vlákniny tak nepřímou příznivě působí proti onemocněním souvisejícím s metabolismem a imunitní funkcí. Mikrobiota nacházející se u savců, a tedy i u lidí, je převážně fermentativní. Sacharidy, které potřebují mikroorganismy k životu, se do těla dostanou v podobě vlákniny. Ta se skládá převážně ze škrobu a dalších komplexních sacharidů rostlinného původu. Dělí se na rozpustnou a nerozpustnou (rezistentní). Ve stravě, kterou konzumujeme, existují čtyři typy resistantního škrobu (RS1 – RS4), které jsou odolné vůči degradaci v tenkém střevě. Dostanou se tak až k mikrobiotě osídlené v tlustém střevě, která ji dále zpracovává (Flint et al., 2012). Genomy savců nekódují většinu enzymů, které slouží k degradaci strukturních polysacharidů rostlinného původu. Proto existuje symbiotický vztah mezi střevními mikroorganismy (Flint et al., 2012). Zkvasitelné sacharidy, které jedny

mikroorganismy přemění, slouží jako substrát pro další jinou skupinu mikroorganismů. Pokud je v potravě nedostatek vlákniny, vede to až ke změně mikrobiálního složení a její metabolické aktivity.

### **3.4.1 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA)**

SCFA (z anglického Short Chain Fatty Acids neboli mastné kyseliny s krátkým řetězcem) jsou produkovány prospěšnými střevními bakteriemi. Tyto kyseliny jsou absorbovány v tlustém střevě. Jsou definovány jako těkavé mastné kyseliny s 1–6 atomy, které mohou být v lineárním nebo rozvětveném řetězci. Acetát, propionát, butyrát (kyselina octová, kyselina propionová, kyselina máselná) patří mezi nejčastější kyseliny, představují 90 – 95% z SCFA přítomných v tlustém střevě. Hlavními zdroji jsou sacharidy (vláknina), ale i aminokyseliny valin, leucin a isoleucin získané z bílkovin (Ríos-Covián et al., 2016). Acetát je nejhojnější SCFA v tlustém střevě a tvoří více než polovinu z celkového SCFA detekovaných ve stolici (Louis et al., 2007). Jedním z účinků na zdraví, který je přisuzován SCFA, je snížení lumenálního pH. To způsobuje inhibici patogenních mikroorganismů a zvýšení absorpce některých živin. Produkováný butyrát napomáhá ke zvyšování produkci hlenu, který může omezovat adhezi patogenů (Jung et al., 2015) a snižuje výskyt rakoviny tlustého střeva (Archer et al., 1998).

### **3.4.2 Vliv stravování na mikrobiologické osídlení střev**

Způsob stravování jako jeden z faktorů může ovlivnit střevní mikrobiotu. Typ stravy můžeme jednodušeji rozdělit na konvenční a vegetariánský, případně veganský. Za konvenční stravu považujeme tradiční potraviny. Lidé konzumující tento typ stravy nevynechávají ze svého jídelníčku žádné potraviny. Naproti tomu existuje skupina lidí, která ze svého jídelníčku vyřazuje maso a masné produkty, označující se jako vegetariáni. Přísnější verze tohoto typu stravování je veganství. Lidé řadící se k této skupině, vyřazují ze svého jídelníčku ještě živočišné produkty, jako je mléko, vejce, ale i med. Existují i další typy stravování jako je frutariánství, vitariánství či strava upřednostňující bio výrobky. Existuje řada studií, která zkoumá právě vliv způsobu stravování na mikrobiologické osídlení střev.

U jednotlivých výživových skupin, byla zjištěna rozdílná hodnota pH fekálního vzorku. Nejnižší pH bylo změřeno u veganů (pH  $6.29 \pm 0.76$ ), následovali vegetariáni (pH  $6.65 \pm 0.77$ ). V případě stravování, ve kterém je zahrnuta i konzumace masa, byla naměřena nejvyšší hodnota pH (pH  $6.84 \pm 0.65$ ). V této studii byly zkoumány i celkové počty organismů,

kteří byly v případě vegetariánů ( $2.44 \times 10^{11}$ ) a veganů ( $3.11 \times 10^{11}$ ) nižší než tomu bylo u kontrolní skupiny, která se skládala z lidí stravovaných konvenčním způsobem ( $3.74 \times 10^{11}$ ) (Enck et al., 2009).

#### 3.4.2.1 Vegetariánství

Mezi vegetariány řadíme lidi, kteří nekonzumují maso a masné výrobky. Tento typ stravování má na lidský organismus příznivý vliv na snížení sklonu k obezitě, vznik diabetu druhého typu (Tonstad et al., 2009) nebo vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Le and Sabaté, 2014). Také napomáhá ke snížení inzulínové rezistence (Kahleova et al., 2011). Vegetariánská strava zahrnuje více vlákniny, která může mít vliv na mikrobiologické osídlení gastrointestinálního traktu. Větší konzumace škrobnatých potravin může mít za následek zvýšení počtu některých příznivých mikroorganismů v tlustém střevě. Rostlinná strava obsahuje bioaktivní látky – polyfenoly, které přispívají ke zvýšení celkového množství bifidobakterií (Vendrame et al., 2011). Celkově u vegetariánů byl častěji zaznamenán rod *Prevotella* (Ruengsomwong et al., 2014) a rod *Subdoligranulum* oproti jedincům s konvenční stravou. V poměru ke všem bakteriím byl nejvíce zastoupen *Bacteroides thetaiotaomicron* ( $p < 0,05$ ). Tento druh je důležitou součástí střevní mikrobioty, která degraduje vlákninu (Martens et al., 2011). U některých rodů, jako je *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a druhu *Eubacterium rectale*, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinami vegetariánů a nevegetariánů (Ruengsomwong et al. 2014). Statistickou nevýznamnost vegetariánské stravy na osídlení bifidobakterií potvrdil i Matijašić. Ten tvrdil, že vyšší počty těchto bakterií jsou ovlivněny pouze věkem (Matijašić et al., 2014). Přesto bylo u jednoho jedince, který byl na dietě se zvýšeným obsahem rezistentního škrobu, zaznamenáno vyšší množství těchto bakterií (Walker et al., 2011).

#### 3.4.2.2 Veganství

Pro tento typ stravování je typické odmítání konzumace veškerého masa i zvířecích produktů, jako je mléko, vejce, med atd. Velmi často se ve filozofii veganství nejedná pouze o konzumaci živočišných produktů, ale zasahuje například i do oblékání, a tak jsou z jejich šatníku vyřazeny veškeré oděvy a doplňky z kůže nebo vlny. Veganská strava má několik přínosů. Tito lidé mají například nižší BMI, než jak je tomu u vegetariánů nebo lidí konzumujících maso (Tonstad et al., 2009). I přes to není pro mnoho lidí tento typ stravy vhodný. Jednou z nevýhod veganství je nedostatek vitamínu B12. Kobalamin je důležitý pro



syntézu DNA, pro vznik erytrocytů a na rozvoj a údržbu myelinu (plášť nervů). Nedostatek tohoto vitaminů vede až k perniciózní anémii, gastrointestinálním poruchám nebo neurologickému poškození (Donaldson, 2000). Proto je doporučována suplementace vitaminů.

V porovnání s konvenční stravou mají vegani nižší množství *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Escherichia coli* a *Enterobacteriaceae* sp. (Zimmer et al., 2012).

#### 3.4.2.3 Konvenční stravování

Za konvenční stravu považujeme jídelníček, z kterého nejsou vyřazovány žádné potraviny. Tato strava je považována za tradiční. Strava by měla být nutričně vyvážená a skládat se z vhodné kombinace rostlinné a živočišné stravy. Ve správném poměru by neměli chybět žádné potřebné živiny pro organismus. S touto stravou je ovšem spojována častá konzumace masa, která způsobuje vyšší množství klostridií z třídy IV (Liszt et al., 2009). Tato skupina bakterií byla spojována s vyšším příjmem heterocyklických aminů, které vznikají například při grilování masa a mohou zvyšovat výskyt kolorektálního karcinomu (Mai et al., 2009). Další zvýšení zastoupení bakterií bylo zjištěno u rodů *Lachnospiraceae*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* a *Collinsella* (Matijašić et al., 2014).

#### 3.4.3 Vliv obezity na mikrobiotu

Váhu jedince je možné regulovat příjmem potravin. Jedná se o tzv. energetickou bilanci, do které se počítá klidový metabolismus, fyzická aktivita, výkaly a moč. I přes znalost tohoto systému se uvažuje i o možnosti ovlivnění střevní mikrobioty na tělesnou hmotnost. Zjišťuje se, zda střevní mikrobiota není také jednou z příčin, která vede ke vzniku obezity a zda určitou dietou můžeme ovlivnit složení naší střevní mikrobioty. Příkladem může být studie na myších, kdy bylo zjištěno, že mikrobiota z obézních jedinců je účinnější při získávání energie ze stravy než mikrobiota štíhlých jedinců (Turnbaugh et al., 2006).

Strava s vysokým podílem tuku má za následek zvýšení hmotnosti, které vede k nadváze nebo až k obezitě. Některé mikrobiální skupiny byly přítomny v různých koncentracích ve stolici u jedinců s normální váhou, s nadváhou a s obezitou. Právě jedinci se zvýšenou váhou mají na rozdíl od štíhlých jedinců snížené množství střevních gramnegativních a grampozitivních bakterií, mezi něž patří i bifidobakterie (Cani et al., 2007). U obézních jedinců bylo nalezeno snížené množství rodu *Bacteroides* a zvýšené množství u *Firmicutes* (Ley et al., 2006). Dále, jedinci s nadváhou a obezitou vykazovali nižší

množství *Ruminococcus flavescens*, *Clostridium leptum*, rodu *Bifidobacterium* a *Methanobrevibacter*. Ve vyšším zastoupení byla nalezena bakterie *Bacteroidetes*. Její množství z celkového součtu studovaných druhů bylo vyšší u lidí s nadváhou (46,8 %) a obezitou (45,0 %) než u hubených jedinců (22,9 %) (Schwiertz et al., 2010). Nižší množství bifidobakterií potvrdil i článek, který se zabýval bakteriemi mléčného kvašení jako je *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. nebo *Pediococcus* sp. Všechny tyto bakterie byly u obézních lidí v nižším množství než u štíhlých jedinců (Furet et al., 2010).

#### **3.4.4 Vliv hladovění na výskyt bifidobakterií a dalších střevních bakterií**

Dieta zaměřená na snížení kalorického příjmu ovlivňuje mikrobiální osídlení střev. U obézních jedinců, kteří podstoupili 10 týdenní hubnoucí dietu, bylo zjištěno nižší množství některých bakterií, a to u *Clostridium coccooides* a *Lactobacillus* sp. Z rodu *Bifidobacterium* to byly *B. breve* a *B. bifidum*. Naopak byl zaznamenán zvýšený výskyt *Bacteroides fragilis* nebo *Bifidobacterium catenulatum* (Santacruz et al., 2009). Celkové snížení výskytu bifidobakterií při dietě s nižším množstvím sacharidů bylo zaznamenáno i v předchozí studii (Duncan et al., 2007). Ovšem 7 leté děti s normální váhou mají vyšší množství bifidobakterií, než je tomu tak u dětí s nadváhou (Kalliomäki et al., 2008).

Tyto studie tak dokazují, že omezení kalorií, které vedou ke snížení hmotnosti, má vliv na kvantitativní zastoupení střevní mikrobioty.

#### **3.4.5 Potenciál *B. bifidum* v prevenci a léčbě onemocnění TT**

V každém trávicím traktu je řada bakterií, která, pokud jsou tyto bakterie v symbióze, příznivě působí na zdraví hostitele. Dysbióza je stav organismu, který znamená pro hostitele nevyvážené zastoupení mikroorganismů v těle. Dysbióza vzniká, pokud dojde ke ztrátě příznivých mikroorganismů, k expanzi patogenů nebo potenciálně škodlivých mikroorganismů (Petersen and Round, 2014). Právě převaha některých mikroorganismů může zapříčinit gastrointestinální onemocnění trávicího traktu.

*B. bifidum* díky svým vlastnostem a produktům dokáže působit na některá onemocnění, která trápí řadu lidí. Příznivě působí proti patogenní bakterii *Helicobacter pylori*, proti stresu nebo při onemocnění Crohnovy choroby.

Příznivé působení této bakterie bylo potvrzeno proti *Helicobacter pylori*, což je bakterie, která způsobuje gastritidu a žaludeční nebo jícnové vředy (Fox and Wang, 2001). Tuto gramnegativní bakterii v sobě nese 50 % populace. V rozvojových zemích je to až 80 %

(Taylor and Blaser, 1990). V současné době jsou v léčbě využívána antibiotika. Bohužel ani to není 100% účinné. Lze ale využít i alternativní terapie. Jednou z možností je právě využití *B. bifidum* s označením CECT 7366 jako probiotikum, které brání infekcím. Účinnost byla prokázána jak *in vitro*, tak později i *in vivo* na myších. Výsledky ze studie uvádějí, že myši léčené *B. bifidum* neměly žádné známky infekce ve slezině nebo v mezenterických lymfatických uzlinách, které se nachází poblíž střev (Chenoll et al., 2011). Podobný účinek zaznamenala i studie na brojlerových kuřatech (Estrada et al., 2001).

U *B. bifidum* bylo hlášeno několik dalších blahodárných účinků na lidské zdraví. Například díky produkci kyseliny octové a mléčné dokáže modulovat imunitní systém (Ko et al., 1999; Schiffrin et al., 1997) a také působí antibakteriálně proti *E. coli* (Asahara et al., 2001). Kromě toho bylo zjištěno, že perorální podání *B. bifidum* podporuje tvorbu střevní IgA. Mechanismus účinku spočívá ve zvýšeném počtu buněk sekretujících právě tyto imunoglobuliny (Park et al., 2002).

Stres (psychická zátěž) je často spojen s gastrointestinálními problémy, jako jsou průjemy. Ve studii bylo prokázáno, že právě *B. bifidum* má na stres pozitivní účinky (Culpepper et al., 2016). Proto by mohlo být do budoucna častěji využíváno při boji proti psychické zátěži.

Podle randomizované, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studie bylo zjištěno, že *B. bifidum* (MIMBb75) má blahodárné účinky při léčbě syndromu dráždivého tračníku (IBS), a to tak, že působí proti zažívacím poruchám, bolesti a nadýmání (Guglielmetti et al., 2011). Tímto onemocněním trpí kolem 12 % populace (Locke et al., 2000). Častěji jsou jím postiženy ženy. Je jedním z nejčastějších důvodů vyhledání gastroenterologické kliniky - přibližně v 20 – 50 % ze všech příjmů (Madden and Hunter, 2002). Mezi příznaky patří bolest břicha a nadýmání. To může být zapříčiněno nerovnováhou střevní mikrobioty. Jednou z příčin nerovnováhy je významné snížení bifidobakterií a laktobacilů; také snížení bariérové funkce může přispět k rozvoji IBS (Zeng et al., 2008). *B. bifidum* tak dokáže významně zlepšit kvalitu života (Guglielmetti et al., 2011).

#### 3.4.5.1 Crohnova choroba

Praktická část této práce se zaměřuje i na děti trpící Crohnovou chorobou. Proto je toto onemocnění detailněji rozpracováno v literární rešerši.

Crohnova nemoc je chronické zánětlivé onemocnění střev, které souvisí s poruchou imunity. Zánět může postihnout organismus kdekoliv v gastrointestinálním traktu. Nejčastěji

postiženou částí je ovšem část tenkého střeva (ileum) a slepé střevo (apendix). Mezi příznaky tohoto onemocnění patří bolest břicha, horečka, střevní obstrukce a krvavý průjem.

Příčina onemocnění není zcela známá. Jsou ovšem zjištěny některé faktory, které mohou vést ke vzniku choroby. Genetika hraje velkou roli. Je známa tzv. genetická předvídavost, na základě které hrozí u potomků rodičů s touto poruchou vyšší pravděpodobnost nástupu nemoci (Bengtson et al., 2009).

Dalším důležitým faktorem je strava. Vyšší příjem potravy, která je bohatá na vysoký obsah tuků, polynenasycených mastných kyselin, omega-6 mastných kyselin a masa, byl spojen se zvýšením rizika Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy. Oproti tomu strava s vysokým obsahem vlákniny a ovoce může snižovat riziko propuknutí těchto chorob. K tomu, vysoký příjem zeleniny byl spojen se snížením rizika ulcerózní kolitidy (Hou et al., 2011; Amre et al., 2007). Dalším významným faktorem pro rozvoj nemoci je vliv kouření. To také způsobuje zhoršení průběhu nemoci. (Tuvlin et al., 2007).

Onemocnění se léčí pomocí imunosupresivních léků (např. azathioprin) a inhibitorů tumor nekrotizujícího faktoru alfa (anti-TNF alfa) (Monteleone et al., 2015). Bohužel u více než jedné třetiny pacientů nemá tato léčba pozitivní výsledky. Účinnost těchto léků (anti-TNF alfa) se s časem snižuje a může zvyšovat riziko oportunních infekcí, jako je například tuberkulóza, a nebo jiných závažných infekcí (Lawrance et al., 2010). Při tomto onemocnění se snižují počty mikroorganismů, zejména *Firmicutes* (Willing et al., 2010).

Po zjištění onemocnění Crohnovou chorobou se využívá bezsezbytková dieta. Potravin, které pacienti dostávají, obsahuje méně vlákniny a to cca 10 g/den (Lijoi et al., 2009). Postižená střevo by tak neměla být příliš zatěžována. Dlouho se nad touto dietou neuvažovalo, protože právě vláknina je spojována s příznivými účinky, jako jsou konečné produkty jejího trávení v tlustém střevě (Anderson et al., 2009).

### **3.5 Detekce bifidobakterií ve vzorcích stolice**

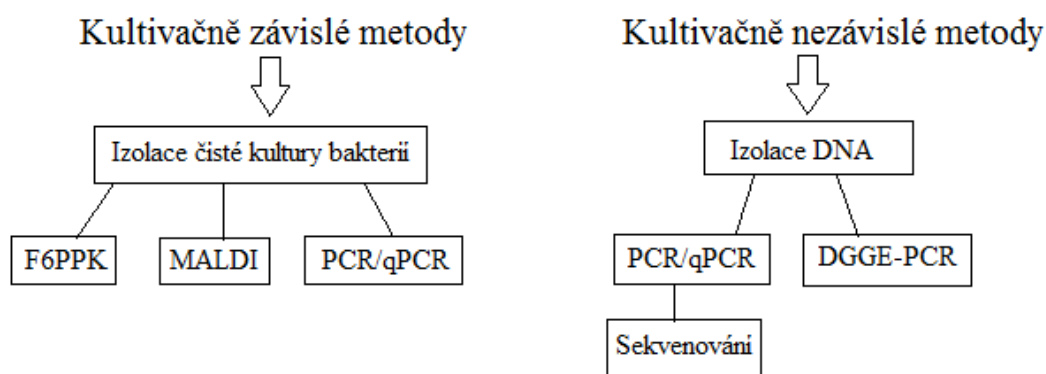
Obecně jsou pro detekci bakterií ve stolici používány dva typy identifikací, a to kultivačně závislé a kultivačně nezávislé.

Kultivační metody slouží ke zjištění přítomnosti nebo množství mikroorganismů ve zkoumaném vzorku. K tomuto testu jsou využívány tekuté nebo pevné půdy. Testy jsou založeny na namnožení dceřiných buněk vzniklých dělením z jedné buňky mateřské. Vzrostlé

kolonie na půdě jsou uváděny v počtu kolonie tvořících jednotek – KTJ. V ideálním případě odpovídá jedna kolonie tvořící jednotka jedné původní buňce.

Díky znalostem fyziologických požadavků mikroorganismů byly vynalezeny půdy pro stanovení jednotlivých druhů bakterií. Tyto půdy (médiá) jsou označovány jako selektivní. Na médiu rostou pouze ty bakterie, které zkoumáme. Existují pak ještě média neselektivní, které umožňují růst všem mikroorganismům.

Obrázek č. 3: Schéma kultivačně závislých a kultivačně nezávislých metod



### 3.5.1 Růstové média pro rod *Bifidobacterium*

Mezi růstová média vhodná pro bifidobakterie patří agary. Agar byl poprvé použit v mikrobiologii roku 1882 německým vědcem Waltherem Hessem. Díky svým tepelným vlastnostem nahradil želatinu (Nussinovitch, 1997). Složení tohoto média slouží k výživě bakterií. Používaným agarem pro bifidobakterie je Bifidus selektivní agar (Simpson et al., 2004; Toscano et al., 2015). Pro kultivaci pomocí tohoto agaru je zapotřebí 48 h a kolonie mají fialovou/hnědou barvu. Dalšími agary pro růst těchto bakterií jsou BRS agar, DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Toscano et al., 2015), modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s přísadkou ledové kyseliny octové (1 ml/l) a mupirocinu (100 mg/l), modifikovaný agar s ledovou kyselinou octovou (1 ml/l) a mupirocinem (100 mg/l) (Rada and Petr, 2000), nebo MRS agar, ke kterému je přidán 0,05% L-cystein (Wei et al., 2016) a mupirocin-mucin agar (MM agar) (Pechar et al., 2014).

### 3.5.2 Identifikace bifidobakterií pomocí detekce enzymu F6PPK

Jak již bylo zmíněno výše, pro rod *Bifidobacterium* je typický vlastní metabolismus sacharidů. Hexózy štěpí pomocí enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy (F6PPK). Díky této vlastnosti můžeme určit jeho rodovou identifikaci. Pro tento test kultivujeme mikroorganismy anaerobně v anaerobní komoře s bujonem TPY při teplotě 37 °C po dobu 42 hodin. Poté je možné buňky odstředit. Vzniklá peleta se nechá dvakrát promýt roztokem fosfátového pufru a buňky se v pufru suspendují. Buňky jsou rozrušeny sonikací v ledu. Supernatant se smísí s roztokem fluoridu sodného, jodacetátu a destilované vody v určitém poměru a 7 fruktózo-6-fosfátu s H<sub>2</sub>O. Po 30 minutách inkubace při teplotě 37 °C je reakce ukončena přidáním roztoku hydroxylamin hydrochloridu, H<sub>2</sub>O a hydroxidu sodného. Směs je udržována při pokojové teplotě, poté jsou přidány roztoky TCA (kyseliny trichloroctové) a HCl. Nakonec je přidán 5% FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub> rozpuštěný v HCl. Vznik červeno-fialové barvy bezprostředně po protřepávání zkumavky indikuje přítomnost fructoso-6-fosfát fosfoketolasy (Vlková et al., 2002).

### 3.5.3 MALDI TOF

MALDI TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization) je laserová desorpční ionizace pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) s analyzátozem Time of flight (TOF). Metoda je považována za rychlou, přesnou a vhodnou k identifikaci mikroorganismů. Technologie vytváří charakteristické hmotnostní spektroskopie, „otisky prstů“, které jsou jedinečné pro každý mikroorganismus. Mohou tak sloužit k mikrobiální identifikaci na úrovni rodu a druhu (Croxatto et al., 2012).

MS byla dříve používána zejména v odvětví chemie. V roce 1975 němečtí vědci Anhalt a Fenselau navrhli, že i charakteristiku bakterií lze vyjádřit touto metodou. Byli první, kteří zaznamenali hmotnostní spektra z bakteriálních extraktů z různých rodů a různých druhů (Anhalt and Fenselau, 1975).

Díky jednoduchosti metody je hojně využívána v diagnostických mikrobiologických laboratořích, kde slouží k identifikaci klinicky významných bakterií. Metoda byla podle průzkumu z 95,4 % správná. Jednou z velkých výhod je identifikace během několika minut (Seng et al., 2009). Další nespornou výhodou je malé množství bakterií potřebné k identifikaci (Bizzini and Greub, 2010).

Metoda byla použita pro charakterizaci široké škály mikroorganismů, jako jsou bakterie, plísňe nebo viry (Giebel et al., 2010). Je použitelná pro aerobní, fakultativně

anaerobní i striktně anaerobní bakterie. Našla si proto uplatnění i při identifikaci bifidobakterií (Velloo et al., 2014).

Princip metody spočívá v převedení vysokomolekulární látky do plynné fáze. Vzorek je ozářen laserovým paprskem (Jurinke et al., 2004). Pomocí hmotnostního analyzátoru jsou ionty odděleny podle poměru hmotnost/náboj. Nakonec pomocí detekčního zařízení pro sledování oddělených iontů jsou vytvořena spektra. Ta se skládají z jednotlivých píků na základě velikosti a intenzity uvolněných proteinů (Croxatto et al., 2012).

### **3.5.4 Genetická analýza bifidobakterií**

K identifikaci bifidobakterií bylo navrženo několik molekulárních technik. Většina identifikací je založena na analýze 16S rRNA genové sekvence. Základním požadavkem pro analytické molekulárně biologické metody je izolovaná genomická DNA. Pro přesné testy je zapotřebí mít DNA v dostatečné čistotě a množství.

#### **3.5.4.1 Izolace DNA z čistých kultur**

Toto je popis jedné z možností. V současné době je na trhu celá řada komerčních kytů, které se liší. Pro zjištění bifidobakterií je zapotřebí izolovat DNA ze vzorku. Protože množství genetické informace není ve vzorku obsaženo ve velkém množství, musí se při výběru metody dbát na její citlivost. Případné nečistoty mohou negativně ovlivnit průběh reakcí. Důležitá je také kvalita templátové DNA. Prvním krokem je inkubace naváženého vzorku s lýzovým pufrem, ve kterém se nacházejí sterilní zirkonové kuličky. Lýzou buněk se rozruší buněčná stěna a následně jsou vzorky homogenizovány a inkubovány do další buněčné lýzy. Díky tomu získáme supernatanty. K těm je přidán acetát amonný. Po promíchání a inkubaci se přidá isopropanol a vzorek se nechá opět inkubovat, tentokrát ovšem na ledu. Po tomto kroku odstraníme supernatant pomocí aspirace. Získané pelety jsou promyty etanolem a vysušeny ve vakuu, poté jsou rozpuštěny v TE pufru. Díky dalším krokům, jako je přidání deoxyrionukleázy, proteázy, pufru, etanolu a úkonům centrifugace a inkubace získáme vzorek DNA. Ten je třeba uchovávat nejlépe při teplotách  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Yu and Morrison, 2004).

### 3.5.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Zkratka PCR pochází z anglického slovního spojení Polymerase Chain Reaction. První, kdo objevil princip metody, byl Kary Mullis, a to roku 1983 (Mullis, 1990).

Každý test PCR vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy. DNA polymeráza je klíčový enzym, který se účastní replikace DNA tím, že spojuje jednotlivé nukleotidy.

Mezi nukleotidy patří čtyři báze - adenin, thymin, cytosin a guanin se zkratkami A, T, C, G. Ty působí jako základní stavební kameny, které jsou používány DNA polymerázou pro vytvoření výsledného nového řetězce. Primery jsou krátké fragmenty DNA, které mají stanovenou sekvenci komplementární k cílové DNA.

Výše uvedené složky se smísí ve zkumavce a poté se umístí do termocykléru. Ten má tepelný blok s otvory, do kterých jsou vloženy zkumavky, v nichž je namíchaná PCR reakční směs. Přístroj zvyšuje a snižuje teplotu bloku v naprogramovaných krocích (Weier and Gray, 1988).

Principem této metody je opakovaná řízená denaturace dvouřetězové DNA. Po tomto kroku následuje renaturace jednotlivých řetězů pomocí oligonukleotidů. Ty slouží jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Amplifikace DNA probíhá v cyklech. Pro analýzu lze použít krev, kůži, vlasy, sliny i mikroby. PCR je považována za velmi citlivý test, ke zkoumání je tedy zapotřebí pouze malá část DNA.

#### **Denaturace**

Denaturace je prvním krokem PCR reakce. Reakční roztok se zahřeje nad teplotu tání dvou komplementárních řetězců DNA. To způsobí rozpadnutí vodíkových můstků mezi vlákna DNA. Počáteční teplota před samotnou denaturací je 94 °C a více, která trvá 3 minuty. Samotná denaturace probíhá v opakujících se cyklech při stejné teplotě po dobu 45 vteřin (Wagner et al., 2015).

#### **Hybridizace**

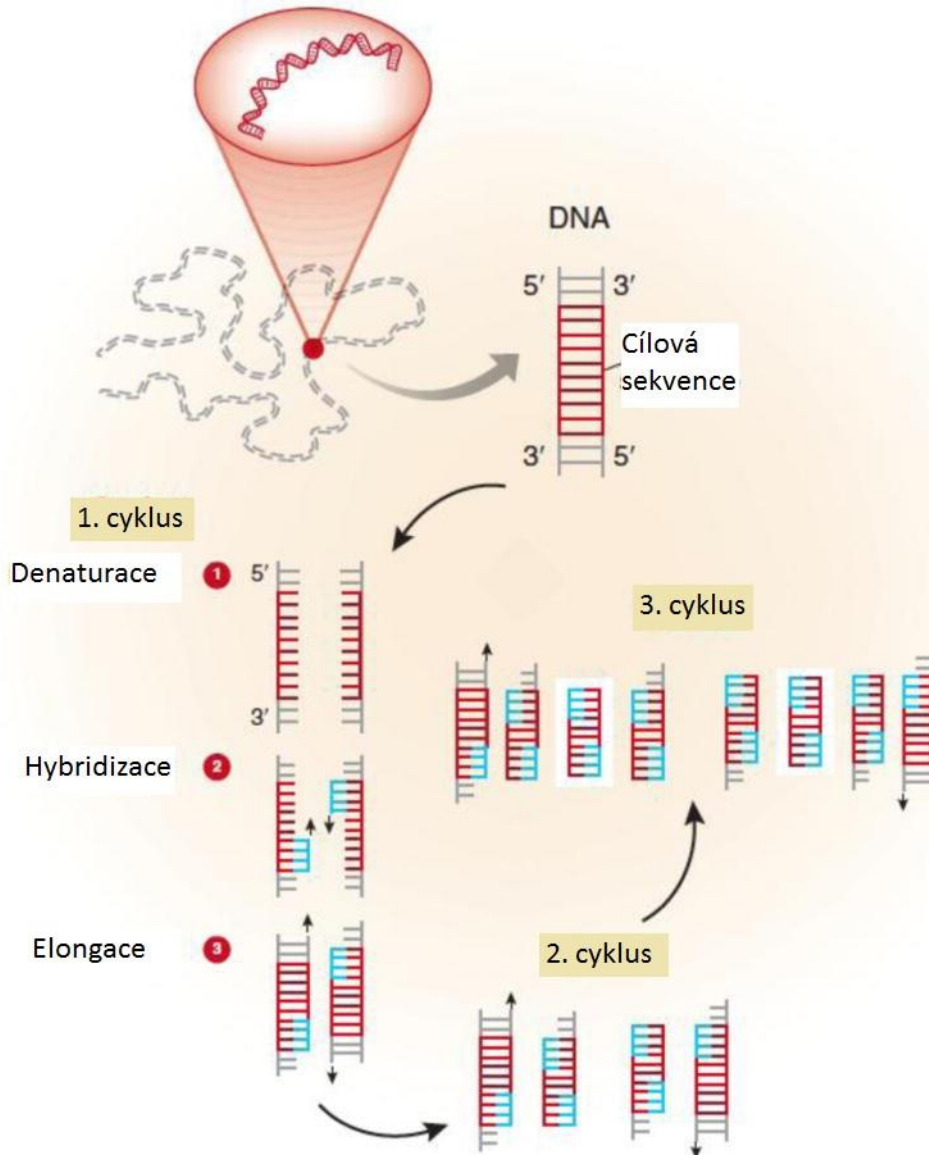
Po rozdělení DNA se teplota v termocykléru sníží např. na 55 °C (teplota podle přesně předepsaných podmínek). Ta je vhodná pro nasednutí specifických primerů, které se naváží na segmenty templátové DNA. Tento proces se nazývá hybridizace (annealing) a trvá 45 sekund. K nasednutí primerů na templátovou DNA dochází pouze při komplementární sekvenci. Může nastat prodloužení cyklu při 72 °C po dobu 90 vteřin (Wagner et al., 2015).



## Elongace (elongace, extenze)

Elongace je syntéza nových komplementárních řetězců DNA. Od konce 5' primeru jsou vázány nukleotidy komplementární k sekvenci původních řetězců DNA. Extenze je prováděna při teplotě 72 °C po dobu 10 minut (Wagner et al., 2015).

Obrázek č. 2: Schéma principu PCR (Garibyan and Avashia; 2013)



### 3.5.5.1 Vizualizace PCR

Existují dva hlavní způsoby vizualizace PCR produktů. Prvním způsobem je barvení amplifikovaného DNA produktu chemickým barvivem, jako je ethidiumbromid. Ten se vsune mezi dvě vlákna duplexu. Druhým způsobem je označení PCR primerů či nukleotidů před amplifikací PCR fluorescenčními barvivy (fluorofory), jakým je například GelRed™.

Nejčastější metodou analýzy PCR produktů je použití elektroforézy na agarosovém gelu. Ta odděluje DNA produkty na základě velikosti a náboje.

### **Výhody použití PCR**

Existuje několik výhod PCR. Tato metoda je jednoduchá a poskytuje výsledky rychle. Také se jedná o vysoce citlivou techniku s možností vyrábět mnoho kopií konkrétního produktu pro sekvenování, klonování nebo analýzu. Citlivost techniky může ale být i nevýhodou, a to v tom, že jakákoli forma kontaminace vzorku (i stopová množství DNA) může vést k zavádějícím výsledkům.

Problém při vizualizaci může nastat při použití primerů použitých pro PCR. Ty mohou nasedat nespecificky k sekvencím, které jsou podobné, ale ne zcela identické s cílovou DNA (Garibyan and Avashia, 2013).

Podobná metoda klasické PCR je druhově specifická qPCR, která slouží k identifikaci bakterií, a navíc umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase. Je známá také jako Real-time PCR. Ta zaznamenává každý cyklus PCR ve skutečném čase pomocí sondy – fluorescenční látky (barvivo interkalující s dvouřetězcovou DNA), která je úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi. Snímání intenzity fluorescenčního záření ze sond probíhá pomocí programu v přístroji s detektorem pro snímání fluorescenčního signálu.

Princip této metody je podobný jako u klasické PCR. Jde tedy o denuraci templátu, hybridizaci primerů a syntézu nových řetězců cílového úseku DNA v opakujících se cyklech. qPCR směs obsahuje navíc fluorescenční molekuly. PCR v reálném čase je metoda, která má několik výhod oproti konvenční PCR. Těmi jsou zvýšená rychlost, vyšší citlivost a nepotřebnost dalších operací (např. s elektroforézou). Jejimi nevýhodami jsou vyšší pořizovací cena a vyšší náklady na analýzu vzorku (Fraga et al., 2008).

### **Průběh qPCR**

1. Fáze exponenciální – vysoce specifická, dochází ke zdvojnásobení množství očekávaného produktu
2. Fáze lineární – dochází ke zpomalení reakce, spotřebě jednotlivých komponent reakce, může docházet i k degradaci vzniklých produktů
3. Plataneu fáze – reakce je zastavena, nedochází k syntéze dalšího produktu, může nastat degradace produktu (Fraga et al., 2008).

K přesné kvalifikaci je použita sonda, nejčastěji fluorescenční barvivo. Používají se 2 typy sond. Prvním typem jsou nespecifické sondy, mezi které patří fluorescenční kyaninová

barviva př. SYBR Green. Druhým typem jsou specifické fluorescenčně značené sondy (př. TaqMan<sup>TM</sup>). Ty hybridizují teplotu DNA (Hrstka et al., 2013).

### **Vyhodnocovací metody**

Naměřená fluorescence je vynesena proti příslušnému cyklu. Společně tvoří tzv. amplifikační křivky, jejichž matematickou analýzou dosáhneme kvantifikace produktu. Důležitým bodem amplifikační křivky je  $C_t$  („threshold cycle“). Tento bod značí cyklus, u kterého intenzita fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce. Hodnota  $C_t$  se nachází v exponenciální fázi. Platí, že čím vyšší je výchozí koncentrace templátu, tím dříve je pozorováno významné zvýšení fluorescence, a tím nižší je  $C_t$  (Bustin, 2005).

### **3.5.6 Sangerova metoda sekvenování DNA**

Sangerovo sekvenování je biochemická metoda, která zkoumá pořadí jednotlivých nukleotidů v molekule. Její pojmenování je po objeviteli Frederikovi Sangerovi. Roku 1975 společně s A. Coulsonem popsali metodu pro stanovení nukleotidové sekvence. Je také označována jako metoda plus a mínus (Sanger and Coulson, 1975) a je známá jako první generace sekvenování. Princip je obdobný, jako u PCR. Replikace templátové/jednořetězová DNA je množena pomocí primerů a polymerázy. Primery byly v minulosti označovány radioaktivními látkami, pro viditelnost reakce. Vylepšení metody nastalo pomocí značení fluorescenčními barvivy (Prober et al., 1987) a metoda tak byla zautomatizovaná. Reakce probíhá ve 4 zkumavkách. Do každé je přidán primer, DNA-polymeráza, templát, deoxiribonukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a v každé zkumavce je ještě přidán různý dideoxynukleotid (ddATP, ddTTP, ddGTP a ddCTP), který nemá na 3' uhlíku-OH skupinu. Tím je zabráněno dalšímu připojení nukleotidu a reakce je tak u konce (Sanger and Coulson, 1975; Hattori and Sakaki, 1986). Stejně jako u PCR je vizualizace úrovedena pomocí elektroforézy. Na elektroforetickém gelu jsou pustěny tyto 4 reakce. Podle délky jednotlivých fragmentů jsme tak schopni určit pořadí nukleotidů. To vede ke schopnosti sekvenování genomu, včetně sekvenování mikroorganismů. Tato metoda tak byla použita pro sekvenování mnoha mikroorganismů v našem trávicím traktu (Zhang et al., 2009). Vývoj této metody jde dopředu, tak už dnes existuje několik nových technologií na základě sangerova sekvenování. Obecně jsou tyto metody známé jako sekvence příští generace (NGS – New generation sequencing). Na rozdíl od předchozího způsobu sekvenování tato nová generace umožňuje rychlejší a cenově příznivější sekvenaci více vzorků najednou. Mezi systémy nové generace

patří Roche 454, Solexa (Illumina), SOLiD (Applied Biosystems) nebo ABI Solid (Schuster, 2008).

Pomocí NGS byly kvantitativně posouzen dopad stravy na střevní mikrobiotu u dětí (De Filippo et al., 2010).

### 3.5.7 DGGE

Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE) je technologie používaná pro detekci rozdílů mezi fragmenty DNA o stejné velikosti, ale s různými sekvencemi nukleotidů. Dvouvláknová DNA putuje polyakrylovým gelem s močovinou a formamidem. Na základě její molekulové hmotnosti doputuje do části, ve které dochází k denuraci dvouvláknové DNA na jednovláknovou. Rychlost denaturace závisí na počtu vodíkových můstků mezi jednotlivými nukleotidy. Pro elektroforézu se nejčastěji využívá konstantní teplota v rozmezí od 55 do 65 °C (Ercolini, 2004).

DGGE analýza ve spojení s PCR byla využita i pro detekci několika druhů *Bifidobacterium*. Důsledkem sloučení těchto dvou metod je schopnost rozlišovat i několik nukleotidových rozdílů. Díky tomu byly tak navrženy další primery, které byly použity pro identifikaci tohoto druhu (Sheu et al., 2013). PCR-DGGE je využitelný pro *B. bifidum*. (Hong and Chen, 2007).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Testování schopnosti utilizace mucinu bakteriemi rodu *Bifidobacterium*

Nejprve bylo třeba ověřit zda pouze druh *B. bifidum* má schopnost utilizace mucinu. Tímto testem se zabývalo více prací, ale nejsou již aktuální. Je třeba zmínit že za poslední roky se rod *Bifidobacterium* rozšířil o nové druhy. Tudíž celá sbírka především typových kmenů rodu *Bifidobacterium* byla otestována na schopnost růstu na mucinu jako jediném zdroji uhlíku. Podrobný seznam testovaných kmenů je v příloze této DP (Příloha č. 1). Celkem bylo otestováno 68 druhů a poddruhů bifidobakterií. Čerstvě narostlé kultury bifidobakterií byly testovány v médiu API 50 CHL doplněném o mucin (20g/l). Nejprve byla zkontrolována čistota narostlých kultur v mikroskopu s fázovým kontrastem, a poté byla kultura zaočkována do uvedeného média a kultivována 48 h při 37 °C. Růst v médiu byl potvrzen na základě barevné změny, jelikož médium obsahuje bromkresolovu červeň jako pH indikátor. Případný růst se projeví produkcí kyseliny octové a mléčné, a tudíž změnou pH. Původní médium je fialové při růstu se mění barva na žlutou.

Tabulka č. 1: Složení API 50 CHL media

Složení API 50 CHL medium	Polypepton 13 g Kvasinkový extrakt 6,5 g Tween 80 1,3 g Hydrogenfosforečnan draselný 2,6 g Octan sodný 6,5 g Diamonium-citrát 2,6 g Síran hořečnatý 0,26 g Síran manganatý 0,065 g Bromkresolova červeň 0,221 Mucin 9,75 g Demineralizovaná voda 1300 ml pH 6,7 – 7,1
------------------------------	--

### 4.2 Puvod vzorků stolice pro detekci *B. bifidum*

V této studii byly použité vzorky dárců rozděleny do skupin. Do první skupiny byly zařazeny dárce s dospělou mikrobiotou. Tato skupina byla dále rozdělena podle rozdílnosti

diet. Obsahovala jak jedince s konvenční stravou, tak jedince se stravou vegetariánskou. Do druhé skupiny byly zařazeny jedinci (dětští pacienti) trpící Crohnovou chorobou, kterým byla po dobu 6 týdnů podávána pouze enterální výživa.

#### 4.2.1 Původ vzorků od zdravých dárců (vegetariánská a konvenční dieta)

Vzorky stolice těchto dárců byly získány pro předchozí analýzy zahrnuté do studií prováděných na katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD). Celkem bylo 20 dárců, které jsme rozdělili do skupin podle jejich stravovacích návyků. První skupina, která se stravovala konvenční dietou, obsahovala 10 jedinců (9 dospělých a jedno dítě ve věku 7 let). Tato skupina lidí nevyřazovala ze svého jídelníčku žádné běžné potraviny, které se u nás konzumují. Druhá skupina stravující-se vegetariánskou stravou obsahovala také 10 dárců. U této skupiny bylo 9 dospělých jedinců a jedno dítě ve věku 7 let. Popis jednotlivých dárců je uveden v tabulce níže. Vlastní rozbor a kultivace stolice dárců na selektivních médiích byl vykonán v minulých letech na KMVD a jeho výsledky využity pro potřeby bakalářské práce studentky Evy Mráčkové.

Tabulka č. 2: Popis dárců a rozdělení stravy na vegetariánskou (V) a konvenční (M)

Označení vzorku	Typ stravy	Pohlaví	Věk
V1	vegetariánská	žena	32
V2	vegetariánská	žena	34
V3	vegetariánská	žena	7
V4	vegetariánská	žena	32
V5	vegetariánská	muž	39
V6	vegetariánská	žena	27
V7	vegetariánská	žena	30
V8	vegetariánská	žena	36
V9	vegetariánská	žena	21
V10	vegetariánská	žena	33
M1	konvenční	žena	28
M2	konvenční	žena	29
M3	konvenční	muž	50
M4	konvenční	žena	22
M5	konvenční	muž	7
M6	konvenční	žena	24

<b>M7</b>	konvenční	muž	24
<b>M8</b>	konvenční	žena	36
<b>M9</b>	konvenční	žena	36
<b>M10</b>	konvenční	žena	26

#### 4.2.2 Původ vzorků od jedinců trpících Crohnovou chorobou

Druhá skupina jedinců byla složena z pacientů trpících Crohnovou chorobou. Vzorky byly odebrány ve spolupráci s fakultní nemocnicí Motol. Jednalo se o dětské pacienty, u kterých byla diagnostikována Crohnova choroba a jako způsob možné léčby je zvolena 6 týdenní dieta, tedy formou enterární výživy. V rámci testování byly vzorky pacientů použity také na testování přítomnosti *B. bifidum* ve stolici. Odběry byly provedeny před zahájením diety (0. odběr) a po 6. týdnech.

Tabulka č. 3: Popis pacientů

<b>Iniciály pacienta</b>	<b>Věk</b>	<b>Pohlaví</b>	<b>Číslo vzorku</b>
<b>D. L.</b>	15	muž	1 a, b
<b>V. Š.</b>	11	muž	2 a, b
<b>F. C.</b>	18	muž	3 a
<b>D. D.</b>	17	muž	4 a, b
<b>V. H.</b>	10	muž	5 a, b
<b>J. H.</b>	12	muž	6 a, b

a - 0. odběr stolice, b - 6. týden odběru stolice

U pacienta s iniciály F. C. je zahrnut pouze 0. odběr. Ke zpracování byl zařazen z důvodu odlišnosti od jiných vzorků (ve vzorku byla přítomna krev).

### 4.3 Izolace bakteriální DNA ze stolice

Pro detekci bakterií pomocí PCR/ qPCR je zapotřebí izolace bakteriální DNA ze vzorku stolice.

Postup izolace DNA s použitím kitů Fast Prep (modifikace protokolu pro půdu) je popsán na následující stránce:

1. Návážíme 500 mg vzorku stolice do zkumavky Lysing Matrix E
2. Přidáme 978  $\mu$ l Sodium Phosphate Buffer (fosfát sodný)
3. Přidáme 122  $\mu$ l MT Buffer
4. Homegenizujeme v přístroji FastPrep® po dobu 40 sekund při nastavení rychlosti na 5,0. Tento proces zopakujeme ještě jednou.
5. Centrifugujeme při 14 000 otáčkách po dobu 10 minut.
6. Přelijeme supernatant do čisté 2,0 ml mikrocentrifugační zkumavky. Přidáme 250  $\mu$ l PPS (Protein Precipitation Solution) a směs 10krát protřepáním promícháme.
7. Centrifugujeme při 14 000 otáčkách po 10 minut. Po centrifugaci přepipetujeme supernatant do čistých 15 ml zkumavek. Peleta je zbytkem nežádoucích proteinů.
8. Do každé 15 ml zkumavky se supernatantem přidáme po 1 ml Binding Matrix.
9. Ručně promícháváme překlápěním obsah zkumavky po dobu 2 minut a následně necháme 10 minut obsah zkumavky sedimentovat.
10. Odstraníme 800  $\mu$ l z vrchní části supernatantu.
11. Ve zbylém supernatantu rozmícháme peletu. Přepipetujeme přibližně 650  $\mu$ l do zkumavek s filtrem (SPIN). Zkumavky necháme zcentrifugovat při 14 000 otáčkách po dobu 1 minuty. Následně odstraníme supernatant pod filtrem do odpadu.
12. Přidáme 500  $\mu$ l roztoku SEWS-M.
13. Stočíme 1 minutu při 14 000 a odstraníme zbytky.
14. Opět centrifugujeme po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách. Následně přelijeme do nové zkumavky a necháme 5 minut na vzduchu (odpaření ethanolu).
15. Rozmělníme ve 100  $\mu$ l l apyrogenní vodě.
16. Stočíme 1 minutu při 14 000 otáčkách.
17. Odstraníme SPIN filtr, ve zkumavce máme izolovanou DNA

Kvantita množství a čistota vyizolované DNA byla posléze měřena na přístroji – Spektrometr (ND-1000, NanoDrop®) a následně naředěna na koncentraci cca 25 ng/  $\mu$ l.



#### 4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vyizolovaná bakteriální DNA byla podrobena polymerázové řetězové reakci (PCR) s použitím rodově a druhově specifických primerů. Pro reakci bylo zapotřebí míchání reakční směsi, která se skládala z komponentů, které jsou uvedeny v tabulce č. 4 společně s jejím množstvím. Příprava primerů byla připravena podle návodu od výrobce. PCR směs byla připravena v objemu 25  $\mu\text{l}$  na reakci.

Tabulka č. 4: Obsah reakční směsi pro PCR

Složka	Množství
PCR mix (ThermoScientific)	12,5 $\mu\text{l}$
Primer 1	1 $\mu\text{l}$ (konc. 10 pmol)
Primer 2	1 $\mu\text{l}$ (konc. 10 pmol)
Deionizovaná voda (ThermoScientific)	9,5 $\mu\text{l}$
DNA	1 $\mu\text{l}$ (15-50 ng/ $\mu\text{l}$ )
Celkem	25 $\mu\text{l}$

Pro rodově specifickou PCR byly použity primery Bif 164 a Bif 662 podle (Kok et al. 1996). Pro PCR na úrovni druhu *B.bifidum* byly použity primery BiBIF1 a BiBIF2 podle Matsuki et al. (1998). Informace o jednotlivých primerech jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Popis primerů používaných pro PCR

Primer	Species	Sekvence nukleotidů	Teplota annealingu	PCR product (bp)
Bif164	<i>Bifidobacteriu</i> <i>m</i> sp.	GGGTGGTAATGCCGGATG	59 °C	523
Bif662		CCACCGTTACACCGGGAA		
BiBIF-1	<i>B. bifidum</i>	CCACATGATCGCATGTGATTG	59 °C	278
BiBIF-2		CCGAAGGCTTGCTCCCAA		

Jednotlivé namíchané vzorky byly umístěny do Termocykleru (Biometra), kde byl nastaven teplotní program pro *B. bifidum*. Pro počáteční denaturaci byla nastavena teplota 95 °C po dobu 5 minut. PCR reakce probíhala v 35 cyklech, kdy denaturace trvající 1 minutu byla při teplotě 95 °C, annealing trval také po dobu 1 minutu při 59 °C a i elongace probíhala při 72 °C též 1 minutu. Konečná elongace měla stejnou teplotu, jen trvala 8 minut. Pro vizualizaci PCR produktů byla použita elektroforéza s agarózovým gelem. Postup pro přípravu gelu je popsán zde:

1. Agaróza 1 g (Serva)
2. 100 mL 0,75 koncentrovaného TAE pufru (Serva)
3. Povaření 3 minuty v mikrovlné troubě, v polovině promíchat
4. Přidání 5 µl/100 ml Gel Red (Biotum)
5. 30 min. nechat utuhnout

#### **4.5 Použitá média pro detekci bifidobakterií ve stolici**

Ke zjištění přítomnosti a počtu bifidobakterií byly použity 3 různé média. Jednalo se o agary: modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s přidavkem ledové kyseliny octové a mupirocinu (WSP), již uvedený modifikovaný WSP agar navíc s norfoxacinem (Bif-NORF) a agar s mucinem (typu III).

Příprava agaru začíná rozpuštěním Wilkins-Chalgren agaru v destilované vodě s přidáním sojového peptonu, cysteinu, a tweenu. Vše je potřeba dobře rozmíchat, rozvařit a sterilovat. Po vytemperování na 48 °C je přidán mupirocin a směs je opět promíchána. Pro modifikovaný agar s norfoflaxinem je postup i složení stejné, jen je přidán nofloflaxin.

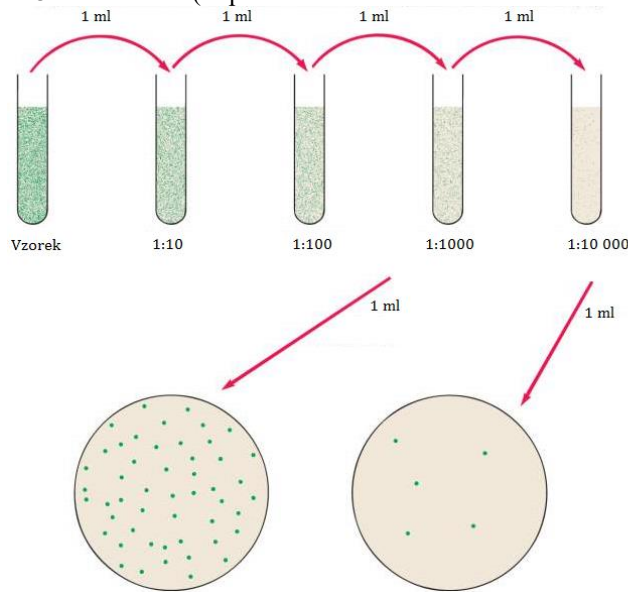
Tabulka č. 1: Média pro růst bifidobakterií

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
<b>Wilkins-Chalgren 1000 mL (WSP Mup agar pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)</b>	48 h, anaerobní, při 37 °C	43 g Wilkins-Chalgren anaerob agar (OXOID), 5 g Sojový pepton (OXOID), 0,5g Cystein (OXOID), 1 ml Tween (Sigma), 100 mg Mupirocin, 100 µl ledová kys. octová
<b>Modifikovaný agar s norfloxacinem 1000 mL (Bif-NORF pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)</b>	48 h, anaerobní, při 37 °C	43 g Wilkins-Chalgren anaerob agar (OXOID, UK), 5 g Sojový pepton (OXOID), 0,5 g Cystein (OXOID), 100 mg Mupirocin, 1 ml Tween (Sigma) 1 g Norfloxacin, 100 µl ledová kys. octová,
<b><i>B.bifidum</i> s mucinem 1000 mL (Mucinový agar pro <i>B.bifidum</i>)</b>	48 h, anaerobní, při 37 °C	20 g Mucin (Sigma-Aldrich), 5 g Sojový pepton (OXOID), 0,25 g Cystein (OXOID), 0,1 ml Tween (Sigma), 2,5 g kvasinkový extract, 5 g Tripton, 100 mg Mupirocin

## 4.6 Postup rozboru stolice

Pro rozbor stolice byla připravena série roztoků s postupně se snižující koncentrací – ředící řady s ředícím roztokem (Peptonová voda). Pro první ředění byl použit vzorek stolice v původní zkumavce. Tato zkumavka byla zvážena a ze získané hmotnosti jsme odečetli hmotnost zkumavky před odběrem vzorku. Vypočtené číslo jsme podělili číslem 1 a získali tak výsledek množství vzorku, které bylo převedeno z prvního do druhého ředění. Následně byl vždy odebrán 1 ml promíchaného vzorku z vyššího ředění do následující zkumavky (nižšího ředění). Takto se pokračovalo až do poslední zkumavky. Počet ředících zkumavek byl stanoven na základě zkušeností s nárůstem konkrétních MO.

Obrázek č. 5: Ředící řada (<http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lecture4-Microbio.htm>)



Z jednotlivých ředění byl odebrán 1 ml vzorku sterilní injekční stříkačkou. Toto množství bylo převedeno na Petriho misky a zalito agarem. Pro rovnomerné rozmísení vzorku v agaru jsme pomocí krouživého pohybu promíchali vzorek. Pro rozbor bylo zapotřebí pracovat ve sterilním prostředí, které jsme dosáhli pomocí plamene a sterilních pomůcek.

Pro růst bifidobakterií je potřebné nechat kultivovat misky za anaerobních podmínek pomocí vyvíječe anaerobní atmosféry (AnaeroPack, Thermo Scientific) při 37 °C 48 hodin.

Po kultivaci byly stanoveny počty mikroorganismů. Výsledek je vyjádřen v jednotkách KTJ (kolonie tvořící jednotku) a přepočet je vyjádřen ve vzorci níže.

$$\left[ \frac{\sum a+b+c}{111} \right] \cdot 10^n = y \cdot 10^n \quad \log y = xx$$

$$KTJ = y \cdot 10^{n, xx}$$

a, b, c – součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách

111 – Počet ploten použitých pro výpočet (každá plotna 1), v ideálním případě byly použity 3 plotny

n – číslo nejvyššího ředění (počet ředění, které bylo použito u plotny c)

Pro ověření selektivity jednotlivých médií byly provedeny preparáty. Na podložní sklíčko byla převedena kapka vzorku (kapka sterilní vody a kolonie; anebo kapka čisté kultury narostké v bujónu), které bylo zakryto sklíčkem krycím. Pomocí fázového kontrastního mikroskopu se zvětšením 400x byla zaznamenána morfologie a čistota vzorku.

## **4.7 Příprava čistých kultur**

Po stanovení počtu narostlých kolonií byly vybrány jednotlivé narostlé kolonie odlišného tvaru z Petriho misek s agarem s mucinem a WSP. Tyto kolonie byly pomocí sterilních kliček převedeny do zkumavek obsahující živný bujón (složení obdobné jako WSP agar, ale tekuté médium, které neobsahuje agar). Zkumavky s izoláty byly inkubovány v termosatu po dobu 24 hodin. Takto připravené čisté kultury byly použity pro identifikaci pomocí MALDI TOF MS a pro další případné testování.

## **4.8 Kontrola selektivity mucinového média**

Pro kontrolu byla provedena zkouška selektivity mucinového agaru byly jednotlivé bifidobakteriální izoláty z tohoto agaru kultivovány jako čistá (jednotná) kultura na médiu API 50 CHL doplněném o mucin (20g/l). Postup byl shodný jako při testování sbírkových kultur bifidobakterií.

## **4.9 Identifikace izolátů pomocí MALDI TOF MS**

1 ml čisté kultury, které bylo připraveno po rozboru stolice, byl převeden do Eppendorf zkumavky a zcentrifugován 3 minuty při max. otáčkách. Po centrifugaci byl slit supernatant do odpadu a k peletě přidán 500  $\mu$ l 70% ethanol. Směs byla promíchána a stočena. Supernatant byl opět slit do odpadu a zbylý ethanol odpipetván. K peletě ve zkumavce bylo přidáno 20  $\mu$ l 70% kyseliny mravenčí a pomocí pipety byl vzorek promíchán ve směsi. K tomu pak byl přidán a promíchán 100% acetonitril v množství 20  $\mu$ l. Následně byla směs centrifugována. Na připravenou „MALDI destičku“ byl napipetován 1  $\mu$ l supernatantu ve dvou opakování sloužící pro kontrolu. Po uschnutí nanesené kapky byl přidán 1  $\mu$ l MALDI matrice. Tím byly vzorky připraveny k identifikaci a vloženy do přístroje.

## 5 Výsledky

### 5.1 API testování čistých kultur

Celkově bylo otestováno 68 izolátů. Jednalo se o izoláty především z TT člověka, jako je *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. longum ssp. longum*. nebo *B. pseudocatenulatum*. Do testování byly zařazené také, ale izoláty pocházející z hmyzu. Pro testování byla například použita bakterie *B. asteroides*, která pocházela z TT včel a *B. bohemicum* pocházející ze čmeláka. Také byly do testování zařazeny zvířecí bifidobakterie, které pocházely od primátů, jakožto nejbližší geneticky příbuzní zvěřata. Příkladem je *B. moukalabense*, která byla izolována ze stolice gorily.

I přes variabilitu původu izolátu a nově testované druhy, pouze izoláty druhu *B. bifidum* (ATCC 29521, DSMZ 20215, DSMZ 20239, DSMZ 20456 a DSMZ 20082) byly schopni utilizace mucinu, což se projevilo změnou barvy (z temně fialové na žlutou). Test byl proveden ve dvou kopiích.

### 5.2 Výsledky detekce pomocí rodově a druhově specifické PCR

#### 5.2.1 Ověřování použitých primerů

Před samotnou identifikací *B. bifidum* u vzorků vegetariánů a konzumentů stravujících se konvenčně, byly ověřeny primery BBIF1 a BBIF2 na některých bifidobakteriích a jiných druzích ze sbírky kmenů, které jsou k dispozici na KMVD. Jednalo se o druhy typické pro trávicí trakt člověka. U druhu jako je *B. longum* byly použity všechny jeho dostupné poddruhy.

Tento test zjistil, že tyto primery jsou skutečně druhově specifické pro *B. bifidum*. Nedošlo k žádné jiné pozitivní reakci s ostratními testovanými druhy bifidobakterií. Navíc pozitivní výsledek byl zaznamenán nejen u typového kmene *B. bifidum* DSMZ 20456, ale i u ostatních sbírkových kmenů jako *B. bifidum* DSMZ 20082 a *B. bifidum* DSMZ 20215. Pro ověření byly použity také kmeny *Lactobacillus* sp. a *Clostridium* sp., kde byla opět negativní reakce.

Tabulka č. 6: Ověření přímerů na sbírce MO

Kmen	Výsledek reakce	Kmen	Výsledek reakce
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> DSMZ 20219	-	<i>B. pseudocatenulatum</i> DSMZ 20438	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> DSMZ 20088	-	<i>B. pseudolongum</i> 20099	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suillum</i> DSMZ 28597	-	<i>B. globosum</i> 20092	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i> DSMZ 20211	-	<i>B. adoslescentis</i> 20087	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> DSMZ 20104	-	<i>B. adolescentis</i> 4987	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSMZ 10140	-	<i>B. longum</i> 10/1	-
<i>B. bifidum</i> DSMZ 20456	+	<i>B. longum</i> 10/11	-
<i>B. bifidum</i> DSMZ 20082	+	<i>B. longum</i> 10/5	-
<i>B. breve</i> DSMZ 20213	-	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactic</i> BB12	-
<i>B. bifidum</i> DSMZ 20215	+	<i>Lactobacilus</i> sp.	-
<i>B. kashiwanohense</i> DSMZ 21854	-	<i>Clostridium</i> sp.	-
<i>B. catenulatum</i> 4989 CCM	-		

DSMZ – německá sbírka mikroorganismů, CCM – česká sbírka mikroorganismů

(+) pozitivní výsledek, (-) negativní výsledek

### 5.2.2 Přítomnost bifidobakterií v závislosti na různém typu diety

Výsledky detekce bifidobakterií ve vzorcích zdivých jedinců (10 vegetariánů, 10 konvenčně stravujících osob) získané pomocí kultivačně závislé a nezávislé metody jsou uvedeny v tab. č. 7. Data pocházejí z předchozí studie Bunešová et al. (2017). Identifikace byla provedena pomocí metody MALDI TOF MS. Tyto data nám sloužila k porovnání s naší identifikací pomocí PCR s rodově specifickým párem primerů BBIF1 a BBIF2. Vzorky DNA pro naši identifikaci pocházely ze stejného vzorku stolice, jako tomu bylo u identifikace pomocí MALDI TOF MS.

Tabulka č. 7: Detekce bifidobakterií pomocí kultivace s následnou identifikací izolátů metodou MALDI TOF MS ve vzorcích zdravých dárců (10 vegetariánů – V, 10 omnivorů - M) (Bunešová et al., 2017)

<b>Vegetariánská strava</b>	
V1	<i>B. adolescentis</i> (5), <i>B. longum</i> (5)
V2	<i>B. adolescentis</i> (6), <i>B. longum</i> (4)
V3	<i>B. adolescentis</i> (5), <i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (4)
V4	<b><i>B. bifidum</i></b> (5), <i>B. longum</i> (5)
V5	<i>B. adolescentis</i> (6), <i>B. longum</i> (4)
V6	<i>B. longum</i> (10)
V7	<i>B. adolescentis</i> (5), <i>B. longum</i> (5)
V8	<i>B. adolescentis</i> (5), <b><i>B. bifidum</i></b> (1), <i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (3)
V9	<i>B. adolescentis</i> (4), <i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (5)
V10	<i>B. longum</i> (5), <i>B. pseudocatenulatum</i> (1)
<b>Konvenční strava</b>	
M1	<i>B. adolescentis</i> (6), <i>B. longum</i> (4)
M2	<i>B. adolescentis</i> (4), <i>B. longum</i> (6)
M3	<i>B. adolescentis</i> (8), <b><i>B. bifidum</i></b> (1), <i>B. longum</i> (1)
M4	<i>B. animalis ssp. lactic</i> (10)
M5	<i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (9)
M6	<i>B. adolescentis</i> (1), <i>B. catenulatum</i> (5), <i>B. longum</i> (4)
M7	<i>B. longum</i> (10)
M8	<i>B. adolescentis</i> (2), <i>B. longum</i> (8)
M9	<i>B. adolescentis</i> (7), <i>B. longum</i> (3)
M10	<i>B. adolescentis</i> (6), <i>B. catenulatum</i> (1), <i>B. longum</i> (3)

Číslo v závorce znázorňuje počet opakujících se izolátů

U 10 vegetariánů byla, pomocí PCR s rodově specifickými primery, zjištěna přítomnost bifidobakterií u všech dárců (tab. č. 8). Věk dárců se pohyboval od 7 do 39 let a častější dárci byly ženy. Přítomnost *B. bifidum* v získané DNA byla pomocí specifických primerů pro tento druh potvrzena u 4 dárců. Pro porovnání s tabulkou č.7 můžeme pozorovat, že detekce *B. bifidum* pomocí PCR za použití specifických primerů byla zde častější. Při identifikaci pomocí MLADI TOF MS byla přítomnost této bakterie nižší, a to pouze ve dvou



případech. Nacházela se u vzorku V4 a V8. Při PCR metodě byla schodná detekce, ale ještě k tomu vykazoval přítomnost *B. bifidum* vzorek s označením V5 a V9.

Tabulka č. 8: Výsledek identifikace pomocí PCR se specifickými primery u vegetariánů

Označení vzorku	Identifikace pomocí kultivačně vázané detekce pomocí PCR za použití specifických primerů pro <i>Bifidobacterium</i> spp.	Identifikace pomocí kultivačně vázané detekce pomocí PCR za použití specifických primerů pro <i>B. bifidum</i>
V1	+	-
V2	+	-
V3	+	-
V4	+	+
V5	+	+
V6	+	-
V7	+	-
V8	+	+
V9	+	+
V10	+	-

(+) pozitivní výsledek, (-) negativní výsledek

Stejný postup jako u vegetariánů byl použit i pro vzorky pocházející od dárců, kteří se stravovali konvenční dietou. Všech 10 vzorků vykazovalo přítomnost *Bifidobacterium* spp., ale jen u 4 vzorků byl přítomen druh *B. bifidum*. Opět pro srovnání s tabulkou č. 7, můžeme říci, že PCR metoda pro identifikaci byla citlivější. Identifikace pomocí MALDI TOF MS bylo detekováno *B. bifidum* pouze u jednoho jedince (vzorek M3). V případě identifikace pomocí PCR byla přítomnost vyšší a to u 4 vzorků. Jednalo se o vzorky s označením M3, M5, M6 a M10.

Tabulka č. 9: Výsledek identifikace pomocí PCR se specifickými primery u omnivorů

Označení vzorku	Identifikace pomocí kultivačně vázané detekce pomocí PCR za použití specifického primeru pro <i>Bifidobacterium</i> spp.	Identifikace pomocí kultivačně vázané detekce pomocí PCR za použití specifického primeru pro <i>B. bifidum</i>
M1	+	-
M2	+	-
M3	+	+
M4	+	-
M5	+	+
M6	+	+
M7	+	-
M8	+	-
M9	+	-
M10	+	+

(+) pozitivní výsledek, (-) negativní výsledek

Z našich výsledků vyplývá, že PCR metoda je citlivější, než kultivačně závislá metoda detekce. Při použití stejných vzorků od jedních dárců PCR detekovala přítomnost *B. bifidum* celkem u 8 vzorků, z nichž 4 patřily vegetariánům a 4 omnivorům. Metoda kultivace s následnou identifikací MALDI TOF MS zaznamenala přítomnost této bakterie pouze u 3 vzorků, z nichž 2 vzorky patřily osobám stravující se výhradně vegetariánskou stravou a 1 vzorek patřil osobě, která se stravovala konvenční stravou.

V případě identifikace bakterií na úrovni rodu obě metody detekovali u všech jedinců přítomnost *Bifidobacterium* spp. V případě kultivace s následnou identifikací pomocí metody MALDI TOF MS bylo zjištěno nejvíce *B. longum*, který se nacházel celkem u 19 osob (celkem z 20). Druhým druhem, který byl nejzastoupenější u obou typů stravování, byla bakterie *B. adolescentis*. Ta se nacházela u celkem u 14 osob (7 vegetariánů, 7 omnivorů).

Z výzkumu vyplývá, že rozdílný typ stravování (vegetariáni vs. omnivoři) nemá vliv na kvantitativní osídlení *B. bifidum* v TT člověka. V případě závislosti přítomnosti *B. bifidum* na věku konzumenta, nelze tvrdit, že děti školního věku mají vyšší výskyt této bakterie. V obou skupinách se nacházel jedinec ve věku 7 let. V případě vegetariána (vzorek V3) nebyla přítomna tato bakterie ve vzorku. U dítěte stravující-se konvenční stravou (vzorek M5) byla

bakterie identifikována. Z důvodu malého počtu dětských dárců nelze vyvodit výsledky. Proto by bylo vhodné k dalším výzkumům zahrnout více dětských dárců.

### 5.3 Počty a identifikace MO u pacientů s Crohnovou chorobou

Pomocí selektivních médií jsme určili počty bifidobakterí u pacientů s Crohnovou chorobou. K testování jsme použili 3 typy medií, jejichž složení je popsáno v metodice v tabulce č. 5. Jednalo se o agary: WSP Mup agar, Bif-NORF agar a Mucinový agar. Jednotlivé počty bifidobakterií jsou uvedeny v následující tabulce č. 10. Pro agary WSP Mup a Bif-NORF jsou uvedeny výsledky v log KTJ/g. Složení těchto agarů, společně s anaerobním prostředím, by mělo podpořit růst pouze *Bifidobacterium* spp. Pro selektivitu *B. bifidum* byl použit agar s přísadkou mucinu. Mucin je zde použit jako jediný zdroj uhlíku, a tak by na tomto agaru měla být narostlá pouze tato bifidobakterie (Pechar et al., 2014). V tomto případě není nárůst uveden klasicky v log KTJ/g. V tabulce je zaznamenáno pouze nejvyšší ředění s nárůstem MO. Pro porovnání s jinými agary byl nárůst MO jen na nízkém ředění a často se také jednalo o nespecificky ojedinělý výskyt. Po otevření některých Petriho misek byl zaznamenán charakteristický zápach, který pravděpodobně patřil klostridiím. Z nejvyššího ředění s nárůstem byly vytvořeny preparáty, z kterých bylo pomocí mikroskopu usouzeno, že se nejedná dle morfologie pravděpodobně o *B. bifidum*. Na základě těchto poznatků bylo provedeno otestování selektivity Mucinového agaru pomocí testu API CHL Medium doplněného o mucin. Test byl už předtím proveden také na čisté sbírce kmenů, kterou vlastní KMVD a našich čistých kultur ze vzorku. Viz kapitola 5.1 API testování čistých kultur. Ani jedna naše vyizolovaná kultura z mucinového média nezreagovala pozitivně, tedy se nejedná o kmeny *B. bifidum*.

Nejméně MO bylo narostlých na agaru s mucinem. V případě Mucinového agaru, kde narostli MO pouze na nízkém ředění, a byly zpozorovány zbytky ze stolice, je možné se domnívat, že v médiu byly jiné zdroje uhlíku než pouze mucin. To mohlo zapříčinit růst jiných bakterií. Oproti tomu nejvíce narostlých MO bylo spočteno na WSP agaru. Na Bif-NORF agaru bylo spočteno méně kolonií než bylo na WSP agaru. Z toho lze usoudit, že z těchto dvou agarů je Bif-NORF více selektivní.

Protože se jednalo o vzorky pocházejících od jedních dárců, ale v různém stádiu jejich léčby pomocí diety – enterální výživy (0. a 6. týden odběru), zaměřili jsme se na množství bifidobakterií během této diety. Z tabulky je patrné, že vzorek z druhého odběru (6. týden) měl méně přítomných bifidobakterií. Jednalo se o pacienty 1, 2, 4 a 6. Pouze u jednoho

pacienta (s číslem 5) byl počet bifidobakterií u druhého odběru vyšší. Pro vzorek 3a nemáme porovnání dvou odběrů. Tento vzorek byl dán do testu z rozdílnosti stolice od ostatních dárců. V tomto vzorku, podle subjektivního zhodnocení, byla obsažena krev. I přes tuto rozdílnost byly počty podobné, jako u jiných pacientů u 0. odběru. Vzorek obsahoval počty v hodnotě 8,6 log KTJ/g pro WSP Mup a 8,5 log KTJ/g pro Bif-NORF.

Tabulka č. 10: Počty MO na různých typech agarů selektivních pro bifidobakterie

Číslo vzorku	WSP Mup	Bif-NORF agar	Mucinový agar
1a	4,51 log KTJ/g	< 2 log KTJ/g	N. D.
1b	<3 log KTJ/g	2 log KTJ/g	N. D.
2a	8,51 log KTJ/g	7 log KTJ/g	N. D.
2b	3,60 log KTJ/g	3,3 log KTJ/g	10 <sup>4</sup> *
3a **	8,6 log KTJ/g	8,5 log KTJ/g	10 <sup>5</sup> *
4a	8,04 log KTJ/g	8,31 log KTJ/g	10 <sup>3</sup> *
4b	3,96 log KTJ/g	3,30 log KTJ/g	10 <sup>2</sup> *
5a	4,30 log KTJ/g	2,30 log KTJ/g	10 <sup>2</sup> *
5b	8,30 log KTJ/g	7,85 log KTJ/g	10 <sup>2</sup> *
6a	4,30 log KTJ/g	3,89 log KTJ/g	10 <sup>3</sup> *
6b	<3 log KTJ/g	2,30 log KTJ/g	10 <sup>3</sup> *

\* V případě média pro *B. bifidum* nejsou počty uvedeny jako log KTJ/g, jelikož se jednalo o často nespecificky ojedinělý výskyt testování, tudíž je uvedeno nejvyšší ředění na, kterém byly kolonie detekovány.

\*\* U vzorku 3 a byl použit jen 0. odběr. Tento vzorek byl zařazen do výzkumu pro rozdílnost vzorku od ostatních. Ve stolici byla přítomna krev, a tak bylo možné jiné druhové bakteriální zastoupení.

N. D. - nedetekováno

Pro identifikaci vzorků pocházejících od dětí trpících Crohnovou chorobou byla použita metoda kultivace s následnou identifikací MALDI TOF MS. Tou bylo zjištěno, že na agaru, který má být selektivní pouze pro *B. bifidum*, narostly i jiné druhy bifidobakterií jako je *B. adolescentis*, *B. catenulatum* nebo *B. longum*. Jako jiné identifikované rody bakterií byly *Anaerococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp., *Parabacteroides* a další. Nejvíce byl zaznamenán ve vzorcích *B. adolescentis* a *B. longum*, a to u tří pacientů. U vzorku 1 a 2 nebyly zjištěné žádné narostlé kolonie na agaru obsahující mucin. Detailnější výsledky jsou popsány v tabulce č. 11.

Narostlé izoláty na WSP Mup agaru obsahovaly obdobné druhy bifidobakterií, jako byly izolované na agaru obsahující mucin. Například u vzorku 2a bylo v obou případech

izolována *B. catenulatum*. U vzorku 3a (krvavý vzorek) byla identifikace obdobná na obou druhých agarů. V obou případech byla identifikována *B. longum*. V Případě izolátu z mucinu byl ještě k tomu identifikována bakterie *Clostridium perfringens*. Mezi nejčastější identifikovanou bakterií narostlou na WSP Mup agaru byla *B. catenulatum* a to u 5 vzorků. Druhým nejčastějším identifikovaným zástupcem bylo *B. longum*. Podle této identifikace nebyla prokázána přítomnost bakterie *B. bifidum* u žádného z pacientů.

Tabulka č. 11: Identifikace MO ze vzorků od pacientů s Crohnovou chorobou

Číslo vzorku	Identifikace pomocí MALDI TOF MS	
	Izoláty narostlé na agaru WSP Mup (n=10)	Izoláty narostlé na agaru s mucinem
1a	<i>Clostridium perfringens</i> (2), <i>Propionibacterium acnes</i> (1)	N. D.
1b	<i>Propionibacterium acnes</i> (1)	N. D.
2a	<i>B. catenulatum</i> (10)	<i>B. catenulatum</i> (3)
2b	<i>B. catenulatum</i> (8), <i>Bacteroides faecis</i> (2)	<i>Bacteroides thetaiotamicron</i> (1), <i>Bacteroides faecis</i> (2), <i>Parabacteroides</i> <i>distasonis</i> (1)
3a **	<i>B. longum</i> (10)	<i>B. longum</i> (2), <i>Clostridium perfringens</i> (1)
4a	<i>B. adolescentis</i> (7), <i>B. longum</i> (3)	<i>B. adolescentis</i> (3), <i>B. longum</i> (1), <i>Clostridium butyricum</i> (1)
4b	<i>B. longum</i> (10)	<i>B. longum</i> (2)
5a	<i>B. adolescentis</i> (8), <i>B. catenulatum</i> (2)	<i>B. adolescentis</i> (2)
5b	<i>B. adolescentis</i> (9), <i>B. catenulatum</i> (1)	<i>B. adolescentis</i> (2), <i>Staphylococcus</i> <i>epidermis</i> (1), <i>Clostridium butyricum</i> (1)
6a	<i>B. catenulatum</i> (3)	<i>B. catenulatum</i> (1)
6b	N. D.	<i>Enterococcus faecalis</i> (2), <i>Anaerococcus</i> <i>vaginalis</i> (1), <i>Staphylococcus epidermis</i> (1)

N. D. - nedetekováno

### Detekce bifidobakterií pomocí PCR u pacientů s Crohnovou chorobou

K potvrzení nepřítomnosti *B. bifidum* u vzorků pocházející od dětských dárců byly vzorky ověřeny pomocí PCR s rodově a druhově specifickými primery stejně jako tomu bylo u vegetariánů a omnivorů. Díky vizualizace PCR produktu na agarozovém gelu jsme zjistili, že

ani jeden vzorek neobsahoval *B. bifidum* a rod *Bifidobacterium* sp. nebyl přítomen u vzorků 1 a, 1b a 6 b. Výsledek u vzorku s číslem 6 byl rozdílný pro identifikaci pomocí kultivace a následné identifikace pomocí MALDTI TOF, kde byl identifikován *B. catenulatum*.

## 6 Diskuze

Nejvyšší množství bifidobakterií nalezneme v kojeneckém věku. Mezi nejčastějšími druhy jsou *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. catenulatum* (Turroni et al., 2012). To je dáno jednak získání prvních mikroorganismů během porodu, tak stravou, která je pro kojence určená. Složky mateřského mléka (MM) jsou vhodným substrátem pro růst těchto bakterií. Hlavní složkou MM jsou oligosacharidy, jako je glukosa, galaktosa a fukosa. Podle Chichlowski et al. (2012) právě oligosacharidy MM podporují růst určitých bakterií, kterou je i *B. bifidum*. S roztoucím věkem klesá kvantitativní zastoupení této bakterie, ale i ostatních bakterií z rodu *Bifidobacterium* sp. V dospělosti jich má člověk pouze kolem 3 % z celkového zastoupení v mikrobiotě (Franks et al., 1998). Z této práce vyplývá, že přítomnost této bakterie je ve 40 % u zdravých jedinců. Do výzkumu byli zahrnuti, jak dospělí lidé, tak děti.

Adheze bakterií na střevní stěně sliznice je důležitým předpokladem pro kolonizaci bakterií. To napomáhá ke konkurenčním výhodám v ekosystému (Hansson, 2012). Právě mucin, který je ochrannou vrstvou v gastrointestinálním traktu napomáhá k přilnavosti *B. bifidum*. Ta díky svým enzymům dokáže narušit strukturu mucinu a tak jej využívat jako jediný zdroj uhlíku (Turroni et al., 2010). Pro ostatní bifidobakterie není tento substrát využitelný. V minulosti bylo testováno několik bifidobakterií na utilizaci mucinu. Proto jsme do našeho testování zahrnuli i druhy, které byly objeveny nedávno, abychom potvrdili platnost tohoto tvrzení. V testu bylo zahrnuto 68 izolátů. Jednalo se o bifidobakterie pocházející z TT člověka jako jsou *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* nebo *B. catenulatum*. Také jsme testovali druhy, které byly nalezeny v trusu zvířat a hmyzu. Z hmyzu byly otestovány zejména bifidobakterie pocházejících ze včel a čmeláků. Mezi zvířecí bifidobakterie byly zahrnuty *B. animalis* pocházející z výkalů krysy, *B. lemurum* ze stolice lemura nebo *B. boum* izolovaného z bachoru skotu. Byly také testovány bifidobakterie, které pocházely z trusu primátů. Jednalo se o *B. callitrichos*, která pocházela z výkalu opice – kosmanovití a *B. moukalabense* pocházející z gorily. Pomocí testování API CHL 50 jsme dokázali, že pouze druhy *B. bifidum* a to: ATCC 29521, DSMZ 20215, DSMZ 20239, DSMZ 20456 a DSMZ 20082 dokážou využít mucin. I když bylo dokázáno, že jsou bifidobakterie, které jsou schopni růst na některých složkách mucinu, nedokáží využít mucin jako celek. Příkladem je *B. breve*, která má schopnost růst na substrátu ze sacharidů jako je galaktosa a glukosa, což jsou právě složky mucinu. Pro to, aby mohla tato bakterie

plně využít mucin jako zdroj uhlíku je zapotřebí kombinace společně s *B. bifidum* (Egan et al., 2014).

Podle Vendrame et al. (2011) má složení stravy vliv na mikrobiologické osídlení střev, a tak nepřímo působí na ochranu zdraví konzumenta. Ovšem rozdílnost stravy v závislosti na konzumaci masa a masných výrobků nezaznamenal vliv na osídlení *Bifidobacterium* ani jiné druhy jako *Lactobasillus* nebo *Eubacterium* (Ruengsomwong et al. 2014; Šaková et al., 2015). To potvrdil i výzkum od Matijašić et al. (2014), který tvrdil, že vyšší počty těchto bakterií jsou ovlivněny pouze věkem. Jedinou nalezenou skupinou bakterií v trávicím traktu, která byla osídlena u omnivorů ve vyšší počtu, byly klostridie (Šaková et al., 2015).

Přítomnost *B. bifidum* byla u dospělých jedinců u 3 ze 17 sledovaných, což představuje v 18 %. Pro děti byla identifikována tato bakterie v 7 %. Do testu bylo zahrnuto celkem 15 dětí (Gavini et al., 2001). Po rozdělení lidí podle stravovacích skupin byla přítomnost *B. bifidum* u 2 z 10 (20 %) vegetariánských dárců a u lidí stravujících se konvenční stravou u 1 z 10 (10 %) (Bunešová et al., 2017).

Z našeho výzkumu vyplynulo, že vliv stravy nemá zásadní vliv na osídlení *B. bifidum*. V obou případech, jak vegetariánů, tak omnivorů, bylo stejné množství dárců, kterým jsme identifikovali *B. bifidum* ve vzorku stolice a to ve 40 %. Test byl proveden pomocí PCR s druhově specifickým párem primerů BiBIF 1 a BiBIF 2 podle Matsuki et al. (1998). Podle Bunešové et al. (2017) přítomnost bifidobakterií byl u vegetariánů i omniorů druhově podobný. Mezi nejzastoupenější bakterie patřily *B. adolescentis* a *B. longum*. Obě tyto bakterie se nacházely v početném množství u obou stravovacích skupin. Podle Gavini et al. (2001) je *B. longum* jednou z nejčastěji osídlených bifidobakterií v TT člověka. To potvrdil i Matsuki et al. (2004), který identifikoval tuto bakterii u všech zkoumaných dobrovolníků. Také byly dále hojně zastoupeny bifidobakterie druhu *B. catenulatum*, *B. adolescentis* (Matsuki et al., 2004).

Nerovnováha mikroroganismů v trávicím traktu má za následek disbiózu, která se může projevit onemocněním střev. Jednou ze závažných nemocí postihující trávicí trakt je Crohnova choroba. Pro tyto pacienty znamená toto onemocnění postižení na celý život. Jednou z možností léčby je enterální výživa. Ta je typická zejména tím, že obsahuje méně vlákniny, a to přibližně 10 g/den (Lijoi et al., 2009). Díky tomu nejsou postižená střeva příliš zatěžována. Vláknina je ovšem spojována s příznivými účinky (Anderson et al., 2009).

*B. bifidum* je bakterie, která příznivě působí na tělo hostitele (Schiffrin et al., 1997; Ko et al., 1999; Culpepper et al., 2016). U pacientů s chrohnovou chorobou bylo zjištěné snížené



množství mikrobiální diverzity. Zejména je pak snížen počet MO z rodu *Firmicutes* (Willing et al., 2010). Snížené množství celkových mikroorganismů, a tedy i rod *Bifidobacterium* sp., může způsobit nerovnováhu střevní mikrobioty. V našem výzkumu byli zahrnuti dětské pacienti. Z našich výsledků vyplynulo, že ani jeden pacient není osídlen druhem *B. bifidum*. Naopak byly zjištěné bakterie, které nejsou pro hostitele příznivé, jako je *Clostridium perfringens* nebo *Clostridium butyricum*. U těchto pacientů byla využívána léčba nemoci pomocí enterární výživy. Pro výzkum byly odebrány vzorky stolice před nastoupením diety a po 6. týdnech. Po kultivační metodě pomocí selektivních medií, jsme zjistili, že enterární výživa po dobu 6. týdnů způsobila pokles celkových bifidobakterií. Z tohoto hlediska je tedy zřejmé, že enterární výživa nenapomáhá ke kvalitativnímu i kvantitativnímu osídlení střev bifidobakteriemi.

Pro identifikaci vzorků ve výzkumu byla použita metoda kultivace s následnou identifikací MALDI TOF MS. Pro kultivaci byl použit agar, který má být selektivní jen pro druh *B. bifidum* (Pechar et al., 2014). Z následně narostlých kolonií jsme si vytvořili čisté kultury, které jsme nechali identifikovat ve dvou opakování pomocí MALDI TOF MS. Pomocí této metody jsme zjistili, že na tomto agaru narostli jiné druhy bifidobakterií kterými byly *B. adolescentis*, *B. catenulatum* a *B. longum*. Dále na tomto médiu narostly i jiné rody jako byly *Clostridium perfringens*, *Bacteroides faecis* nebo *Anaerococcus vaginalis*. I přes to, že kultivace byla za anaerobních podmínek, MALDI TOF MS identifikovala u některých izolátů i bakterie, které jsou aerobní. Jednalo se o *Staphylococcus epidermis*. Nejvíce byla identifikována *B. adolescentis* a *B. longum*, a to u tří pacientů. Jako jediný přidaný zdroj uhlíku byl mucin. Právě tento zdroj uhlíku dokáže využít pouze druh *B. bifidum*. Důvod, proč na agaru vyrostly i jiné druhy bakterií je zřejmě proto, že odebírané izoláty byly z nízkého ředění (na nejvyšším ředění, kde byly narostlé kolonie). Na petriho miskách byly zbytky stolice a tedy možný další zdroj uhlíku, který mohly bakterie využít pro svůj růst.

V případě WSP Mup agaru, jakožto selektivního média pro rod *Bifidobacterium* sp., byly bakterie narostlé i na vyšším ředění. Proto byla izolace jednotlivých kolonií lépe proveditelná. Množství bakterií se pohybovalo v rozmezí od 3 do 8,51 log KTJ/g vzorku. Pomocí identifikace metodou MALDI TOF MS byly identifikovány podobné druhy bakterií, jako na agaru obsahující mucin. Mezi nejčastější identifikovanou bakterií narostlou na WSP Mup agaru byla *B. catenulatum*, která se nacházela a to u 5 z 11 vzorků.

Identifikace pomocí PCR s druhově specifickými primery také nedekovala *B. bifidum* u žádného z pacientů. Výsledek z kultivace byl tak podpořen i PCR metodou.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověření, zda z rodu *Bifidobacterium* pouze druh *B. bifidum* má schopnost uzilizace mucinu, detekce druhu *B. bifidum* na různých skupinách jedinců rozdělených podle jejich stravovacích návyků a pacientů trpících Crohnovou chorobou, kteří byli léčeni enterární výživou.

I přesto, že se rod *Bifidobacterium* rozšířil o nové druhy jak lidského, tak zvířecího původu, tak pouze druh *B. bifidum* je schopen využít mucin.

Metody detekce byly ovlivněné selektivitou média. Pro stanovení *B. bifidum* se ukázalo, že citlivější metodou je molekulárně-genetický test (PCR), než kultivačně závislé metody s využitím selektivních médií. Pomocí PCR bylo zjištěno, že přítomnost *B. bifidum* bylo prokázáno u 40 % zdravých dárců. V tomto případě neměla rozdílnost stravy žádný vliv na kvalitativní osídlení této bakterie v TT člověka.

U poslední skupiny sledovaných, což byly dětští pacienti trpící Crohnovou chorobou, nebyla prokázána přítomnost *B. bifidum* ani u jednoho sledovaného. Během léčebného postupu pomocí enterární výživy byl zaznamenán pokles celkového rodu *Bifidobacterium*.

## 8 Seznam literatury

Amaretti, A., Bernardi, T., Tamburini, E., Zanoni, S., Lomma, M., Matteuzzi, D., Rossi, M. (2007). Kinetics and Metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 Growing on Glucose, Galactose, Lactose, and Galactooligosaccharides. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 3637-3644.

Amre, D. K., D'Souza, S., Morgan, K., Seidman, G., Lambrette, P., Grimard, G., Israel, D., Mack, D., Ghadirian, P., Deslandres, C., Chotard, V., Budai, B., Law, L., Levy, E., Seidman, E. G., (2007). Imbalances in Dietary Consumption of Fatty Acids, Vegetables, and Fruits Are Associated With Risk for Crohn's Disease in Children. *Am J Gastroenterol*, 102, 2016-2025.

Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*, 67(4), 188-205.

Anhalt, J. P., Fenselau, C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 47(2), 219-225.

Archer, S. Y., Meng, S., Shei, A., Hodin, R. A. (1998). p21WAF1 is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6791-6796.

Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Watanuki, M., Tanaka, R. (2001). Antibacterial effect of fermented milk containing *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* against indigenous *Escherichia coli* infection in mice. *Microbial ecology in health and disease*, 13(1), 16-24.

Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J., Kitaoka, M. (2011). Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 34583-34592.

Balmer, S. E., Wharton, B. A. (1989). Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Archives of Disease in Childhood*, 64(12), 1672-1677.

Bengtson, M. B., Solberg, C., Aamodt, G., Jahnsen, J., Moum, B., Sauar, J., Vatn, M. H. (2009). Clustering in time of familial IBD separates ulcerative colitis from Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 15(12), 1867-1874.

- Bernstein, R. M., Hinde, K. (2016). Bioactive factors in milk across lactation: Maternal effects and influence on infant growth in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American journal of primatology*.
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E., Retetangos, C. (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* 86 Suppl 1, 13-15.
- Biavati B., Castagnoli P., Trovatelli L. D. (1986). Species of the genus *Bifidobacterium* In the feces of human adults. *Microbiologica*, 9: 39-45
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of microbiology*, 50(2), 117-132.
- Binder, H. J., Mehta, P. (1989). Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. *Gastroenterology*, 96(4), 989-996.
- Bizzini, A., Greub, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and infection*, 16(11), 1614-1619.
- Bunešová, V., Joch, M., Musilová, Š., Rada, V. (2017). Bifidobacteria, Lactobacilli and short chain fatty acids of vegetarian and omnivores. *Scientia agriculturae bohemia. Czech University of Agriculture.*, 48, 2017 (1): 47–54
- Bustin, S. (2005). Real-time PCR. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*, 10, 1117-1125. Dostupné z: <<http://gene-quantification.de/bustin-qpcr-review-2005.pdf>>
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American journal of clinical nutrition*, 96(3), 544-551.
- Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Delzenne, N. M. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50(11), 2374-2383.
- Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific reports*, 6.

- Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C., Scardovi V. (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 564-571
- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., Biavati, B. (1994). Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International journal of food microbiology*, 24(1-2), 199-210.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2011). Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*, 149(1), 4-18.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 380-407.
- Culpepper, T., Christman, M. C., Nieves Jr, C., Specht, G. J., Rowe, C. C., Spaiser, Ford, A. L., Dahl, W. J., Girard, S. A., Langkamp-Henken, B. (2016). *Bifidobacterium bifidum* R0071 decreases stress-associated diarrhoea-related symptoms and self-reported stress: a secondary analysis of a randomised trial. *Beneficial microbes*, 7(3), 327-336.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14691-14696.
- De Vries W., Gerbrandy S. J., Stouthamer A. H. (1967). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 136: 415-425
- Delgado, S., Cabrera-Rubio, R., Mira, A., Suárez, A., Mayo, B. (2013). Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microbial ecology*, 65(3), 763-772.
- Derrien, M., E. E. Vaughan, C. M. Plugge, and W. M. de Vos. 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1469-1476.
- Donaldson, M. S. (2000). Metabolic vitamin B12 status on a mostly raw vegan diet with follow-up using tablets, nutritional yeast, or probiotic supplements. *Annals of nutrition and metabolism*, 44(5-6), 229-234.
- Dong X., Xin Y., Jian W., Liu X., Ling D. (2000). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp.nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 119-125

- Duijts, L., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Moll, H. A. (2010). Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics*, 126(1), e18-e25.
- Duncan, S. H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A. M., Flint, H. J., Lobley, G. E. (2007). Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and environmental microbiology*, 73(4), 1073-1078.
- Egan, M., Motherway, M. O. C., Kilcoyne, M., Kane, M., Joshi, L., Ventura, M., van Sinderen, D. (2014). Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium. *BMC microbiology*, 14(1), 282.
- Enck, P., Lange, B., Zimmer, J., Zimmermann, K., Klosterhalfen, S., Frick, J. S. (2009). Maintaining a strict vegan or vegetarian diet changes the colonic microflora. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 47(09), P163.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 297-314.
- Estrada, A., Wilkie, D. C., Drew, M. (2001). Administration of *Bifidobacterium bifidum* to chicken broilers reduces the number of carcass condemnations for cellulitis at the abattoir. *The Journal of Applied Poultry Research*, 10(4), 329-334.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., and Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Pædiatrica* 92, 48–55.
- Felis, G. E., Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology*, 8(2), 44.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69, 1-10.
- Field, C. J. (2005). The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *The Journal of nutrition*, 135(1), 1-4.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes*, 3(4), 289-306
- Fox, J. G., Wang, T. C. (2001). *Helicobacter pylori*—not a good bug after all. *New England Journal of Medicine*, 345(11), 829-832.

Fraga, D., Meulia, T., Fenster, S. (2008). Real-time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, 10-3. Dostupné z <<http://www.ispybio.com/search/protocols/PCR%20protocol49.pdf>>

Franks, A. H., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3336-3345.

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clatke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-547.

Furet, J. P., Kong, L. C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., Mariat, D., Corthier, G., Doré, J., Henegar, C., Rizkalla, S., Clément, K. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery–induced weight loss links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*, 59(12), 3049-3057.

Garibyan, L., Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), e6.

Gavini, F., Cayuela, C., Antoine, J. M., Lecoq, C., Lefebvre, B., Membré, J. M., Neut, C. (2001). Differences in the distribution of bifidobacterial and enterobacterial species in human faecal microflora of three different (children, adults, elderly) age groups. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13(1), 40-45.

Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401.

Giebel, R., Worden, C., Rust, S. M., Kleinheinz, G. T., Robbins, M., Sandrin, T. R. (2010). Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): applications and challenges. *Advances in applied microbiology*, 71, 149-184.

Grönlund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 28(1), 19-25.

Guglielmetti, S., Mora, D., Gschwender, M., Popp, K. (2011). Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome

and improves quality of life—a double-blind, placebo-controlled study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 33(10), 1123-1132.

Hansson, G. C. (2012). Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Current opinion in microbiology*, 15(1), 57-62.

Hattori, M., Sakaki, Y. (1986). Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Analytical biochemistry*, 152(2), 232-238.

Heikkilä, M. P., Saris, P. E. J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 471-478.

Hong, W., Chen, M. (2007). Rapid identification of bifidobacteria in dairy products by gene-targeted species-specific PCR technique and DGGE. *ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES*, 20(12), 1887.

Hou, J. K., Abraham, B., El-Serag, H. (2011). Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *The American journal of gastroenterology*, 106(4), 563-573.

Hrstka, R., Kolářová, T., Michalova, E., Vojtěšek, B. (2013). Development of PCR methods and their applications in oncological research and practice. *Klinicka onkologie: casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*, 27, S69-74.

Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Astals, P., Echevarría, J., Iglesias, J. R., Balbarie, P., Ramón, D., Genovés, S. (2011). Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Applied and environmental microbiology*, 77(4), 1335-1343.

Chichlowski, M., Guillaume De Lartigue, J., Raybould, H. E., Mills, D. A. (2012). *Bifidobacteria* isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 55(3), 321.

Choi, J. H., Lee, K. M., Lee, M. K., Cha, C. J., Kim, G. B. (2014). *Bifidobacterium faecale* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(9), 3134-3139.

Chung, M., Raman, G., Chew, P., Magula, N., Trikalinos, T., Lau, J. (2007). Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Technol Asses (Full Rep)*, 153, 1-186.

Jung, T. H., Park, J. H., Jeon, W. M., Han, K. S. (2015). Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutrition research and practice*, 9(4), 343-349.



- Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D. (2004). MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular biotechnology*, 26(2), 147-163.
- Kahleova, H., Matoulek, M., Malinska, H., Oliyarnik, O., Kazdova, L., Neskudla, T., Skoch, A., Hajek, M., Hill, M., Kahle, M., Pelikanova, T. (2011). Vegetarian diet improves insulin resistance and oxidative stress markers more than conventional diet in subjects with Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 28(5), 549-559.
- Kalliomäki, M., Collado, M. C., Salminen, S., Isolauri, E. (2008). Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *The American journal of clinical nutrition*, 87(3), 534-538.
- Khodayar-Pardo, P., Mira-Pascual, L., Collado, M. C., Martinez-Costa, C. (2014). Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of Perinatology*, 34(8), 599-605.
- Kitaoka, M. (2012). Bifidobacterial Enzymes Involved in the Metabolism of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3(3), 422S-429S.
- Ko, E. J., Goh, J. S., Lee, B. J., Choi, S. H., Kim, P. H. (1999). *Bifidobacterium bifidum* exhibits a lipopolysaccharide-like mitogenic activity for murine B lymphocytes. *Journal of dairy science*, 82(9), 1869-1876.
- Kok, R. G., De Waal, A., Schut, F., Welling, G. W., Weenk, G., Hellingwerf, K. J. (1996). Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3668-3672.
- Kothary, M. H., Babu, U. S. (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *Journal of Food Safety*, 21(1), 49-68.
- Kvietys, P. R., Granger, D. N. (1981). Effect of volatile fatty acids on blood flow and oxygen uptake by the dog colon. *Gastroenterology*, 80(5 pt 1), 962-969.
- Lan, M. S., Batra, S. K., Qi, W. N., Metzgar, R. S., Hollingsworth, M. A. (1990). Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25), 15294-15299.
- Lawrance, I. C., Radford-Smith, G. L., Bampton, P. A., Andrews, J. M., Tan, P. K., Croft, A., Garry, R., Florin, T. H. (2010). Serious infections in patients with inflammatory bowel disease receiving anti-tumor-necrosis-factor-alpha therapy: An Australian and New Zealand experience. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, 1732-1738.

Le, L. T., Sabaté, J. (2014). Beyond meatless, the health effects of vegan diets: findings from the Adventist cohorts. *Nutrients*, 6(6), 2131-2147.

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.

Lijoi, D., Ferrero, S., Mistrangelo, E., Della Casa, I., Crosa, M., Remorgida, V., Alessandri, F. (2009). Bowel preparation before laparoscopic gynaecological surgery in benign conditions using a 1-week low fibre diet: a surgeon blind, randomized and controlled trial. *Archives of gynecology and obstetrics*, 280(5), 713-718.

Liszt, K., Zwielehner, J., Handschur, M., Hippe, B., Thaler, R., Haslberger, A. G. (2009). Characterization of bacteria, clostridia and *Bacteroides* in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54(4), 253-257.

Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome medicine*, 8(1), 51.

LoCascio, R. G., Desai, P., Sela, D. A., Weimer, B., Mills, D. A. (2010). Broad conservation of milk utilization genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as revealed by comparative genomic hybridization. *Applied and environmental microbiology*, 76(22), 7373-7381.

LoCascio, R. G., Niñonuevo, M. R., Kronewitter, S. R., Freeman, S. L., German, J. B., Lebrilla, C. B., Mills, D. A. (2009). A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. *Microbial biotechnology*, 2(3), 333-342.

Locke, G. R., Zinsmeister, A. R., Talley, N. J., Fett, S. L., Melton, L. J. (2000). Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. *The American journal of gastroenterology*, 95(1), 157-165.

Louis, P., Scott, K. P., Duncan, S. H., Flint, H. J. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of applied microbiology*, 102(5), 1197-1208.

Macfarlane, S., E. J. Woodmansey, G. T. Macfarlane. 2005. Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7483-7492.

Madden, J. A. J., Hunter, J. O. (2002). A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 88(S1), s67-s72.

Mai, V., McCrary, Q. M., Sinha, R., Gleit, M. (2009). Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutrition journal*, 8(1), 1.

Marcobal, A., Barboza, M., Froehlich, J. W., Block, D. E., German, J. B., Lebrilla, C. B., Mills, D. A. (2010). Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9), 5334-5340.

Martens, E. C., Lowe, E. C., Chiang, H., Pudlo, N. A., Wu, M., McNulty, N. P., Wade Abbott, D., Henrissant, B., Gilbert, H. J., Bolam, D. N., Gordon, J. I. (2011). Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol*, 9(12), e1001221.

Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M. L., Zoetendal, E. G., Rodríguez, J. M. (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 75(4), 965-969.

Matijašič, B. B., Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Grabnar, I., Avguštin, G., Rogelj, I. (2014). Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *European journal of nutrition*, 53(4), 1051-1064.

Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Oyaizu, H. (1998). Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS microbiology letters*, 167(2), 113-121.

Monteleone, G., Neurath, M. F., Ardizzone, S., Di Sabatino, A., Fantini, M. C., Castiglione, F., Scribano, M. L., Armuzzi, A., Caprioli, F., Sturniolo, G., Rogai, F., Vecchi, M., Atreya, R., Bossa, F., Onali, S., Fichera, M., Corazza, G., Biancone, L., Savarino, V., Pica, R., Orlando, A., Pallone, F. (2015). Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease. *New England Journal of Medicine*, 372(12), 1104-1113.

Morita H, Toh H, Nakano A, Oshima K, Takagi M, Suda W, et al. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium kashiwanohense* JCM 15439(T), Isolated from Feces from a Healthy Japanese Infant. *Genome Announc*. 2015;3:e00255–00215.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.

Nussinovitch, A. (1997). Agar. In *Hydrocolloid Applications* (pp. 1-18). Springer US.

Orrhage, K., and Nord, C. E. (1999). Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatrica*, 88(s430), 47-57.

Palframan, R. J., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2003). Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current issues in intestinal microbiology*, 4(2), 71-75.

Park, J. H., Um, J. I., Lee, B. J., Goh, J. S., Park, S. Y., Kim, W. S., Kim, P. H. (2002). Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cellular immunology*, 219(1), 22-27.

Pechar, R., Rada, V., Parafati, L., Musilova, S., Bunesova, V., Vlkova, E., Killer, J., Mrazek, J., Kmet, V., Svejstil, R. (2014). Mupirocin-mucin agar for selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*. *International journal of food microbiology*, 191, 32-35.

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P. A., Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.

Petersen, C., Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 16(7), 1024-1033.

Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238(4825), 336-341.

Rada, V., Petr, J. (2000). A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*, 43(2), 127-132.

Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in microbiology*, 7.

Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Fernández-García, M., Clara, G., Margolles, A. (2008). Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 74(6), 1936-1940.

Ruengsomwong, S., Korenori, Y., Sakamoto, N., Wannissorn, B., Nakayama, J., Nitisinprasert, S. (2014). Senior Thai fecal microbiota comparison between vegetarians and non-vegetarians using PCR-DGGE and real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol*, 24(8), 1026-33.

Salyers, A. A., S. E. West, J. R. Vercellotti, and T. D. Wilkins. 1977. Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:529-533.

Sanger, F., Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441IN19447-446IN20448.

Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., Moreno, L. A., Veiga, O., Redondo-Figuero, O., Garagorri, J.M., Azcona, C., Delgado, M., Garcia-Fuentes, M., Collado, M.C., Sanz, Y. (2009). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity*, 17(10), 1906-1915.

Scardovi V., Trovatelli L. D. (1965). The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 15: 19-29.

Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J.H., Chen, F., Whitehead, T.R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., Price, N.P., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18964-18969.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543-551.

Sheu, S. J., Chen, H. C., Lin, C. K., Lin, W. H., Chiang, Y. C., Hwang, W. Z., Tsen, H. Y. (2013). Development and application of *tuf* gene-based PCR and PCR-DGGE methods for the detection of 16 *Bifidobacterium* species. *Journal of food and drug analysis*, 21(2), 177-183.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Wakinaka, T., Funeno, Y., Kubota, M., Chaiwangsri, T., Kurihara, S., Yamamoto, K., Kateyama, T., Ashida, H. (2015).  $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes  $\alpha$ -linked N-acetylglucosamine at nonreducing terminus of O-glycan on gastric mucin. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(9), 3941-3948.

Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D. (2002). The genome

sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14422-14427.

Schiffirin, E. J., Brassart, D., Servin, A. L., Rochat, F., Donnet-Hughes, A. (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *The American journal of clinical nutrition*, 66(2), 515S-520S.

Schuster, S. C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods*, 5(1), 16.

Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1), 190-195.

Simpson, P. J., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., Ross, R. P. (2004). The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of microbiological methods*, 57(1), 9-16.

Smith, K., McCoy, K. D., Macpherson, A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. In *Seminars in immunology* (Vol. 19, No. 2, pp. 59-69). Academic Press.

Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H. P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M. L., Beaugerie, L. (2016). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, gutjnl-2015.

Solís, G., de los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, A., and Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 16, 307–310.).

Šaková, N., Olejníková, P., Kaliňáková, A. B., Pangallo, D., Lakatoš, B., Nagyová, K., Alachovičová, M., Birošová, L. (2015). Comparative study of adult Slovak vegetarians and meat-eaters gut microflora. *Journal of Food & Nutrition Research*, 54(3).

Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D. L., Nalin, R., Dore, J., Leclerc, M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental microbiology*, 11(10), 2574-2584.

Taylor, D. N., Blaser, M. J. (1990). The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiologic reviews*, 13, 42-59.

Tissier, H. 1900. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons: état normal et pathologique. Thèse de Paris, 1-253.

Tonstad, S., Butler, T., Yan, R., Fraser, G. E. (2009). Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes care*, 32(5), 791-796.

Toscano, M., De Vecchi, E., Gabrieli, A., Zuccotti, G. V., Drago, L. (2015). Probiotic characteristics and in vitro compatibility. *Ann Microbiol*, 65, 1079-1086.

Tuohy, K. M., Conterno, L., Gasperotti, M., Viola, R. (2012). Up-regulating the human intestinal microbiome using whole plant foods, polyphenols, and/or fiber. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 8776-8782.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 444(7122), 1027-131.

Turroni, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J. H., Zomer, A., Sánchez, B., Bidossi, A., Ferrarini, A., Giubellini, V., Delledonne, M., Henrissat, Coutinho, P., Oggioni, M., Fitzgerald, G. F., Mills, D., Margolles, A., Kelly, D., van Sinderen, D., Ventura, M. (2010). Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19514-19519.

Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., Gueimonde, M., Bellis, G. D., O'Toole, P.W., van Sinderen, D., Marchesi, J.R., Ventura, M. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS one*, 7(5), e36957.

Tuvlin, J. A., Raza, S. S., Bracamonte, S., Julian, C., Hanauer, S. B., Nicolae, D. L., King, A. C., Cho, J. H. (2007). Smoking and inflammatory bowel disease: trends in familial and sporadic cohorts. *Inflammatory bowel diseases*, 13(5), 573-579.

Van der Meulen, R., Adriany, T., Verbrugghe, K., De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD<sup>+</sup> through its growth-associated production. *Applied and environmental microbiology*, 72(8), 5204-5210.

Vazquez-Gutierrez, P., Lacroix, C., Jaeggi, T., Zeder, C., Zimmerman, M. B., Chassard, C. (2015). Bifidobacteria strains isolated from stools of iron deficient infants can efficiently sequester iron. *BMC microbiology*, 15(1), 1.

Veloo, A. C. M., Elgersma, P. E., Friedrich, A. W., Nagy, E., van Winkelhoff, A. J. (2014). The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the

quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(12), O1091-O1097.

Vendrame, S., Guglielmetti, S., Riso, P., Arioli, S., Klimis-Zacas, D., Porrini, M. (2011). Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 12815-12820.

Ventura, M., Turrone, F., Motherway, M. O. C., MacSharry, J., van Sinderen, D. (2012). Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends in microbiology*, 20(10), 467-476. – obrázek bifida

Vlková, E., Medková, J., Rada, V. (2002). Comparison of four methods for identification of Bifidobacteria to the genus level. *Czech journal of food sciences*, 20(5), 171-174.

Voreades N., Kozil A., Weir T. (2014). Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front. Microbiol.* 5:494 10.3389/fmicb.2014.00494

Wagner, M. B., Waite, D. W., Taylor, M. W. (2015). Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Frontiers in microbiology*, 6, 130.

Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parhill, J., Flint, H. J. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME journal*, 5(2), 220-230.

Wall, R., Ross, R. P., Shanahan, F., O'Mahony, L., O'Mahony, C., Coakley, M., Hart, O., Lawlor, P., Quignely, E. M., Kiely, B., S., Fitzgerald, G. F. Stanton, C. (2009). Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *The American journal of clinical nutrition*, 89(5), 1393-1401.

Ward, R. E., Níæonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., German, J. B. (2007). Research Article In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Mol. Nutr. Food Res*, 51, 1398-1405.

Wei, X., Wang, S., Zhao, X., Wang, X., Li, H., Lin, W., Lu, J., Zhurina, D., Li, B., Riedel, C. H. U., Sun, Y., Yuan, J. (2016). Proteomic Profiling of Bifidobacterium bifidum S17 Cultivated Under In Vitro Conditions. *Frontiers in microbiology*, 7.

Weier, H. U., and Gray, J. W. (1988). A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *DNA*, 7(6), 441-447.



WHO/UNICEF. (2016). Infant and young child nutrition. Geneva: Dostupné z: <<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs342/en/>>

Willing, B. P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A. F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J., K., Engstrand, L. (2010). A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology*, 139(6), 1844-1854.

Xia, Q., Cheng, L., Zhang, H., Sun, S., Liu, F., Li, H., Yuan, J., Liu, Z., Diao, Y. (2016). Identification of vaginal bacteria diversity and its association with clinically diagnosed bacterial vaginosis by denaturing gradient gel electrophoresis and correspondence analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 44, 479-486.

Yu, Z., Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, 36(5), 808-813.

Zeng, J., Li, Y. Q., Zuo, X. L., Zhen, Y. B., Yang, J., Liu, C. H. (2008). Clinical trial: effect of active lactic acid bacteria on mucosal barrier function in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 28(8), 994-1002.

Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M. D., Wing, R., Rittmann, E. E., Krajmalnik-Brown, R. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2365-2370.

Zhou, J. S., P. K. Gopal, and H. S. Gill. 2001. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int. J. Food Microbiol.* 63:81-90.

Zilberstein, B., Quintanilha, A. G., Santos, M. A., Pajecki, D., Moura, E. G., Alves, P. R. A., Filho, F. M., Ary, J., De Souza, U., Gama-Rodrigues, J. (2007). Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics*, 62(1), 47-54.

Zimmer, J., Lange, B., Frick, J. S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., Rusch, K., Klosterhalfen, S., Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European journal of clinical nutrition*, 66(1), 53-60.

## 9 Seznam použitých zkratk

AgnB – alfa-N-acetylglucosaminidasa

anti-TNF alfa – anti-nádorový nekrotický faktor

BMI – index tělesné hmotnosti

bp – purification buffer

CECT – Colección Española de Cultivos Tipo

CLA – konjugovaná kyselina linolenová

C<sub>t</sub> – „threshold cycle“

DGGE - Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu

D-glukóza, D-galaktózu, L-fukosu, N-acetylglukosamin a kyselina sialová.

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EC – číslo enzymu

EFG – epidermální růstový faktor

EngBF – endo-alfa-N-acetylgalactosaminidasa

extracelulární glykosidázy - AFCA a engBF

F6PPK – fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy

GABA – gama aminomáselná kyselina

GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal - N-acetyl- $\beta$ -d-glucosamin- $\alpha$ -1,4-D-galactosa

HCl – kyselina chlorovodíková

HMOs – oligosacharidy mateřského mléka

IBS – Syndrom dráždivého tračníku

KMVD – katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

KTJ – kolonie tvořící jednotku

MALDI TOF – hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem

MM – mateřské mléko

MS – hmotnostní spektrometrie

N.D. – nedetekováno

NagBb –  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidasa

NGS – Nová generace sekvenování

PCR – Polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantifikovaná polymerázová řetězová reakce

MRS – Rogosa-Sharpe agar

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina  
RS – resistantní škrob  
SCFA - mastné kyseliny s krátkým řetězcem  
TAE – Tris-acetate-EDTA  
TCA – (kyseliny trichloroctové  
TE – Tris/EDTA pufr  
TGF- $\beta$ 2 – transformujícího růstového faktoru beta 2  
TPY – Trypton kvasinkový agar  
TT – trávicí trakt

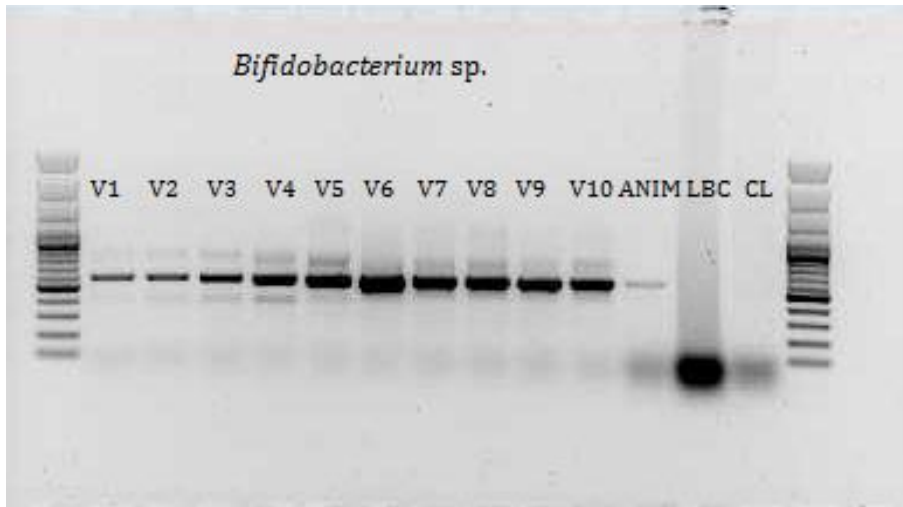
## 10 Přílohy

Příloha č. 1

číslo	zkratka	kmen	označení sbírky	Původ
1	ADOL	<i>B. adolescentis</i>	CCM 4987 (CCUG 18 363)	TT člověka
2		<i>B. adolescentis</i>	DSMZ 20087	bachor (skot)
3		<i>B. adolescentis</i>	DSMZ 20083	TT člověka
4		<i>B. aesculapii</i>	DSMZ 26737	stolice (marmoset)
5	ANIM	<i>B. animalis</i>	CCM 4988 (CCUG 24 606)	výkaly (krysa)
6		<i>B. animalis ssp. animalis</i>	DSMZ 20104	výkal (krysa)
7	LAC	<i>B. animalis ssp. lactis</i>	DSMZ 10140	Jogurt
8		<i>B. asteroides</i>	DSMZ 20089	TT včel
9		<i>B. avesanii</i>	DSMZ 100685	výkal (tamarín pinčí)
10		<i>B. biavatii</i>	DSMZ 23969	výkal (tamarín - opice)
11	3762	<i>B. bifidum</i>	CCM 3762	Stolice
12	BIF	<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521	stolice (dítě)
13		<i>B. bifidum</i>	DSMZ 20215	TT člověka
14		<i>B. bifidum</i>	DSMZ 20239	Neuvedeno
15		<i>B. bifidum</i>	DSMZ 20456	stolice (kojenec)
16		<i>B. bifidum</i>	DSMZ 20082	TT člověka
17		<i>B. bohemicum</i>	DSMZ 22767	TT čmeláka
18		<i>B. bombi</i>	DSMZ 19703	TT čmeláka
19	BB	<i>B. boum</i>	DSMZ 20432	bachor (skot)
20		<i>B. breve</i>	ATCC 15700	TT dítěte
21		<i>B. callitrichos</i>	DSMZ 23973	výkal (kosmanovití - opice)
22	CATEN	<i>B. catenulatum</i>	CCM 4989 (CCUG 18366)	TT člověka
23		<i>B. catenulatum</i>	DSMZ 16992	stolice (člověk)
24		<i>B. coryneforme</i>	DSMZ 20216	TT včel
25		<i>B. cuniculi</i>	DSMZ 20435	stolice (králík)
26		<i>B. dentium</i>	DSMZ 20436	zubní kaz
27		<i>B. eulemuris</i>	DSMZ 100216	stolice (lemur)
28		<i>B. gallicum (ETH)</i>	DSMZ 20093	TT člověka
29	GALL	<i>B. gallinarum</i>	DSMZ 20670	slepé střevo (kuře)
30		<i>B. hapali</i>	DSMZ 100202	stolice (marmoset)
31	CHOER	<i>B. choerinum</i>	DSMZ 20434	výkal (sele)
32		<i>B. indicum</i>	DSMZ 20214	TT včel
33		<i>B. kashiwanohense</i>	DSMZ 21854	stolice (dítě-chlapec 1,5 roků staré)

34		<i>B. lemurum</i>	DSMZ 28807	stolice (lemur)
35	INFCC M	<i>B. longum ssp. infantis</i>	CCM 4990 (CCUG 30 512B)	TT člověka
36	INF	<i>B. longum ssp. infantis</i>	ATCC 1793	TT dítěte
37		<i>B. longum ssp. infantis</i>	DSMZ 20090	stolice (dítě)
38		<i>B. longum ssp. infantis</i>	DSMZ 20088	stolice (dítě)
39	LON	<i>B. longum ssp. longum</i>	ATCC 15707	TT člověka
40		<i>B. longum ssp. longum</i>	DSMZ 20219	TT člověka
41		<i>B. longum ssp. suillum</i>	DSMZ 28597	výkal (sele)
42	SUIS	<i>B. longum ssp. suis</i>	DSMZ 20211	výkal (prase)
43		<i>B. magnum</i>	DSMZ 20222	stolice (králík)
44	BM	<i>B. mericucum</i>	DSMZ 6492	bachor (skot)
45		<i>B. minimum</i>	DSMZ 20102	odpadní voda (kejda)
46		<i>B. mongoliense</i>	DSMZ 21395	Kumys
47		<i>B. moukalabense</i>	DSMZ 27321	stolice (gorila)
48		<i>B. myosotis</i>	DSMZ 100196	stolice (marmoset)
49		<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSMZ 20438	stolice (dítě)
50	BPG	<i>B. pseudolongum ssp. globosum</i>	DSMZ 20092	bachor
51	BPP	<i>B. pseudolongum ssp. pseudolongum</i>	DSMZ 20099	výkal (prase)
52		<i>B. psychraerophilum</i>	DSMZ 22366	slepé střevo (prase)
53	PULL	<i>B. pullorum</i>	DSMZ 20433	výkal (kuře)
54		<i>B. ramosus</i>	DSMZ 100688	stolice (tamarín pinčí)
55		<i>B. reuteri</i>	DSMZ 23975	stolice (marmoset)
56	BR	<i>B. ruminantium</i>	DSMZ 6489	bachor (skot)
57		<i>B. saeculare</i>	DSMZ 6531	stolice (králík)
58		<i>B. saguini</i>	DSMZ 23967	výkal (tamarín - opice)
59		<i>B. scardovii</i>	DSMZ 13734	lidská krev
60		<i>B. stellenboschense</i>	DSMZ 23968	výkal (tamarín - opice)
61		<i>B. stercoris</i>	DSMZ 24849	stolice (člověk- muž, 27 let)
62		<i>B. subtile</i>	DSMZ 20096	odpadní voda (kejda)
63	PORC	<i>B. thermacidophilum ssp. porcinum</i>	DSMZ 17755	výkal (sele)
64		<i>B. thermacidophilum ssp. thermacidophilum</i>	DSMZ 15837	odpadní voda
65	BT10	<i>B. thermophilum</i>	DSMZ 20210	výkal (prase)
66	BT12	<i>B. thermophilum</i>	DSMZ 20212	bachor (skot)
67		<i>B. tissieri</i>	DSMZ 100201	stolice (marmoset)

Příloha č. 2: Ukázka PCR testu



V1-V10 – vzorek pocházející od vegetariánských dárců (10 vzorků)  
ANIM – *B. animalis* ssp. *lactic*  
LCB – *Lactobacillus*  
CL – *Clostridium* sp.