

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Sabina Hulová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Rod *Desulfovibrio* a jeho vliv na trávicí trakt
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Sabina Hulová
Osobní číslo: C19228
Studijní program: B3912 Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Zdravotní laborant
Téma práce: Rod *Desulfovibrio* a jeho vliv na trávicí trakt
Téma práce anglicky: The *Desulfovibrio* Genus And Its Effect On The Digestive Tract
Zadávající katedra: Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování

1. Charakterizujte bakteriální rod *Desulfovibrio*.
2. Popište jejich vliv na trávicí trakt člověka.
3. Uveďte laboratorní diagnostiku rodu *Desulfovibrio*.
4. Charakterizujte možná onemocnění a nastiňte možnosti léčby.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Sabina Hulová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Mé vřelé poděkování patří paní Ing. Květě Koryčanové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost při konzultacích a odborné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli, kteří byli mou oporou po celou dobu tvorby této práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá rodem *Desulfovibrio* a jeho jednotlivými druhy. Dále jsou v práci popsány onemocnění, u kterých se tato bakterie vyskytuje. Podrobněji jsou zde vypsány možnosti kultivace a některé metody identifikace.

KLÍČOVÁ SLOVA

Desulfovibrio, kultivace, identifikace, onemocnění, antibiotika

TITLE

Desulfovibrio in the digestive tract

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the genus *Desulfovibrio* and its individual species. The thesis also describes the diseases in which this bacterium occurs. The possibilities of cultivation and some methods of identification are also described in more detail.

KEYWORDS

Desulfovibrio, cultivation, identification, disease, antibiotics

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK.....	11
ÚVOD	12
1. Sirné bakterie	13
1.1. Rod <i>Bilophila</i>	13
1.2. Rod <i>Desulfovibrio</i>	14
1.2.1. Zástupci rodu <i>Desulfovibrio</i>	14
1.2.1.1. <i>Desulfovibrio piger</i>	15
1.2.1.2. <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	15
1.2.1.3. <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	16
1.2.1.4. <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	16
1.2.1.5. <i>Desulfovibrio legallii</i>	16
1.2.1.6. <i>Desulfovibrio diazotrophicus</i>	17
1.2.1.7. Druhy <i>Desulfovibrio</i> v přírodě	18
2. Kultivace a identifikace	20
2.1. Kultivace	20
2.1.1. API médium a Strakey's médium	20
2.1.2. Tryptikázo-sójový agar a tryptikázo-sójový bujón	20
2.1.3. Kvasničný extrakt.....	21
2.1.4. Postgate medium	21
2.2. Identifikace.....	21
2.2.1. Barvení dle Grama.....	21
2.2.2. Biochemické testy	22
2.2.3. Molekulárně biologické metody.....	23
2.2.3.3. RFLP PCR (polymorfismus délky restrikčních fragmentů).....	25

2.2.3.4. Multiplexní PCR.....	25
2.2.3.5. Sekvence.....	27
2.3. Hmotnostní spektrometrie.....	28
2.3.1. MALDI (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace)	28
2.3.1.1. Typy využívaných matric	28
2.4. Imunomagnetická separace	30
3. Onemocnění.....	34
3.1. Parkinsonova choroba	34
3.2. Ulcerózní kolitida.....	35
3.3. Crohnova nemoc	36
3.4. Jaterní absces.....	36
4. Testování citlivosti na antibiotika.....	39
4.1. Disková difúzní metoda	39
4.2. Diluční metoda.....	39
4.3. E-test	40
4.4. Výsledky antimikrobiálního testování rodu <i>Desulfovibrio</i>	41
ZÁVĚR	42
POUŽITÁ LITERATURA	43

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Pozitivní výsledek testování přítomnosti desulfoviridinu (Yamazaki et al. 2018)	14
Obrázek 2: Schéma účinku sirovodíku na SRB (včetně <i>D. piger</i>) a další mikrobiální skupiny (Kushkevych et al. 2019)	15
Obrázek 3: Zobrazení <i>D. legalii</i> skenovacím elektronovým mikroskopem (Sayavedra et al., 2021b)	17
Obrázek 4: Viditelné bičíky u <i>D. legalii</i> (Sayavedra et al., 2021b)	18
Obrázek 5: Průběh metody PCR (Alberts, 2001)	23
Obrázek 6: Schéma RFLP – PCR (Vincent et al., 2021)	25
Obrázek 7: Výsledek multiplexní PCR (Loubinoux et al., 2002)	26
Obrázek 8: Schéma identifikace bakterií metodou MALDI (Clark et al., 2013)	29
Obrázek 9: Schéma analýzy metodou MALDI (Clark et al., 2013)	30
Obrázek 10: Průběh imunomagnetické separace (Cudjoe, 1999)	32
Obrázek 11: <i>D. vulgaris</i> (zakřivené tyčky) a Obrázek B: Buňky <i>D. vulgaris</i> přichycené k paramagnetickým kuličkám při pozorování elektronovým mikroskopem (Chakraborty et al., 2011)	32
Obrázek 12: Vlevo: buňky <i>D. vulgaris</i> obarvené akridinovou oranží, vpravo: buňky <i>D. vulgaris</i> obarvené akridinovou oranží navázané na paramagnetické kuličky při pozorování elektronovým mikroskopem (Chakraborty et al., 2011)	33
Obrázek 13: CT sken (šipka znázorňuje kontrastní léze v játrech) (Koyano et al., 2015)	37
Obrázek 14: CT se zvýšeným kontrastem, šipka znázorňuje jaterní absces (Yamazaki et al., 2018)	38
Obrázek 15: Gramnegativní spirálovité bakterie v tekutině z abscesu (Yamazaki et al., 2018)	38
Obrázek 16: Ukázka výsledku E – testu (Yan et al., 2021)	40
Obrázek 17: Ukázka odečítání MIC (minimální inhibiční koncentrace) (autor, 2022)	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Výskyt zástupců rodu <i>Desulfovibrio</i> v přírodě (Boone et al., 2001).....	18
Tabulka 2: Výsledky biochemických testů u jednotlivých druhů desulfovibrií (Warren et al., 2005a)	22
Tabulka 3: Obecné vlastnosti genomu <i>D. gigas</i> (Morais-Silva et al., 2014).....	27
Tabulka 4: Obecné vlastnosti plazmidu <i>D. gigas</i> (Morais-Silva et al., 2014).....	28
Tabulka 5: Seznam běžně používaných matric pro metodu MALDI (Clark et al., 2013).....	29
Tabulka 6: Typy používaných magnetických částic (Cudjoe, 1999).....	31
Tabulka 7: Porovnání dvou případů jaterního abscesu způsobeného rodem <i>Desulfovibrio</i> (Yamazaki et al., 2018).....	38

SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyseliny
CNS	centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein
CT	počítačová tomografie
DA	desulfovibrio agar
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DV	destilovaná voda
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GIT	gastrointestinální trakt
IS	imunitní systém
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MO	mikroorganismy
MPA	Masopeptonový agar
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
SRB	síran redukující bakterie
TSA	Triptikázo – sójový agar
TSB	Triptikázo – sójový bujón

ÚVOD

Síran redukující bakterie jsou všudypřítomné mikroorganismy. Nachází se v přírodě (voda, ropa, bahno atd.) a stejně tak v trávicím traktu lidí či zvířat. Mezi tyto bakterie patří čeleď *Desulfovibrionaceae*, která mimo jiné obsahuje i rod *Desulfovibrio*, kterým se tato práce zabývá. Bakalářská práce uvádí informace o jednotlivých druzích bakterií rodu *Desulfovibrio*, která se nacházejí v trávicím traktu člověka. Jedná se o gramnegativní tyčky, které mohou být jedni z možných původců velmi vážných onemocnění jako je například Crohnova choroba či jaterní absces. Ovšem objevil se také nový druh, který naopak ve střevech pomáhá tím, že fixuje dusík a přeměňuje jej na amoniak, který je z těla následně vyloučen močí.

Cílem této práce je shrnutí poznatků o bakteriálním rodu *Desulfovibrio*, jeho vlivu na trávicí trakt lidí a možnosti identifikace biochemickými testy či jinými identifikačními metodami (PCR, MALDI atd.). Práce zároveň obsahuje nastínění onemocnění spojených s tímto rodem a možnosti testování citlivosti na antibiotika.

1. Sirné bakterie

Jedná se o bakterie, které redukují či oxidují síru nebo síran. Podle toho se také dělí do dvou skupin. Síran oxidující bakterie využívají síru či její anorganické sloučeniny k získání energie. Sirovodík či elementární síra jsou oxidovány na sírany. Během tohoto děje vznikají různé meziprodukty (např. siřičitany či thiosírany) (Schmidt 2019).

Síran redukující bakterie (dále SRB) berou sirné sloučeniny jako elektronové akceptory a uvolňují sirovodík jako vedlejší produkt reakce síranů. Tyto mikroorganismy (MO) se nacházejí především v ústech a ve střevech lidí (někdy také zvířat) (Muyzer a Stams 2008).

Mezi SRB patří čeleď *Desulfovibrionaceae*, která obsahuje 8 popsáných rodů – *Desulfocurvus*, *Lawsonia*, *Halodesulfovibrio*, *Desulfobaculum*, *Maihella*, *Pseudodesulfovibrio* a dva rody klinického zájmu. Jedná se o rody *Bilophila* a *Desulfovibrio* (Sayavedra et al. 2020).

1.1. Rod *Bilophila*

Jsou to gramnegativní tyčky. Bývají asacharolytické a obligátně anaerobní (rostou pouze v prostředí bez kyslíku). Nejvýznamnějším patogenem tohoto rodu je *Bilophila wadsworthia*. Tato bakterie je součástí zdravé střevní mikroflóry. Jakmile se ovšem přemnoží, způsobuje zažívací potíže nebo může poškodit gastrointestinální trakt (GIT). Je spojována s několika infekcemi např. cholecystitidou, sepsí či apendicitidou. (Feng et al. 2017)

Bilophila wadsworthia sice patří do čeledi *Desulfovibrio*, ale neredukuje sírany. K vytvoření sirovodíku využívá taurin (ze žluči). Problém je u lidí, kteří se snaží držet dietu s vysokým obsahem tuku. Při této dietě se v těle zvyšuje sekrece žluči (taurinu) a *Bilophila* má tak dostatek potravy pro své množení. K léčbě této bakterie se osvědčilo používat prebiotika. (Natividad et al. 2018)

1.2. Rod *Desulfovibrio*

Desulfovibrio patří mezi jeden z prvních popsaných rodů SRB. Ze SRB je jedním z nejčastějších, které se nacházejí ve střevech (Warren et al. 2005a). *Desulfovibrio* se řadí do kmene *Proteobacteria*, třídy *Deltaproteobacteria*, řádu *Desulfovibrionales* a čeledi *Desulfovibrionaceae* (Rabus et al. 2015). Jedná se o nefermentující, gramnegativní spirálovité bakterie. Jsou nesporulující a mezofilní, případně některé rody mohou být halofilní (vydrží větší koncentraci NaCl). Většina druhů je pohyblivých, díky bičíku (monotricha), příp. mohou mít i více polárních bičků (lofotricha). *Desulfovibrio* jsou zakřivené tyčinky (vibria) o velikosti 0,5 – 1,5 μm x 2,5 – 10 μm. Oproti rodu *Bilophila* je tento rod citlivý na žluč (Kuever et al. 2015).

Bakterie rodu *Desulfovibrio* obsahují pigment desulfoviridin. Je to enzym (sulfid-reduktáza) redukující siřičitany na trithionáty. (Lee et al. 1973) Díky tomuto enzymu jsou odlišné od ostatních druhů SRB. Přítomnost desulfoviridinu lze ověřit jednoduchým testem. Vatovým tamponkem se setře zkoumaná kolonie a přikápně se NaOH. Výsledek se pozoruje ve tmavém boxu pod UV světlem (vlnová délka 365 nm). Desulfoviridin v zásaditém prostředí fluoreskuje červeně a v kyselém prostředí modrozeleně (Warren et al. 2005a).



Obrázek 1: Pozitivní výsledek testování přítomnosti desulfoviridinu (Yamazaki et al. 2018)

1.2.1. Zástupci rodu *Desulfovibrio*

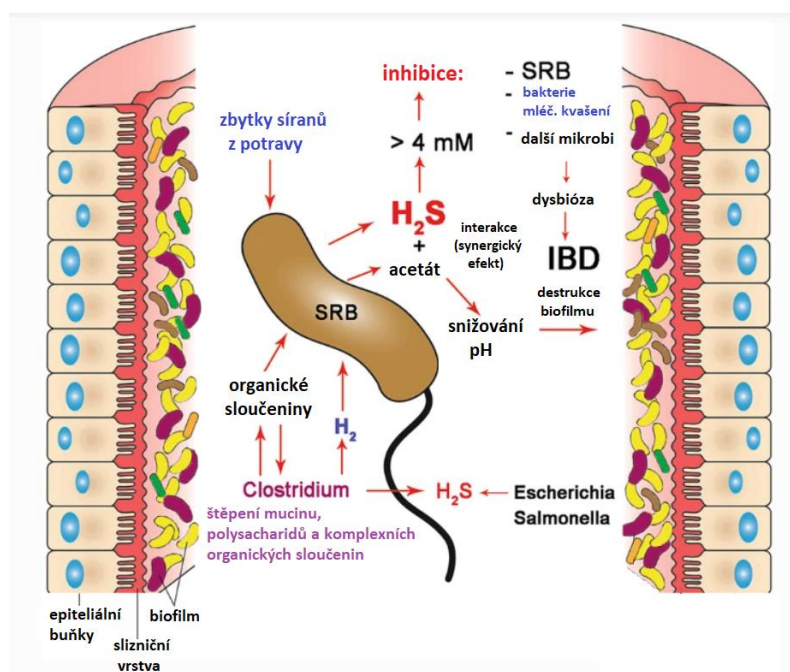
Je známo spousta druhů bakterií rodu *Desulfovibrio*, z toho se pouze některé nachází v trávicím traktu zvířat a lidí. Mezi nejvýznamnější patří *D. desulfuricans*, *D. fairfieldensis*, *D. piger*, *D. vulgaris* (Warren et al. 2005a).

1.2.1.1. *Desulfovibrio piger*

Prvním objeveným zástupcem rodu *Desulfovibrio* byl *Desulfomonas pigra* roku 1976. Následně byl tento druh překlasifikován na *D. piger*, tak jak je známý dnes (Kushkevych et al. 2020). Jedná se o gram-negativní tyčinkovitou bakterii. Je 0,8 – 1,3 μm x 1,2 – 5 μm velká. Oproti ostatním druhům je nepohyblivá (Boone et al. 2001).

D. piger je nejvíce zastoupený druh u lidí. Fyziologicky se nachází ve střevech, ale při střevním zánětlivém onemocnění je přítomna ve vyšších koncentracích. Byl nalezen především u pacientů s ulcerózní kolitidou či Crohnovou chorobou (Kushkevych et al. 2020).

Sirovodík, který si samy SRB produkují, je důležitý faktor pro jejich růst, ale ve vysokých koncentracích pro ně může být toxický. U druhu *D. piger* by se nejvyšší snesitelná koncentrace sirovodíku měla pohybovat v rozmezí 6 – 7 mM (Kushkevych et al. 2019).



Obrázek 2: Schéma účinku sirovodíku na SRB (včetně *D. piger*) a další mikrobiální skupiny (Kushkevych et al. 2019)

1.2.1.2. *Desulfovibrio desulfuricans*

D. desulfuricans má tvar vibria o velikosti 0,5 – 0,8 μm x 1,5 – 4 μm . Má polární bičíky, a díky tomu je pohyblivé. Nachází se, jak u člověka a zvířat, tak v prostředí. Lidské infekce však vyvolává jen ojediněle (bakteriémie) (Boone et al. 2001).

Dokáže produkovat methylrtuť (MeHg), což je silný neurotoxin, proto se s ním při kultivaci musí zacházet opatrně. Methylace rtuti je přeměna Hg^{II} na MeHg (Gilmour et al. 2011).

I když se jedná o anaeroby, byl u tohoto druhu proveden pokus, během kterého byl zjištěn růst při 18 % kyslíku. Při 21 % O₂ došlo k zástavě růstu MO, ale buňky nebyly usmrceny. Znamená to tedy, že *D. desulfuricans* obsahuje enzymy, díky kterým může růst v prostředí s určitým procentem kyslíku (Lobo et al. 2007).

Co se týče podmínek růstu, bylo dokázáno, že snese 0 – 3% NaCl. Teplota kultivace by se měla pohybovat v rozmezí 30 – 37 °C a pH 6,8 – 8,2 (optimálně pH 7,8). (Gilmour et al. 2011)

1.2.1.3. *Desulfovibrio fairfieldensis*

D. fairfieldensis se vyskytuje pouze u lidí. Tento MO je zakřiveného tvaru, nesporulující a díky bičíkům pohyblivý. Má vyšší patogenní potenciál a zároveň největší antimikrobiální rezistenci oproti ostatním druhům (Pimentel a Chan 2007). Je pozitivní na katalázu a redukci dusičnanů. A naopak negativní na oxidázu, indol, ureázu a nefermentuje glukózu (Pimentel a Chan 2007).

1.2.1.4. *Desulfovibrio vulgaris*

D. vulgaris je zahnutá tyčinka o velikosti 0,5 – 0,8 μm x 1,5 - 4 μm. Díky polárnímu bičíku se jedná o pohyblivou bakterii (Boone et al. 2001). Je spojen s intraabdominálními infekcemi (Goldstein et al. 2003a).

Jedná se o oportunní patogen. Nachází se ve střevech lidí, zvířat a také v okolní přírodě např. v plynovodech, ropném poli, spodních vodách atd. Je ubikvitární (všudypřítomný) (Zhou et al. 2013). Způsobuje koroze vrtáků a skladovacích nádrží, ale naopak může mít i pozitivní funkci. Ve vodě dokáže snižovat vysoce rozpustný a toxický Cr^{VI} na méně toxický a méně rozpustný Cr^{III} (Humphries et al. 2004).

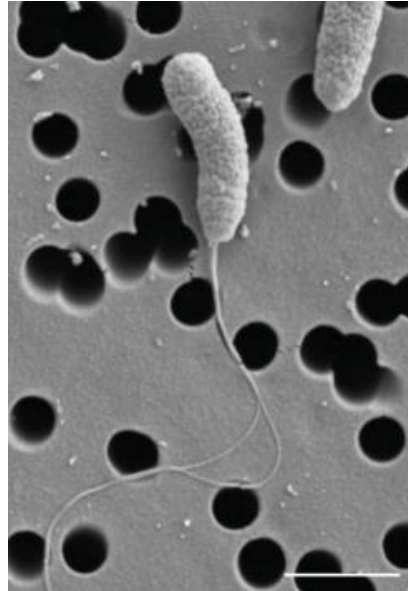
Druh *D. vulgaris* je obligátně anaerobní, což znamená, že snese i určitou koncentraci kyslíku. Maximální snášenlivost kyslíku se pohybuje kolem 0,02 %. V přítomnosti kyslíku byly buňky atypicky prodloužené a růst byl slabší než za anaerobních podmínek. Při opětovném vytvoření anaerobních podmínek se bakteriální růst obnovuje (Ramel et al. 2015).

1.2.1.5. *Desulfovibrio legallii*

D. legallii je druh popsáný roku 2011. Má spirálovitý tvar nebo tvar vibria. Jako ostatní druhy je to nesporulující, gramnegativní anaerobní MO. Má polární bičíky. Oproti výše popsaným druhům nezpůsobuje problémy v gastrointestinálním traktu, ale způsobuje infekce

kloubní náhrady (např. ramene). Předpokladem je, že se *D. legallii* do kloubní náhrady dostává prostřednictvím vody přes porušenou kůži (Vasoo et al. 2014).

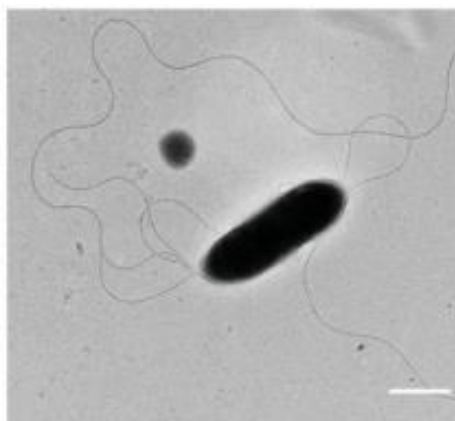
Po 6 dnech anaerobní kultivace kloubní tekutiny na anaerobním CDC agaru s ovčí krví při 35 °C byl prokázán růst kolonií. Kolonie byly cca 1 mm velké, špičaté a čiré. Měly šedozelenou barvu. Při doplňkových testech se ukázalo, že jsou indol negativní a kataláza pozitivní (Vasoo et al. 2014).



Obrázek 3: Zobrazení *D. legallii* skenovacím elektronovým mikroskopem (Sayavedra et al., 2021b)

1.2.1.6. *Desulfotomaculum desulfurans*

Tato bakterie byla nedávno objevena (především u asijské rasy) a je nejpodobnější druhu *D. legallii*. *Desulfotomaculum desulfurans* má tyčinkovitý až spirochetový tvar a dosahuje délky 1,4 – 5 µm. Jedná se o striktní nesporeující anaerob. K respiraci využívá sírany za přítomnosti vodíku, oxidu uhelnatého nebo alkoholu jako donoru elektronů, a tím je schopen fixovat N₂. Je kataláza negativní. Většinou je nepohyblivé, ovšem příležitostně se může jednat o lofotrichu (má 2 a více bičíků na konci těla). Pokud se u něj tedy vyskytují bičíky, jsou tenčí a delší než u *D. legallii* (Sayavedra et al. 2021).



Obrázek 4: Viditelné bičíky u *D. legalii* (Sayavedra et al., 2021b)

Roste při 15 – 46 °C (optimální teplota 37 °C). Při kultivaci snáší 0 – 0,51 M NaCl (nejlépe však 0,068 – 0,171 M NaCl). Na médiu Postgate C roste v černých koloniích – vznikají sraženiny železa (Sayavedra et al. 2021b).

Oproti ostatním druhům desulfovibríí je v těle přínosná, jelikož fixuje dusík (plynný dinitrogen), který je redukován na biologicky dostupný amoniak. Jedná se o novou studii, protože doposud byla fixace dusíku spojena jen s klebsiellou a clostridií (Sayavedra et al. 2020). Případně může být vzniklý N_2 převeden na močovinu a vyloučen močí. Močovina je pro tělo méně toxická než amoniak (Sayavedra et al. 2021).

1.2.1.7. Druhy *Desulfovibrio* v přírodě

Některé druhy rodu *Desulfovibrio* se nacházejí v přírodě. V mnoha případech mohou způsobovat koroze kovových konstrukcí, vrtáků, nádrží, ale mohou mít příznivé účinky, např. vychytávání těžkých kovů z vod (Boone et al. 2001).

Tabulka 1: Výskyt zástupců rodu *Desulfovibrio* v přírodě (Boone et al., 2001)

Druh	Ekotop
<i>D. africans</i>	Studniční voda, slaná voda
<i>D. carbinolicus</i>	Čistírny odpadních vod
<i>D. gigas</i>	Rybniční vody
<i>D. sulfodismutans</i>	Sladkovodní bahno
<i>D. longus</i>	Ropná pole
<i>D. termitidis</i>	Střeva termitů
<i>D. desulfuricans</i>	Půda, odpadní vody

V odpadních vodách způsobují silný zápach síry. V čističkách a kanalizacích způsobují korozi kovů. Druh *D. haliphilus* dokonce snese koncentraci 3 – 18 % NaCl, takže se nachází ve slaných vodách (moře, oceány). V ropných polích, díky produkci H₂S způsobují koroze nádrží či trubek a dochází k okyselení ropy. Dokonce i u oceli může dojít z anaerobní koroze až ke grafítizaci = absolutní ztráta železa (zůstane jen uhlíková vrstva) (Caumette et al. 1991).

Nachází se tedy nejen ve střevech lidí a zvířat, ale také v trávicím traktu termitů. Tam je přítomný druh *D. termitidis*. Má tvar vibria o velikosti 0,4 – 0,5 μm x 1 – 1,4 μm. Je pohyblivý (Boone et al. 2001).

Desulfovibrio desulfuricans v odpadních vodách odstraňuje těžké kovy. Nejlepším zdrojem uhlíku je laktát sodný a sacharóza, a zdrojem síry siřičitan sodný. Bylo zjištěno, že optimální teplota růstu se pohybovala okolo 37 °C. Dále bylo prokázáno, že tento druh dokáže tolerovat Cr⁶⁺ do koncentrace 150 mg/l. Největší účinnost při čištění vody však byla u koncentrace Cr⁶⁺ <30 mg/l (tam byly naměřeny hodnoty účinnosti okolo 100 %). Tento druh může také odstraňovat vodík (z povrchu železa), a tím dále způsobuje korozi kovových materiálů (Li et al. 2019).

2. Kultivace a identifikace

2.1. Kultivace

Tento bakteriální rod bývá izolován např. z krve, moči, apendixu, jater či střev. Většinou se pacientům odebírají 2 hemokultury (aerobní a anaerobní). Díky tomu, že *Desulfovibrio* roste pomalu, vidíme růst nejméně po čtyřech dnech v anaerobní hemokultuře. Při otevření je cítit velice silný zápach sirovodíku (Pimentel a Chan 2007).

Co se týče kultivace na různých médiích, tak jelikož *Desulfovibrio* patří do skupiny anaerobů, roste pouze za nepřítomnosti kyslíku. Tuto atmosféru lze zajistit díky anaerobním nádobám či komoře. Většinou se kultivuje při teplotě 30 – 37 °C po dobu 4 – 7 dní (Pimentel a Chan 2007).

Desulfovibrio obvykle nacházíme ve smíšených koloniích (naroste více mikrobiálních kultur). Jelikož má nehemolytické, průhledné kolonie, jsou snadno přehlédnutelné mezi ostatními koloniemi, případně může být zcela přerostlá jinou bakterií (Warren et al. 2005a).

Tento MO lze kultivovat na Triptikázo – sójovém agaru (TSA), Starkey's agaru, masopeptonovém agaru (MPA), Heart infusion agaru, Stock culture agaru a agaru pro anaeroby. Pomnožení je možné v Triptikázo – sójovém bujónu (TSB), kvasničném extraktu (Iverson 1966).

2.1.1. API médium a Strakey's médium

Tyto půdy slouží k průkazu schopnosti desulfovibrií redukovat sírany. Toto lze ověřit i po uchovávání bakteriální kultury po delší dobu. Kolonie na API médiu mají černou barvu, jejich průměr je cca 1 mm a jsou vypouklé (Iverson 1966).

Starkey's medium obsahuje na litr vody: 15 g tryptonu, 5 g sójového peptonu, 5 g NaCl, 2 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 2 g $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$ a 20 g agaru. Optimální pH je $7,3 \pm 0,1$ (Kluyver a Niel 2022). Síran redukující bakterie na tomto agaru oxidují laktát sodný a redukují sírany na sulfidy. Bakterie rostou ve světlých koloniích, které postupně od okraje černají až jsou úplně černé. Kultivace 2-7 dní anaerobně při laboratorní teplotě nebo 30 °C (Čaderský - Envitek, spol. s.r.o.).

2.1.2. Tryptikázo-sójový agar a tryptikázo-sójový bujón

TSA a TSB slouží jako výživové půdy, které neobsahují žádná selektivní činidla. Jsou tedy vhodné pro růst, množení a uchovávání bakteriálních kultur. Obsahují tryptikázu (1,5 %), fyton (0,5 %), NaCl (0,5 %) a agar (0,5 %) (TSB navíc obsahuje glukózu a K_2HPO_4 jako pufr).

Tento agar má hodnoty pH mezi 7,2 – 7,4. Kolonie na TSB rostou průhledné, až nažedlé barvy o průměru 1 mm. Na TSA se solemi rostou kolonie černé, ale na vzduchu svou barvu postupně ztrácejí a okolo nich zůstává pouze černá halo zóna. (Iverson 1966).

2.1.3. Kvasničný extrakt

Jedná se o výživový agar obsahující především zdroje vitamínů (hlavně vitamín B) růstové faktory a zdroj energie. Tento extrakt ovšem bývá vynecháván, neboť podporuje růst fermentačních bakterií, které by mohly způsobovat interferenci (Boone et al. 2001).

2.1.4. Postgate medium

Existuje několik modifikací Postgate média, která se používají pro kultivaci desulfobirií. Je to Postgate C, Postgate E a Postgate B medium.

Postgate C médium obsahuje 6 g laktátu sodného, 4,5 g Na₂SO₄, 1 g NH₄Cl, 1 g kvasnicového extraktu, 0,5 g KH₂PO₄, 0,3 g citrátu sodného, 0,5 g hydrochloridu L – cysteinu, 0,06g MgSO₄ · 7H₂O, 0,004 g FeSO₄ · 7H₂O, 4 ml resazurinu, 0,04 g CaCl₂ · 2H₂O a 15 g agaru na 1 litr destilované vody (DV). Toto médium bylo upraveno na pH 7,5 ± 1 pomocí 5 M HCl a následně sterilizováno v autoklávu (Sayavedra et al. 2021).

Kultivace probíhá 14 dní při 37 °C. Např. *Desulfobrio diazotrophicus* zde roste v černých koloniích. Pokud chceme tuto bakterii dlouhodobě skladovat, musí se ještě dvakrát překultivovat a následně uchovávat v anaerobních zkumavkách při – 80 °C (Sayavedra et al. 2021).

Postgate E medium je složeno z 1 g Na₂SO₄, 0,5 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 1 g výtažku z kvasnic, 1 g CaCl₂ · 6 H₂O, 2 g MgSO₄ · 7 H₂O a 0,1 g kyseliny askorbové na 1 litr vody (Kováč a Kushkevych 2017).

Postgate B medium se skládá z 0,5 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 1 g výtažku z kvasnic, 3,5 g laktátu sodného, 2 g MgSO₄ · 7 H₂O, 1 g CaSO₄, 0,1 g kyseliny askorbové a 0,1 g kyseliny thioglykolové na 1 litr vody (Kováč a Kushkevych 2017).

2.2. Identifikace

2.2.1. Barvení dle Grama

Díky tomuto barvení je v mikroskopu rozpoznatelný tvar bakterií, velikost buněk a charakter buněčné stěny (gram-pozitivní bakterie obsahují v buněčné stěně peptidoglykany, zatímco gram-negativní bakterie obsahují peptidy) (Vytřasová et al. 2014).

Připraví se preparát, který se po fixaci barví krystalovou violetí a Lugolovým roztokem. Poté se odbarvuje acetonem, a nakonec se dobarví karbolfuchsinem. Po zaschnutí se na sklíčko kápne imerzní olej a můžeme pozorovat bakterie v mikroskopu při zvětšení 1000x. Pozorujeme tvar bakterií, jejich uspořádání a zbarvení (gram – pozitivní jsou zbarveny modře a gram – negativní růžově). *Desulfovibrio* je tedy růžově zbarveno a pozorujeme tvar vibrií (Kuever et al. 2015).

2.2.2. Biochemické testy

Pro určení daného MO se zjišťuje řada vlastností jako jsou morfologické, mikroskopické a makroskopické znaky. Dále se také určují fyziologické vlastnosti, které lze stanovit jednoduchými biochemickými testy, které jsou založeny na přítomnosti různých enzymů, které MO samy vylučují. Po kultivaci se testy vyhodnotí a porovnávají se s výsledky v diagnostickém softwaru či tabulce. Výhodou těchto testů je, že jsou rychlé, levnější a zvyšují přesnost identifikace neznámého kmene (Vytrásová et al. 2014).

Mezi biochemické testy patří:

- Katalázový test, který slouží pro průkaz produkce enzymu katalázy.
- Důkaz tvorby indolu – identifikace MO, které produkují enzym *tryptophanasu*.
- Schopnost redukce dusičnanů na dusitany.
- Důkaz ureázy – průkaz MO produkujících enzym ureázu.

Tabulka 2: Výsledky biochemických testů u jednotlivých druhů *desulfovibrií* (Warren et al., 2005a)

	Katalázový test	Důkaz tvorby indolu	Schopnost redukce dusičnanů na dusitany	Důkaz ureázy
<i>D. desulfuricans</i>	-	-	+	+
<i>D. fairfieldensis</i>	+	-	+	-
<i>D. vulgaris</i>	-	+	-	-
<i>D piger</i>	-	-	-	-

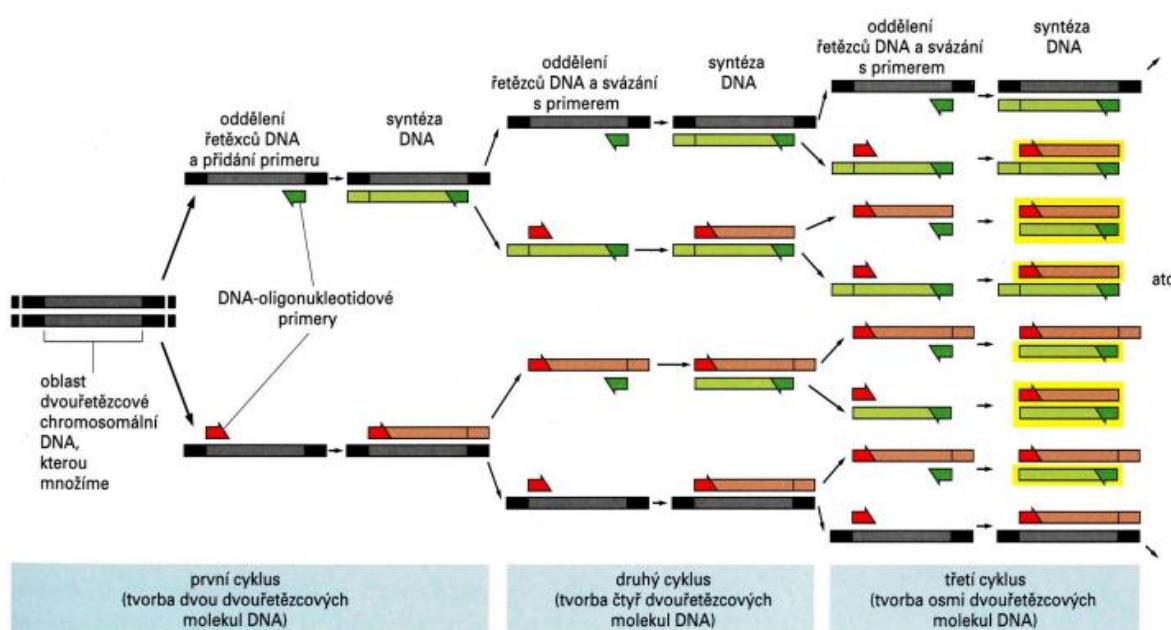
Identifikace MO je možná dle výše zmíněných biochemických metod, ale postupně se od nich ustupuje, protože nejsou tak průkazné. Proto se spíše přistupuje k metodám molekulárně biologickým, imunochemickým či spektrofotometrickým.

2.2.3. Molekulárně biologické metody

2.2.3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Technika je používána k rychlému a vysoce selektivnímu namnožení konkrétní nukleotidové sekvence jakékoliv deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Při kopírování templátové molekuly DNA je využívána DNA-polymeráza. Tuto syntézu řídí primery, které se párují s vláknem původní DNA. PCR je velmi citlivá metoda, neboť dokáže namnožit i velmi malé množství DNA tak, že jsme ho schopni jednoduše detekovat pomocí gelové elektroforézy.

Díky PCR byl zkrácen čas vyšetření klinického materiálu. Tato metoda poskytla zlepšení pracovního postupu a přesnější diagnózy.



Obrázek 5: Průběh metody PCR (Alberts, 2001)

Identifikace rodu *Desulfovibrio* je důležitá, kvůli produkci H_2S , který je při vyšších koncentracích toxický pro buněčné epitely. Pokud se množství sirovodíku v těle zvýší, může docházet k inhibici fagocytózy a indukci hyperproliferace a metabolické abnormality v buňkách epitelu (Christophersen et al. 2011).

Yu a Morrison použili pro buněčnou lýzu 500 mM NaCl, 4 % dodecylsulfátu sodného a 50 mM EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina). Aby nedošlo k degradaci uvolněné DNA, je použit pufr, který ji chrání před DNázami, které jsou velice aktivní. Dále byl přidán octan amonný, který vysrážel dodecylsulfát sodný a zbavil vzorek nečistot (Yu a Morrison 2004).

Nukleové kyseliny byly poté izolovány pomocí isopropanolu. Nakonec byla provedena purifikace genomové DNA na komerčních kolonách. K tomu byla použita proteinkináza K a RNáza.

Při PCR amplifikaci byla provedena počáteční denaturace při 94 °C po dobu 4 minut. Dále došlo k cyklickému střídání 3 kroků: denaturace, annealing a extenze (celkem 30x). Poté se provedla finální extenze neboli závěrečná syntéza po dobu 7 minut při 72 °C.

Vyhodnocení amplifikované DNA bylo dokončeno elektroforeticky v agarózovém gelu při 60 °C po dobu 50 minut (při 82 V).

K první takovéto identifikaci došlo u 57letého muže, kterého trápila bolest břicha se zácpou a zvýšená teplota. Po porovnání získané sekvence v databázi GeneBank byla zjištěna 99,46% shoda s referenčním kmenem *D. desulfuricans* (Nasreddine et al. 2019).

2.2.3.2. Real – Time PCR

Real – time PCR, nebo-li PCR v reálném čase je založena na stejném principu jako klasická PCR. Rozdíl je v tom, že při této metodě se do směsi vzorku přidávají interkalační látky, které mají schopnost fluorescence nebo přímo fluorescenční sondy. Tyto látky se během procesu PCR připojují k řetězcům DNA. Pokud se ve vzorku objeví amplifikovaný templát DNA, dochází k fluorescenčnímu záření. Díky tomu můžeme vidět tvorbu produktů již v průběhu reakce v „reálném čase“. Následná elektroforéza, která se provádí u klasické metody, už není potřeba (Beránek 2016).

Tento typ PCR je citlivější a specifičtější než metoda klasická, ale jsou kladeny velké důrazy na použití kalibračních a referenčních materiálů. Také je zde rychlejší detekce malého množství bakteriální DNA či správná klasifikace Grammova barvení (S.A. Deepak et al. 2007).

Fite a spol. se snažili vytvořit vysoce specifickou sadu PCR primerů. Pro tento výzkum byly odebrány stolice zdravých lidí i pacientů s ulcerózní kolitidou každého věku. Svého cíle dosáhli a výsledkem byla úplná nukleotidová shoda s primery u druhu *D. desulfuricans*, zatímco druh *D. vulgaris* byl ve dvou nukleotidech neshodný.

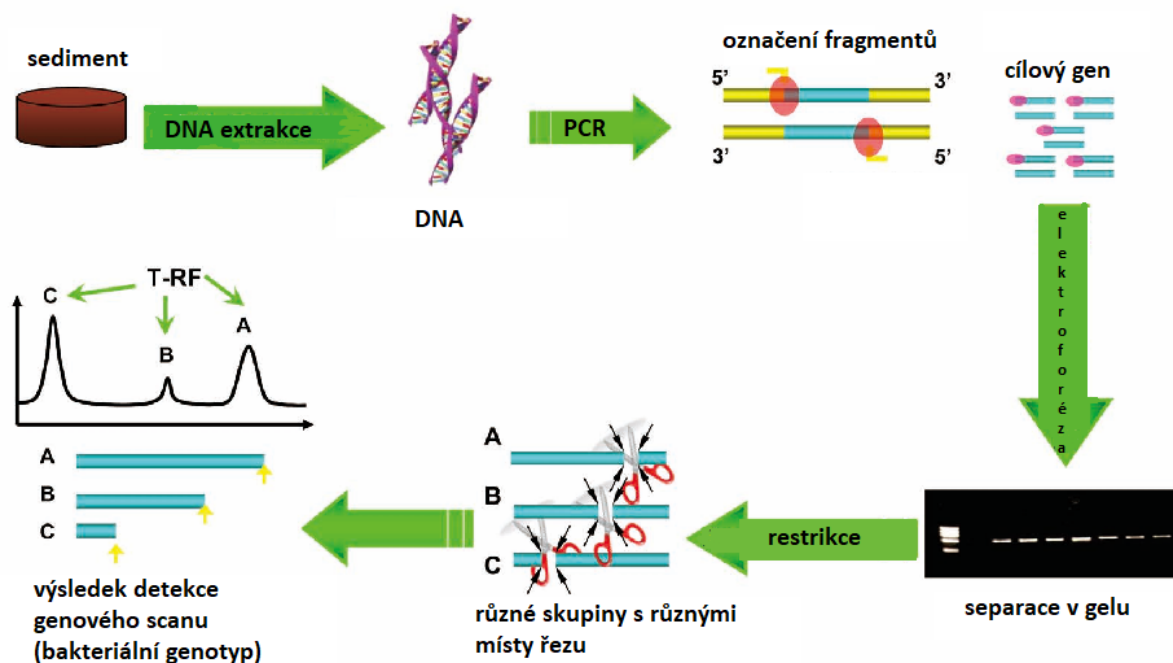
PCR v reálném čase ukázala, že desulfovibria jsou převládajícím rodem ze SRB, které se vyskytují v tlustém střevě. Tyto bakterie jsou všudypřítomné, bez ohledu na věk – pouze u starších lidí jsou ve větším množství (Fite 2004).

2.2.3.3. RFLP PCR (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

Tento typ PCR je založen na principu použití restrikčních enzymů, které štěpí DNA nebo RNA na jednotlivé fragmenty. Následně se provádí gelová elektroforéza na agarózovém gelu.

Håkansson s kolektivem použili tuto metodu na rodu *Desulfovibrio*. Extrakci DNA provedli ze vzorků sliznice tlustého střeva. Jednotlivé geny byly amplifikovány pomocí primerů značených fluorescencí. Používanými primery byly: FAM-ENV₁ (5'-AGA GTT TGA TII TGG CTC AG-3') a ENV₂ (5'-CGG ITA CCT TGT TAC GAC TT-3') (Håkansson et al. 2015).

Amplifikace byla provedena po dobu 3 minut při 95 °C, 3 minut při 94 °C, 30 cyklů po dobu 1 minuty při 94 °C, 45 sekund při 50 °C a 2 minuty při 72 °C. Následovala další extenze při 72 °C (7 minut). Přečištěný PCR produkt byl dále podroben restrikci enzymem: U of the restriction endonucleases MspI. Pak byla provedena gelová elektroforéza, a nakonec použili Southernův blotting. Výsledkem jsou píky u kterých se měří jejich plocha a výška (Håkansson et al. 2015).



Obrázek 6: Schéma RFLP – PCR (Vincent et al., 2021)

2.2.3.4. Multiplexní PCR

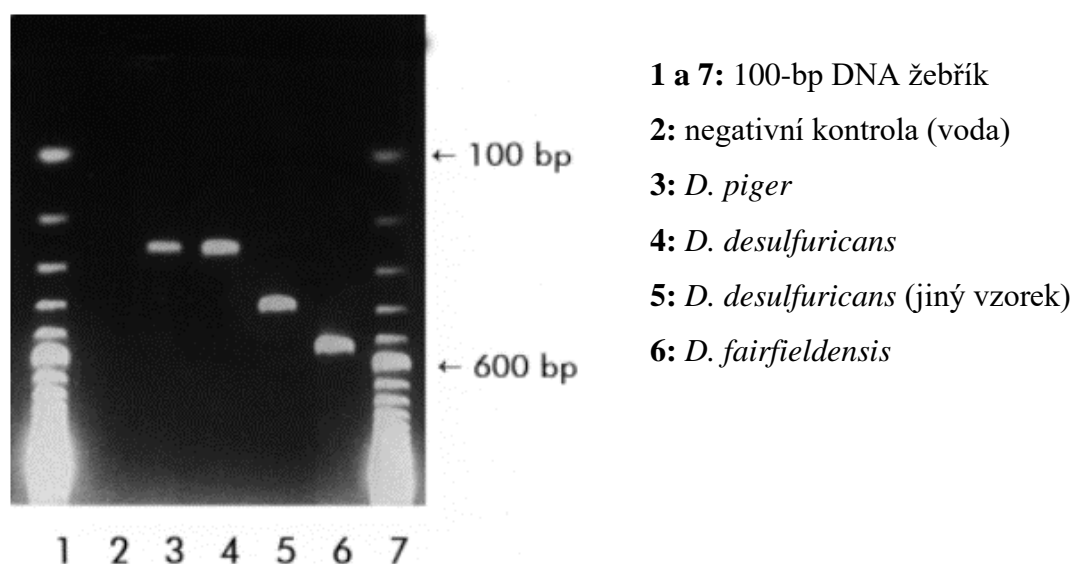
Při multiplexní PCR obsahuje stanovovaná směs více primerů, které generují více ampliconů lišících se délkou. U této metody musí být velmi přísná optimalizace a validace,

kteře lze docílit vhodným výběrem primerů, udržováním teploty při jednotlivých krocích atd. Konečné vyhodnocení se provádí pomocí gelové elektroforézy.

U rodu *Desulfovibrio* se tato metoda zaměřuje na gen 16S DNA. Loubinoux a kolektiv použili tuto metodu za účelem identifikace *D. desulfuricans*, *D. piger* a *D. fairfieldensis* u pacientů s parodontitidou.

Po inkubaci, odstředění a resuspendování získali extrakt DNA a vytvořili reakční směs. Tato směs obsahovala 5 µl extraktu DNA a 0,4 µM každého primeru. Použité primery byly následující: 27K-F (5'-CTG CCT TTG ATA CTG CTT AG-3'), 27K-R (5'-GGG CAC CCT CTC GTT TCG GAG A-3'), Essex-F (5'-CTA CGT TGT GCT AAT CAG CAG CGT AC-3'), Fair-F (5'-TGA ATG AAC TTT TAG GGG AAA GAC-3'), Pig-F (5'-CTA GGG TGT TCT AAT CAT CAT CCT AC-3') a P687-R (5'-GAT ATC TAC GGA TTT CAC TCC TAC ACC-3'), deoxynukleotidy a DNA polymerázu (Loubinoux et al. 2002).

Nejdříve byla provedena počáteční denaturace při 94 °C po dobu 4 minut. Následovalo 30 cyklů denaturace 94 °C (1 min), annealing 55 °C (1 min) a extenze 72 °C (2 min). Nakonec byly výsledné produkty rozděleny elektroforézou. Velikostní marker byl žebříček DNA o velikosti 100 – 600 bp (Loubinoux et al. 2002).



Obrázek 7: Výsledek multiplexní PCR (Loubinoux et al., 2002)

Při této studii bylo zjištěno, že 5 ze 7 pacientů s parodontitidou měli v parodontálních kapsách SRB. Jako nejrozšířenější bakteriální druh u této choroby byl *D. fairfieldensis* (Loubinoux et al. 2002).

2.2.3.5. Sekvenace

Metoda sekvenování je jedna z nejmodernějších a nejpřesnějších způsobů identifikace MO. Díky této metodě získáváme informace o primární struktuře polynukleotidového řetězce (pořadí nukleotidů). Díky tomu je možné vyšetřování genetických chorob nebo různých vlastností bakterií.

Donedávna byla principem elektroforetická separace, která dokázala analyzovat fragmenty DNA, které se mohly lišit klidně jen o jeden nukleotid. Nyní je celá metoda zcela automatizovaná. Během několika hodin je možné vyšetření 800 – 1000 nukleotidů na obou vláčkách DNA.

Nejdříve musí být provedena extrakce genomové DNA ze vzorku. Jako vzorek se používá tkáň nebo sťěr ze sliznic. Extrahovaná DNA je dále resuspendována. Během sekvenace dochází k rozdělení DNA na jednotlivé nukleotidy. Výsledek sekvenace se porovnává s referenčními sekvenacemi v databázi (Beránek 2016).

Morais-Silva s kolektivem pracovali na sekvenaci u druhu *D. gigas*. Díky tomu zjistili informace o jeho složení DNA.

Výsledkem jejich výzkumu bylo, že *D. gigas* obsahuje jeden kruhový chromozom. Ten se skládá z 3 693 899 párů bází, která má 3 370 genů z nichž 3 273 kóduje protein. Zde je uvedená tabulka jako příklad výsledků sekvenace bakteriálního genomu (Morais-Silva et al. 2014).

Tabulka 3: Obecné vlastnosti genomu *D. gigas* (Morais-Silva et al., 2014)

	Hodnota	% z celku
Velikost genomu (bp)	3 693 899	100
DNA kódující oblast (bp)	3 249 714	87,98
Obsah G + C (bp)	2 341 530	63,39
Celkový počet genů	3 370	100
rRNA	3	0,09
tRNA	48	1,42
Geny kódující proteiny	3 273	97,09
Geny bez přiřazené funkce	999	29,64
Průměrná délka genu (bp)	993	
Hustota genů(bp/gen)	1 128	

Dále obsahuje plazmid o velikosti 101 949 párů bází a dále 75 otevřených čtecích rámců, z nichž 72 jsou kódující oblasti (Morais-Silva et al. 2014).

Tabulka 4: Obecné vlastnosti plazmidu *D. gigas* (Morais-Silva et al., 2014)

	Hodnota
Velikost (bp)	101 949
Obsah G + C (bp)	64 081
Geny kódující proteiny	72
Genová hustota (bp/gen)	1 415
Průměrná délka genu (bp)	1 103

2.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, při které dochází k rozkladu molekul na ionty (ionizace). Ionty se dělí podle podílu své hmotnosti a náboje. Následně probíhá detekce v podobě hmotnostních spekter. Touto metodou lze měřit jak kvalitu (identifikace látky), tak i kvantitu (množství látky). Výhodou je vysoká citlivost a minimální spotřeba vzorku.

2.3.1. MALDI (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace)

MALDI byla poprvé uvedena roku 1987. Roku 2002 byla oceněna Nobelovou cenou. Od té doby je tato metoda stále více zdokonalována a zrychlována. Je velice spolehlivá pro charakterizaci různých MO, které jsou v laboratořích vyšetřovány.

Používaným materiálem při této metodě bývají mikrobiální kolonie, ovšem v některých případech lze použít mozkomíšní mok, moč, proteinový extrakt nebo hemokulturu.

2.3.1.1. Typy využívaných matric

Matrice jsou pevné látky krystalické povahy. Musí mít nízký tlak par, aby došlo k jejich snadnému odpaření za vzniku iontů ve vakuu. Důležitými vlastnostmi matric je silná absorpce, stabilita ve vakuu, schopnost ionizovat vzorek a dobrá rozpustnost v rozpouštědlech. Naopak matrice nesmí reagovat se zkoumaným vzorkem.

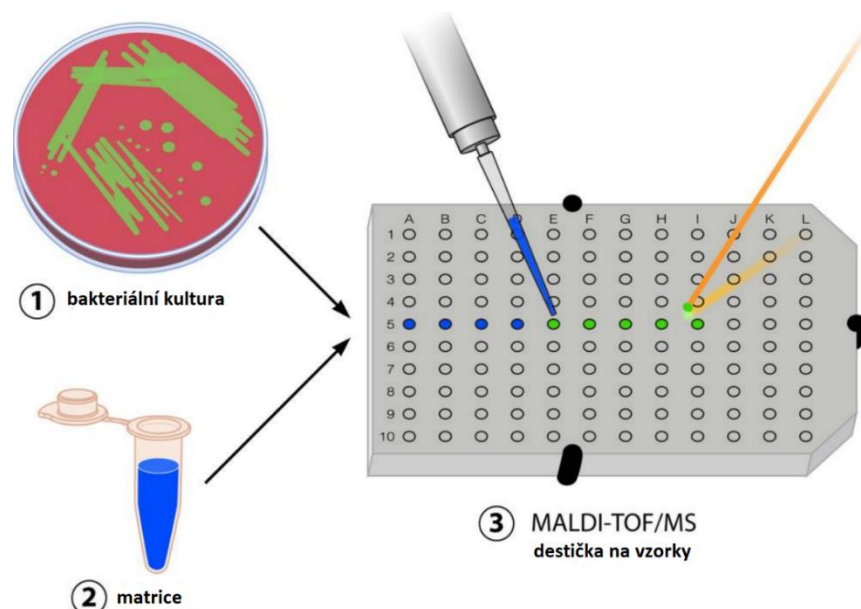
Během měření je matrice v nadbytku a je smíchána se vzorkem. Při ozáření laserem dokáže absorbovat jeho energii, a nakonec způsobí odpaření části substrátu.

Tabulka 5: Seznam běžně používaných matic pro metodu MALDI (Clark et al., 2013)

Matrice	Analyzovaný typ vzorku
Kys. pikolonová, kys. 3-hydroxypikolinová, kys. 3-aminopokolinová	Oligonukleotidy, DNA a biopolymery
3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina	Proteiny
Kys. 2-(-4-hydroxyfenylazo)benzoová	Peptidy, proteiny, glykoproteiny
2-merkaptobenzthiazol	Peptidy, proteiny, syntetické polymery
2,6-dihydroxyacetonfenon	Glykopeptidy, fosfopeptidy
2,4,6-trihydroxyacetofenon	Oligonukleotidy
Kys. A-kyano-4-hydroxyskořicová	Peptidy a triacylglycerol

Před samotným měřením se nejprve ke vzorku inokula musí přidat matrice. Tato směs je promíchána a následně nanese na kovovou destičku. Díky tomu, že je směs vysušena, dochází ke krystalizaci vzorku v matici. Destička se vloží do analyzátoru a začíná měření (Clark et al. 2013).

Krystalky jsou ozářeny pomocí UV laserového paprsku o vlnové délce 337 nm. Ozařování probíhá velmi krátkou dobu, protože by docházelo k nadměrnému zahřívání, a to by mohlo způsobit poškození nebo degradaci vyšetřovaného vzorku. Laserový paprsek se zaměřuje na velmi malý bod o průměru 0,05 – 0,2 mm (Clark et al. 2013).

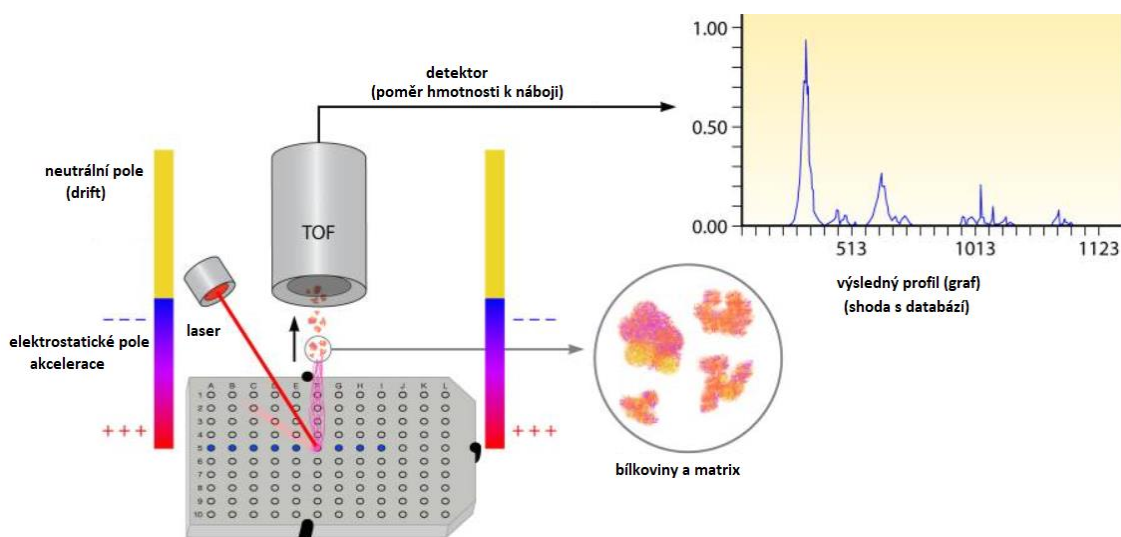


Obrázek 8: Schéma identifikace bakterií metodou MALDI (Clark et al., 2013)

Tím dochází k interakci mezi molekulami v matici a fotony z laseru. Díky energii z paprsku vzniká sublimace matrice i vzorku a poté následuje ionizace. Po ionizaci jsou v hmotnostním analyzátoru analyzovány proteiny vzorku.

Analyzátor nám podá informace o složení vzorku (spektrum a poměr hmotnosti k náboji). Uvažuje se, že získané poměry jsou jedinečné pro každý druh MO.

Software tedy vygeneruje profil zkoumaného materiálu. Tento profil je porovnáván v databázi s referenčními spektry. Následně je přiřazen ke zcela stejnému nebo nejpříbuznějšímu profilu a tím je dokončena identifikace daného MO.



Obrázek 9: Schéma analýzy metodou MALDI (Clark et al., 2013)

2.4. Imunomagnetická separace

Imunomagnetická separace je další možnou metodou ke stanovení bakteriálního druhu *Desulfovibrio*. Jedná se o vysoce efektivní metodu, která se používá pro izolaci jednoho MO z heterogenní bakteriální kultury.

Separace může být pozitivní, kdy se na povrch magnetických částic naváže požadovaný MO, který je za pomoci magnetu přenesen do čisté zkumavky. Nebo může jít o negativní separaci, kdy se na částice navážou všechny ostatní druhy a zkoumaný MO zůstane ve zkumavce.

Mezi výhody této metody patří jednoduché použití či nízké nároky na vybavení. Naopak nevýhodou je těžká izolace komplexních fenotypů (Tajti et al. 2021).

Při imunomagnetické separaci je používána spousta typů magnetických částic. Tyto částice by měly být paramagnetické nebo superparamagnetické, protože takové částice se k sobě navzájem nepřitahují.

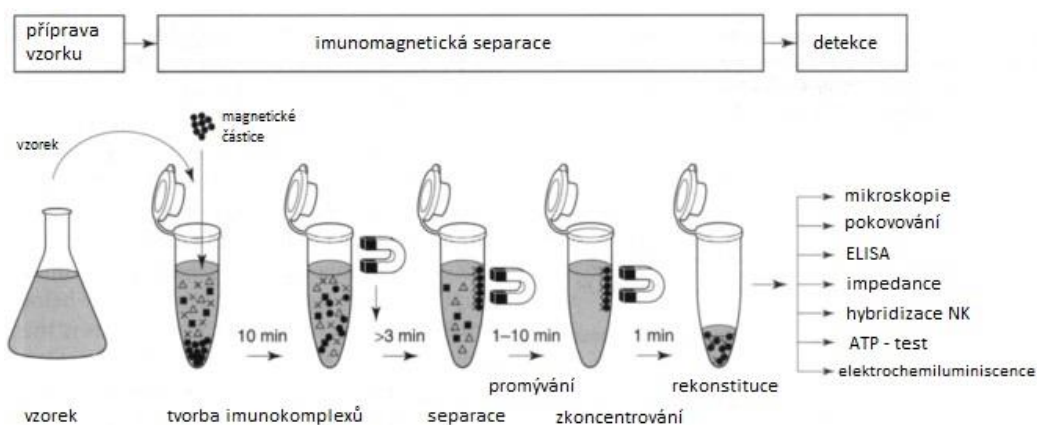
Tabulka 6: Typy používaných magnetických částic (Cudjoe, 1999)

Částice	Velikost (μm)	Výrobce
Biomag 4300: silanizovaný magnetický oxid železa	0,5 – 1,5	Metachem Diagnostics Ltd, Northampton, UK
Polystyrenové paramagnetické mikročástice	1 – 2	Polysciences Ltd, Northampton, UK
Magnetické částice polyakroleinu/oxidu železa	1 - 10	Scipac, Sittingbourne. UK
Polystyren/divinylbenzen	0,7	Sepadyn, Indianapolis, USA
Dynabeads (polystyren)	2,8 nebo 4,5	Dynal A/S, Oslo, Norsko

Metodou imunomagnetické separace se zabýval např. Chakraborty a kolektiv, kteří se zaměřili na separaci životaschopných buněk. Konkrétně na *D. vulgaris*.

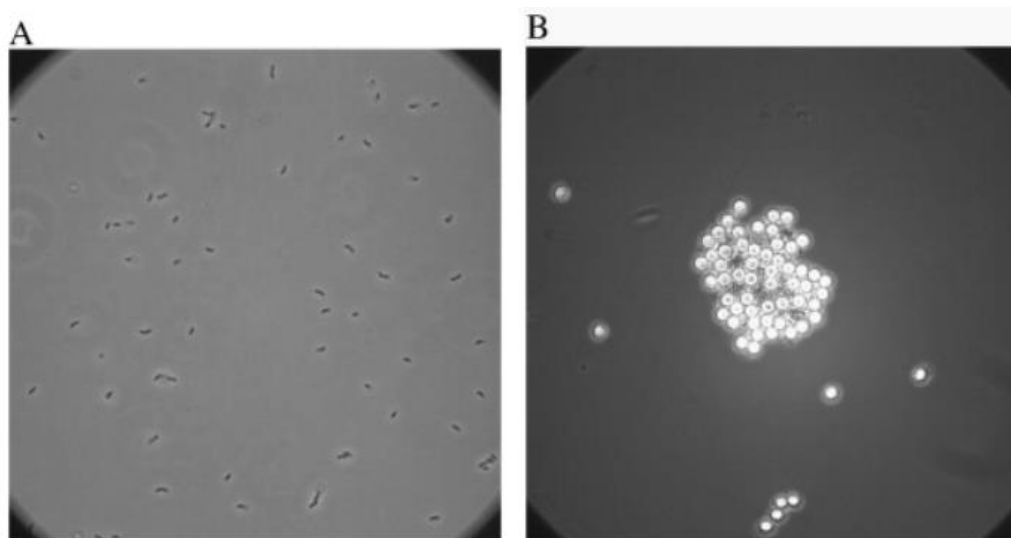
Chakraborty s kolektivem nejprve laboratorní buňky anaerobně kultivoval při 30 °C. Z těchto buněk byl získán povrchový antigen O – vzorek byl centrifugován 10 minut a poté resuspendován v roztoku PBS (pufovaný fyziologický roztok). Byla získána suspenze s obsahem buněk 10⁹/ml, která byla zahřívána 5 minut pro uvolnění a degradaci bičíkových proteinů.

Po přidání vzorku k paramagnetickým částicím dochází k tvorbě vazby mezi těmito částicemi a bakteriální buňkou. Na částicích se nachází specifické protilátky, namířené proti antigenním částicím dané buňky. Následuje inkubace a poté je vzniklý komplex separován za použití magnetu. Částice jsou promývány a nakonec zkoncentrovány. Takto jsou připraveny k dalším metodám jako jsou: mikroskopie, elektrochemiluminiscence či ELISA.



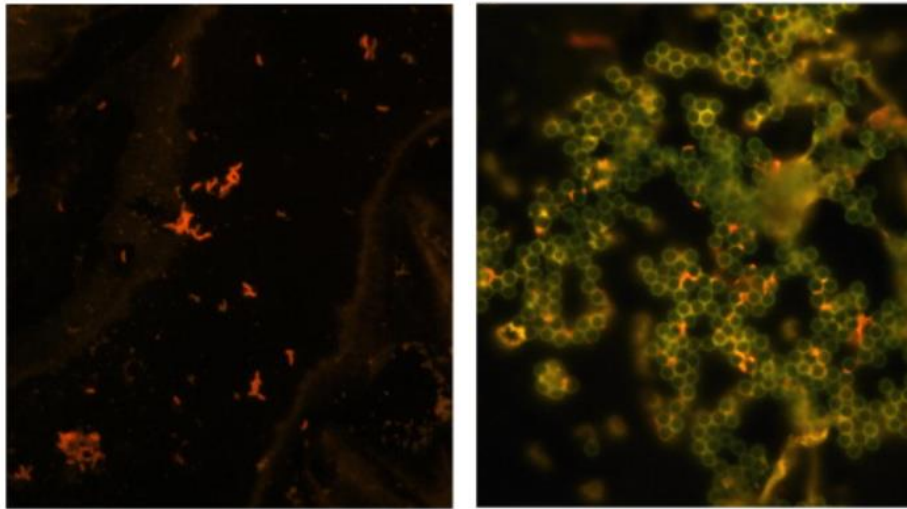
Obrázek 10: Průběh imunomagnetické separace (Cudjoe, 1999)

Zkoumané laboratorní buňky se při pozorování elektronovým mikroskopem jeví jako zakřivené tyčinky (obr. A). Po přidání paramagnetických kuliček se streptavidinem se buňky nacházely pouze připojené k těmto kuličkám (obr. B) (Chakraborty et al. 2011).



Obrázek 11: *D. vulgaris* (zakřivené tyčky) a Obrázek B: Buňky *D. vulgaris* přichycené k paramagnetickým kuličkám při pozorování elektronovým mikroskopem (Chakraborty et al., 2011)

Vzorky z životního prostředí byly nakonec obarveny akridinovou oranží. Bylo možné pozorovat zakřivený tvar vibrií (obr. A), což naznačuje, že imunomagnetická separace byla provedena správně. Po přidání paramagnetických kuliček opět vidíme navázané buňky na tyto kuličky (obr. B) (Chakraborty et al. 2011).



*Obrázek 12: Vlevo: buňky *D. vulgaris* obarvené akridinovou oranží, vpravo: buňky *D. vulgaris* obarvené akridinovou oranží navázané na paramagnetické kuličky při pozorování elektronovým mikroskopem (Chakraborty et al., 2011)*

3. Onemocnění

Některé druhy rodu *Desulfovibrio* jsou součástí různých lidských onemocnění. Bakterie se mohou v těle vyskytovat bez příznaků (např. jako součást střevní mikroflóry) nebo mohou být spojeny s bakteriemi či břišními infekcemi. Tyto infekce zahrnují třeba ulcerózní kolitidu, parodontitidu, Crohnovu nemoc nebo Parkinsonovu chorobu (Goldstein et al. 2003b)

Zánětlivá onemocnění střev se dělí na 2 typy: Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. U těchto nemocí nebyla zjištěna přesná příčina. Pro léčbu jsou používána antibiotika. To nasvědčuje tomu, že příčinami by mohly být bakterie. Mezi dominantní druhy SRB ve střevě patří právě rod *Desulfovibrio*, který společně s dalšími MO vytváří biofilmy (např. s *Bacteroides*, *Escherichia*, *Clostridium* a *Pseudomonas*) (Kushkevych et al. 2020).

Bakteriální biofilmy jsou společenstva bakterií. Můžou obsahovat pouze jeden druh bakterie nebo, jak již bylo řečeno, může to být více bakteriálních druhů. Rod *Desulfovibrio* tvoří převážně biofilmy s dalšími MO. Tvorba takového biofilmu probíhá ve dvou krocích: adheze a fáze zrání. Při adhezi bakterie přilnou k povrchu buněk či sliznic a následně, ve fázi zrání, dochází k jejich diferenciaci. Tvorba biofilmu zvyšuje závažnost onemocnění (složitější léčba) (Srivastava et al. 2017).

Při vyšší koncentraci desulfovibrií ve střevech dochází k nadměrné produkci sirovodíku. Tato látka je pro tělo velmi toxická, mutagenní a může zvyšovat riziko pro vznik rakoviny. Sirovodík je také důležitým ukazatelem nemoci, jelikož je detekovatelný ve stolici pacientů. Ovšem pokud dojde ke zvýšení koncentrace sirovodíku nad 6 mmol/l, zastavuje se i množení desulfovibrií, ale jejich metabolismus je jen zpomalen (Kushkevych et al. 2020).

Obě onemocnění, Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, mají podobné symptomy. Patří mezi ně především bolest břicha spojená s průjmem, častou příměsí bývá také krev. Kvůli tomu také dochází ke ztrátě na váze. Díky tomu všemu zažívá pacient určitý diskomfort. Příznaky nejsou úplně charakteristické, proto často dochází k zanedbání léčby ze strany pacienta a k lékaři dochází až v pokročilých stádiích nemoci (Kushkevych et al. 2020).

3.1. Parkinsonova choroba

Jedná se o neurodegenerativní onemocnění nervové soustavy. Pacient postupně není schopen ovládat či kontrolovat pohyb. Postihuje většinou starší osoby. Nemoc byla popsána v roce 1817 lékařem Jamesem Parkinsonem. Co se týče příčiny tohoto onemocnění, jedná se zatím stále jen o domněnky (přesná příčina je neznámá). Příčina může tkvít v genetické

predispozici (mutace genů), ve vlivech z vnějšího prostředí, působení toxických látek (těkavé látky, ředidla) či ve střevní mikroflóře.

U všech pacientů s touto chorobou byl nalezen rod *Desulfovibrio*, ovšem ve vyšší koncentraci než u zdravých lidí. *Desulfovibrio* produkuje sirovodík, lipopolysacharid a některé druhy syntetizují magnetit (Murros et al. 2021).

Sirovodík je difúzní plyn, je tedy rozpustnější než CO₂ či O₂. Tato vlastnost mu umožňuje vstupovat do krevního řečiště přímo ze střeva. Snížené množství sirovodíku ovlivňuje buněčnou signalizaci, a naopak zvýšené množství způsobuje toxicitu, dysfunkce centrálního nervového systému (CNS) a v nejhorším případě i smrt (Guo et al. 2016).

Všechny rody také způsobují agregaci α -synukleinu. Bakterie *Desulfovibrio* se nachází ve vrstvě hlenu v tlustém střevě. Díky tomu jsou enteroexokrinní buňky, nacházející se v blízkosti tohoto hlenu, citlivé na toxické látky (Murros et al. 2021).

Konkrétně druh *Desulfovibrio desulfuricans* produkuje magnetit. Tato látka také urychluje agregaci α -synukleinu, za vzniku toxických struktur v nervových buňkách. Nanočástice magnetitu mohou být absorbovány střevními buňkami a dostávají se tak do krevního řečiště (Murros et al. 2021).

Mezi symptomy patří zácpa, křeče, pocit únavy či problémy se spaním. Poté dochází ke zpomalení chůze či zhoršení mimiky. Pacienti přestávají cítit a vnímat chuť. Nemusí docházet hned k postižení celého těla, z počátku se to může týkat pouze jedné končetiny. Díky těmto příznakům mohou mít pacienti problémy v běžném životě – neobratnost, problém s komunikací, nebo mohou působit až zvláštním dojmem, ale přesto mohou být velmi inteligentní (DeMaagd a Philip 2015).

3.2. Ulcerózní kolitida

Jedná se o záněty a vředy v tlustém střevě. Většinou jsou poškozeny epiteliální buňky nebo jsou zde přítomny abscesy krypt a akumulace neutrofilů. Příčina této nemoci je neznámá, pravděpodobně souvisí s abnormální střevní mikroflórou (např. vyšší hladina desulfovibrií) (Watanabe et al. 2007).

Uvažuje se, že možnou příčinou může být porucha imunitního systému (dále IS) – imunita útočí na bakterii a napadá i buňky trávicího traktu. U tohoto onemocnění by mohla hrát roli i dědičnost. Mezi příznaky ulcerózní kolitidy patří průjem (s krví) s tím spojená rektální bolest, krvácení z konečníku, úbytek na váze, únava horečka, atd. (Yu a Rodriguez 2017).

3.3. Crohnova nemoc

Mezi zánětlivé střevní onemocnění patří nejen ulcerózní kolitida, ale také Crohnova choroba. Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění střev. U pacientů se nalézají skupinové léze či zánět. Tato nemoc postihuje celý GIT od úst po konečník (může postihnout jen nějakou část) (Feuerstein a Cheifetz 2017) .

Příznaky jsou obdobné jako u ulcerózní kolitidy. Jedná se o průjem (může být mísen s krví), bolesti břicha, zvracení a nevolnost. Důsledkem může být úbytek svalové hmoty. Někteří pacienti udávají bolest hlavy spojenou se zvýšenou teplotou nebo zimnicí (Feuerstein a Cheifetz 2017).

Předpokládá se, že na vzniku zánětlivých procesů se podílí autoimunita. Příznaky humorální autoimunity je možné vyšetřit pomocí nepřímé fluorescence (Roggenbuck et al. 2013).

Nedávno byl objeven glykoprotein 2 jakožto hlavní autoantigen. Jeho exprese byla prokázána v místě střevního zánětu. U glykoproteinu 2 bylo také prokázáno, že se jedná o specifický receptor střevních buněk – Peyerovy pláty. Právě tyto střevní buňky byly vyhodnoceny jako původní místo zánětu Crohnovy choroby. Glykoprotein 2 plní funkci specifického markeru tohoto onemocnění (Roggenbuck et al. 2013).

Aby bylo onemocnění detekováno, podstupují pacienti endoskopické a radiologické vyšetření (Feuerstein a Cheifetz 2017). Poslední dobou se pro diagnostiku osvědčila také magnetická rezonance pro zhodnocení poškození tenkého střeva, neboť endoskopie je zde špatně přístupná. Magnetická rezonance poskytuje kontrastní snímky, díky kterým lékař velice podrobně vidí strukturu střevní stěny a dokáže rozeznat zánět (Westerland a Griffin 2016) .

Na základě těchto výsledků je pacientům diagnostikována Crohnova choroba a může být zahájena léčba (Feuerstein a Cheifetz 2017). Nemocným jsou nasazena farmaceutika. Léky jsou vybírány podle závažnosti onemocnění a také dle základního fenotypu. U většiny pacientů léčba není moc účinná a musí podstoupit chirurgický zákrok. Bohužel i po operaci je možná recidiva onemocnění, a proto je důležitá i pooperační terapie (Feuerstein a Cheifetz 2017).

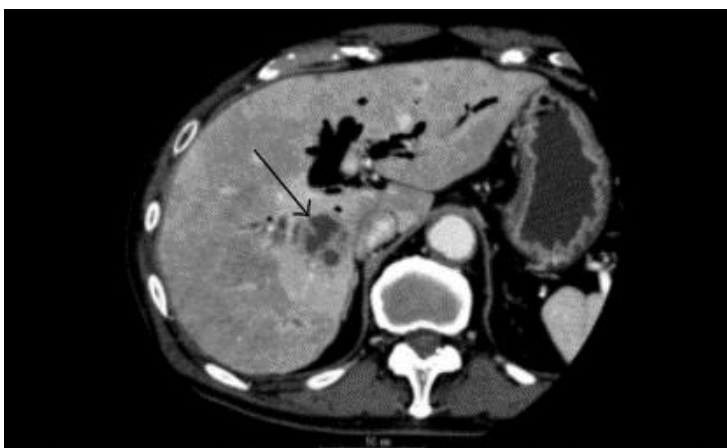
3.4. Jaterní absces

Jaterní absces je vlastně ohraničený hnis v játrech. Může se vytvořit dvěma způsoby, buď to z poranění nebo kvůli intraabdominálním infekcím, které se šíří přes portální oběh (Akhondi a Sabih 2022).

Mezi nejčastější bakterie způsobující jaterní absces patří *E. coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus* či *Staphylococcus*. Samozřejmě i anaerobní rod *Desulfovibrio* může být příčinou. Problémem je, že u tohoto druhu není jednoduchá identifikace a lékař by měl s touto možností počítat. Při neléčeném abscesu může dojít k jeho prasknutí, a to způsobí peritonitidu a šok. (Akhondi a Sabih 2022).

Mezi jeden z prvních případů jaterního abscesu způsobeného bakterií *Desulfovibrio desulfuricans* popsal Koyano s kolektivem. Jednalo se o staršího muže, kterého tížila horečka a pocit přetaženého břicha. Byly mu provedeny laboratorní testy, které ukázaly leukocytózu, zvýšení C-reaktivního proteinu (CRP), gama-glutamyltransferázy a alkalické fosfatázy. Hladina bilirubinu byla v normálu, takže nic nenasvědčovalo poruše jater (žloutenka).

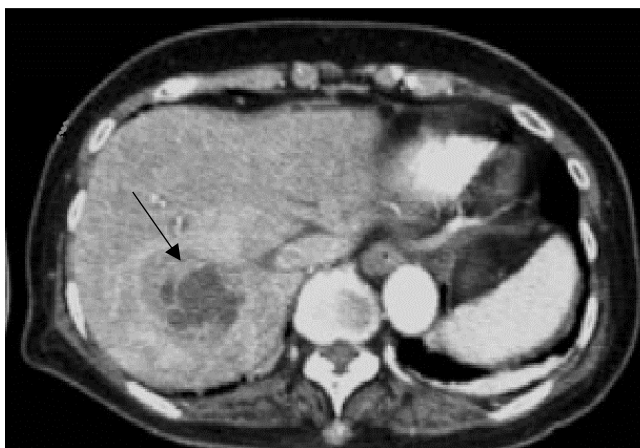
Pacient byl poslán na počítačovou tomografii (CT) břicha, která odhalila kontrastní léze v játrech. Z toho důvodu byly odebrány 4 hemokultury. Po kultivaci byl prokázán růst v anaerobních lahvičkách. Po provedení Grammova barvení byly viditelné gramnegativní spirálovité bakterie (Koyano et al. 2015).



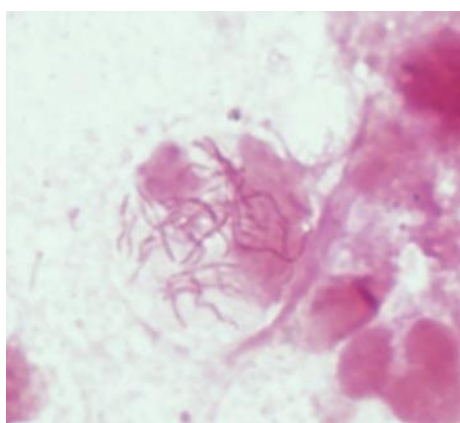
Obrázek 13: CT sken (šipka znázorňuje kontrastní léze v játrech) (Koyano et al., 2015)

Další případ byl popsán Yamazakim a kolektivem. Starší žena, která měsíc trpěla teplotou a následně došlo k poruše vědomí. Po provedení laboratorních testů bylo prokázáno pouze zvýšené CRP, což nasvědčovalo probíhající bakteriální infekci.

Ultrasonograficky byl zjištěn absces v zadním segmentu pravého jaterního laloku (cca 40 x 47 mm). Díky CT byla heterogenní oblast zvýrazněna kontrastem (viz obrázek). Byla provedena punkce tekutiny a z ní připraven preparát pro Grammovo barvení. Opět se jednalo o gramnegativní spirálovité bakterie. Následně se provedly další identifikační testy, u kterých se prokázala produkce sirovodíku a pozitivita na desulfoviridin (Yamazaki et al. 2018).



Obrázek 14: CT se zvýšeným kontrastem, šipka znázorňuje jaterní absces (Yamazaki et al., 2018)



Obrázek 15: Gramnegativní spirálovité bakterie v tekutině z abscesu (Yamazaki et al., 2018)

Zde je tabulka pro porovnání obou výše zmíněných případů jaterního abscesu způsobeného bakteriálním druhem *Desulfovibrio desulfuricans* (Yamazaki et al. 2018).

Tabulka 7: Porovnání dvou případů jaterního abscesu způsobeného rodem *Desulfovibrio* (Yamazaki et al., 2018)

	1. případ (Koyano et al. 2015)	2. případ (Yamazaki et al. 2018)
Pohlaví	muž	žena
Věk	82	73
Klinické příznaky	teplota, roztažení břicha	teplota, porucha vědomí
Umístění abscesu	zadní segment pravého laloku	zadní segment pravého laloku
Terapie	cemfemetazol, piperacilin/tazobaktam, amoxicilin/kys. klavulanová	drenáž, meropenem, cefoperazon/sulbaktam, ampicilin/sulbaktam
Souběžná infekce	žádná	<i>E. coli</i>
Doba trvání	2 týdny	6 týdnů

4. Testování citlivosti na antibiotika

K léčbě onemocnění způsobených bakteriemi se používají antimikrobiální látky. Aby byla léčba účinná, musí být zvoleno vhodné antibiotikum, které patogenní bakterie zneškodní. Naštěstí jsou vyvinuty metody, které dokážou určit, jaký druh antimikrobiální látky a v jaké koncentraci je vhodné použít. Měří se tedy minimální koncentrace antibiotik (MIC), která inhibuje růst MO. Na základě těchto výsledků je možné zahájit vhodnou léčbu, která bude efektivní.

4.1. Disková difúzní metoda

Při diskové metodě je nutné si připravit bakteriální inokulum – 0,5 dle stupnice McFarlanda. Poté je inokulum přeneseno na agarovou plotnu a na ni se rozmístí papírové disky napuštěné antimikrobiální látkou o známé koncentraci. Po inkubaci se měří průměr vzniklých inhibičních zón a podle velikostí těchto zón se hodnotí, zda je sledovaná bakterie rezistentní nebo citlivá na danou antimikrobiální látku, podle vyhodnocovacích tabulek (Andrews 2001).

4.2. Diluční metoda

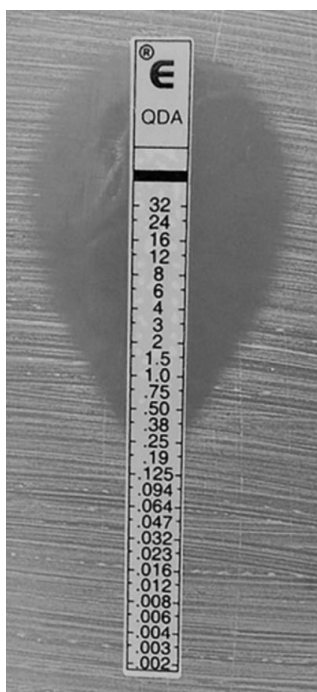
Stanovení MIC je také možné pomocí dilučního testu zkumavkovou metodou. Objemy bujónů ve zkumavkách pro testování každé koncentrace antibiotika měly být alespoň 1 ml. Vytvoří se zásobní roztok a ten je zředěn na požadovanou koncentraci. Do připravených roztoků s antimikrobiální látkou je naočkována bakteriální suspenze, která musí odpovídat hodnotě 0,5 McFarlandovy stupnice. Po 24hodinové inkubaci se odečítá MIC jako minimální koncentrace zcela inhibující růst dané bakterie (Kowalska-Krochmal a Dudek-Wicher 2021).

Pro snadnější vyhodnocování se používá fluorescenční barvivo resazurin. Aktivní bakterie redukují modrý resazurin na růžový resorufin (Kowalska-Krochmal a Dudek-Wicher 2021).

Další možností provedení diluční metody je použití mikrotitrační destičky. Do jamek mikrotitrační destičky je dávkován roztok antibiotik, který je postupně naředěn např. dvojkovou řadou, bujonem Müller-Hinton. Vyšetřuje se tedy koncentrace u jednoho či více druhů antimikrobiálních látek. Po přidání inokula je mikrotitrační destička inkubována. V některých jamkách dojde k zákalu, což znamená, že je bakterie vůči této koncentraci rezistentní. Určuje se tedy jamka s nejnižší koncentrací, kde nedojde k vytvoření zákalu (Schindler 2010).

4.3. E-test

Další možností na vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům je tzv. E-test. Na plotnu s hustě naočkovaným kmenem bakterií se pokládá proužek papíru napuštěný antimikrobiální látkou (proužek je rozdělen na různé koncentrace). Po inkubaci vzniká zóna citlivosti, ve tvaru kapky. Minimální účinná koncentrace antibiotika se odečítá v místě hrotu kapky (Schindler 2010).

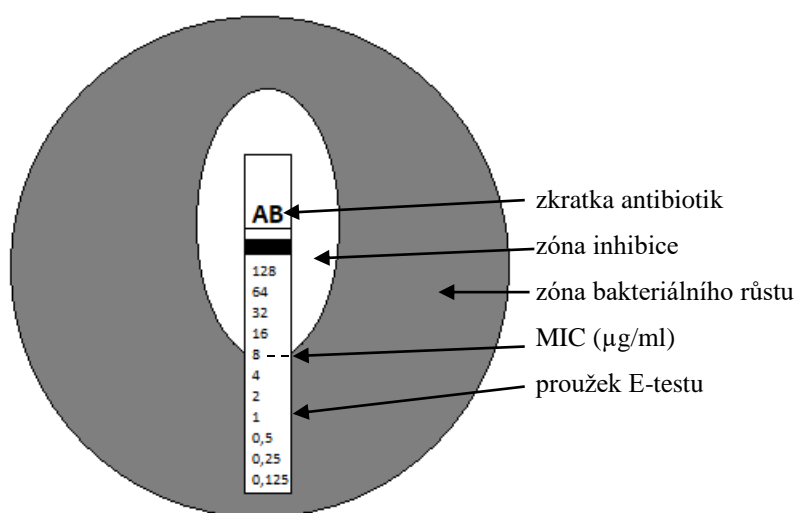


Obrázek 16: Ukázka výsledku E – testu (Yan et al., 2021)

U rodu *Desulfovibrio* je při tomto testu obtížnější růst na agaru, proto se Nakao a kolektiv rozhodli použít metodu nalévání na DA (desulfovibrio agar). Tento agar obsahuje: polypepton, 15 g sójového peptonu; 7,5 g hovězího extraktu; 7,5 g L-cysteinu HCL; 0,75 g citrátu železitoamonného; 0,75 g dextransu síranu sodného a 10 g agarového prášku. Hodnota pH by měla být 7,0 (Nakao et al. 2009).

U metody nalévání se postupuje tak, že se smíchá 100 μ l bakteriální suspenze (stupeň zákalu dle stupnice McFarlanda by měl být 1) a 20 ml DA (udržováno na 50 °C). Takto smíchaná suspenze s agarem se nalévá do Petriho misky a na povrch se položí proužek napuštěný antimikrobiální látkou. Následuje anaerobní inkubace po dobu 48 hodin. Na misce se vytvoří průhledná inhibiční zóna a kolem ní zóna zčernalého média, díky produkci H₂S (Nakao et al. 2009).

Jak již je popsáno výše, zóna minimální inhibiční koncentrace se odečítá v místě střetu hrotu kapky se stupnicí na proužku E-testu.



Obrázek 17: Ukázka odečítání MIC (minimální inhibiční koncentrace) (autor, 2022)

4.4. Výsledky antimikrobiálního testování rodu *Desulfovibrio*

Při testování byla většina druhů rodu *Desulfovibrio* citlivá k antibiotiku metronidazolu, imipenemu a chloramfenikolu, ale rezistentní k penicilinu G či cefoxitinu (Lozniewski et al. 2001).

D. fairfieldensis jako jediný vykazoval rezistenci k fluorochinolonům. (Nakao et al. 2009) Je to také jeden z nejrezistentnějších druhů, což naznačuje, že by se mohlo jednat o největší patogen tohoto rodu. A naopak *D. vulgaris* je nejcitlivější (Warren et al. 2005b).

Co se týče nově popsaného druhu *D. diazotrophicus*, ten je odolný vůči streptomycinu (Sayavedra et al. 2021).

Na základě několika studií a klinické praxe bylo prokázáno, že nejvhodnější druh antibiotik pro léčbu onemocnění způsobeného bakteriálním rodem *Desulfovibrio* je tedy metronidazol a imipen (Lozniewski et al. 2001).

ZÁVĚR

U bakterií rodu *Desulfovibrio* nebylo zjištěno, že by samy způsobovaly onemocnění, ale mohou být jeho součástí a přivodit případné komplikace. Proto je někdy lepší provést více testů pro identifikaci všech patogenů.

V bakalářské práci je popsán tento rod podrobněji i s konkrétními zástupci. Uveden je také nový druh *Desulfovibrio diazotrophicus*, který na rozdíl od ostatních pro tělo přínosný. *D. diazotrophicus* dokáže fixovat dusík v těle a přeměňuje ho na amoniak, případně močovinu a ta je odvedena močí z těla.

Práce se z velké části věnuje metodám kultivace, kde poskytuje informace o médiích, která lze pro kultivaci použít. Zároveň jsou popsány možnosti identifikace od biochemických testů (katalázový test, indol atd.) až po přesnější metody, které se v současnosti používají jako je MALDI, PCR nebo imunomagnetická separace.

Závěr obsahuje informace o jednotlivých chorobách spojených s výskytem desulfovibrií ve zvýšené koncentraci. Jsou zde také uvedeny metody testování citlivosti na antibiotika, které slouží hlavně k tomu, aby bylo zjištěno, jaké antibiotikum a v jaké koncentraci je nutno použít pro léčbu.

POUŽITÁ LITERATURA

AKHONDI, H. a SABIH D. E., 2022. Liver Abscess. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538230/>

BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku* [online]. Praha: Univerzita Karlova. ISBN 978-80-246-3246-9. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=1239015>

BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. a GARRITY, G. M., 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer. ISBN 978-0-387-98771-2.

CAUMETTE, P., COHEN, Y. a MATHERON, R., 1991. Isolation and Characterization of *Desulfovibrio halophilus* sp. nov., a Halophilic Sulfate-reducing Bacterium Isolated from Solar Lake (Sinai). *Systematic and Applied Microbiology* [online]. **14**(1), 33–38. ISSN 07232020. Dostupné z: [doi:10.1016/S0723-2020\(11\)80358-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80358-9)

CLARK, A. E., KALETA, E. J., ARORA, A. a WOLK, D. M., 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **26**(3), 547–603. ISSN 0893-8512, 1098-6618. Dostupné z: [doi:10.1128/CMR.00072-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12)

ČADERSKÝ-ENVITEK, SPOL. S.R.O. *HiMedia* [online]. Dostupné z: <https://www.himedia.cz>

DEMAAGD, G. a PHILIP, A., 2015. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*. **40**(8), 504–532. ISSN 1052-1372.

FENG, Z., LONG, W., HAO, B., DING, D., MA, X., ZHAO, L. a PANG, X., 2017. A human stool-derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. *Gut Pathogens* [online]. **9**, 59. ISSN 1757-4749. Dostupné z: [doi:10.1186/s13099-017-0208-7](https://doi.org/10.1186/s13099-017-0208-7)

FEUERSTEIN, J. D. a CHEIFETZ, A. S., 2017. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. **92**(7), 1088–1103. ISSN 00256196. Dostupné z: [doi:10.1016/j.mayocp.2017.04.010](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.010)

FITE, A., Macfarlane, G. T., Cummings, J. H., Hopkins, M. J., KONG, S. C., FURRIE, E. a MACFARLANE, S., 2004. Identification and quantitation of mucosal and faecal desulfovibrios using real time polymerase chain reaction. *Gut* [online]. **53**(4), 523–529. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gut.2003.031245

GILMOUR, C. C., ELIAS, D. A., KUCKEN, A. M., BROWN, S. D., PALUMBO, A. V., SCHADT, C. W. a WALL, J. D., 2011. Sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a model for understanding bacterial mercury methylation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **77**(12), 3938–3951. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02993-10

GOLDSTEIN, E. J. C., CITRON, D. M., PERAINO V. A. a CROSS, S.A., 2003a. *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia and review of human *Desulfovibrio* infections. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **41**(6), 2752–2754. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.6.2752-2754.2003

GOLDSTEIN, E. J. C., CITRON, D. M., PERAINO V. A. a CROSS, S.A., 2003b. *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia and review of human *Desulfovibrio* infections. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **41**(6), 2752–2754. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.6.2752-2754.2003

GUO, F.-F., YU, T.-C., HONG, J. a FANG, J.-Y., 2016. Emerging Roles of Hydrogen Sulfide in Inflammatory and Neoplastic Colonic Diseases. *Frontiers in Physiology* [online]. **7**. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2016.00156

HÅKANSSON, Å., TORMO-BADIA, N., BARIDI, A., XU, J., MOLIN, G., HAGSLÄTT, M.-L., KARLSSON, C., JEPPSSON, B., CILIO C. M. a AHRNÉ, S., 2015. Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice. *Clinical and Experimental Medicine* [online]. **15**(1), 107–120. ISSN 1591-9528. Dostupné z: doi:10.1007/s10238-013-0270-5

HUMPHRIES, A.C., NOTT, K. P., HALL, L. D. a MACASKIE, L. E., 2004. Continuous removal of Cr(VI) from aqueous solution catalysed by palladised biomass of *Desulfovibrio vulgaris*. *Biotechnology Letters* [online]. **26**(19), 1529–1532. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1023/B:BILE.0000044457.80314.4d

- CHAKRABORTY, R., HAZEN, T. C., JOYNER, D. C., KÜSEL, K., SINGER, M. E., SITTE J. a TOROK, T., 2011. Use of immunomagnetic separation for the detection of *Desulfovibrio vulgaris* from environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **86**(2), 204–209. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2011.05.005
- CHRISTOPHERSEN, C. T., MORRISON, M. a CONLON, M. A., 2011. Overestimation of the Abundance of Sulfate-Reducing Bacteria in Human Feces by Quantitative PCR Targeting the *Desulfovibrio* 16S rRNA Gene. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **77**(10), 3544–3546. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02851-10
- IVERSON, W. P., 1966. Growth of *Desulfovibrio* on the Surface of Agar Media. *Applied Microbiology* [online]. **14**(4), 529–534. ISSN 0003-6919. Dostupné z: doi:10.1128/am.14.4.529-534.1966
- KLUYVER, A. J. a NIEL, C. B., 2022. *Desulfovibrio desulfuricans* subspecies *desulfuricans* [online]. The Global Bioresource Center (ATCC). Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/13541>
- KOVÁČ, J. a KUSHKEVYCH, I., 2017. *New modification of cultivation medium for isolation and growth of intestinal sulfate-reducing bacteria*. MendelNet 2017 Proceedings of 24th International PhD Students Conference, Brno, Czech Republic: Faculty of AgriSciences, Mendel University in Brno. ISBN 978-80-7509-529-9.
- KOWALSKA-KROCHMAL, B. a DUDEK-WICHER, R., 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* [online]. **10**(2), 165. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens10020165
- KOYANO, S., TATSUNO, K., OKAZAKI, M., OHKUSU, K., SASAKI, T., SAITO, R., OKUGAWA S. a MORIYA, K., 2015. A Case of Liver Abscess with *Desulfovibrio desulfuricans* Bacteremia. *Case Reports in Infectious Diseases* [online]. **2015**, 1–4. ISSN 2090-6625, 2090-6633. Dostupné z: doi:10.1155/2015/354168
- KUEVER, J., RAINEY, F. A. a WIDDEL, F., 2015. *Desulfovibrio*. In: WHITMAN, W. B., RAINEY, F., KÄMPFER, P., TRUJILLO, M., CHUN, J., DEVOS, P., HEDLUND B. a DEDYSH, S., ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, s. 1–17. ISBN 978-1-118-96060-8. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608.gbm01035

- KUSHKEVYCH, I., CASTRO SANGRADOR, J., DORDEVIĆ, D., ROZEHNALOVÁ, M., ČERNÝ, M., FAFULA, R., VÍTĚZOVÁ, M. a RITTMANN, S. K.-M. R., 2020. Evaluation of Physiological Parameters of Intestinal Sulfate-Reducing Bacteria Isolated from Patients Suffering from IBD and Healthy People. *Journal of Clinical Medicine* [online]. **9**(6), 1920. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm9061920
- KUSHKEVYCH, I., DORDEVIĆ, D. a VÍTĚZOVÁ, M., 2019. Toxicity of hydrogen sulfide toward sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7. *Archives of Microbiology* [online]. **201**(3), 389–397. ISSN 0302-8933, 1432-072X. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-019-01625-z
- LEE, J. P., YI, C. S., LEGALL, J. a PECK, H. D., 1973. Isolation of a new pigment, desulforubidin, from *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway strain) and its role in sulfite reduction. *Journal of Bacteriology* [online]. **115**(1), 453–455. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.115.1.453-455.1973
- LI, X., FAN, M., LIU, L., CHANG, J. a ZHANG, J., 2019. Treatment of high-concentration chromium-containing wastewater by sulfate-reducing bacteria acclimated with ethanol. *Water Science and Technology* [online]. **80**(12), 2362–2372. ISSN 0273-1223, 1996-9732. Dostupné z: doi:10.2166/wst.2020.057
- LOBO, S. A. L., MELO, A. M. P., CARITA, J. N., TEIXEIRA, M. a SARAIVA, L. M., 2007. The anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 grows at nearly atmospheric oxygen levels. *FEBS Letters* [online]. **581**(3), 433–436. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2006.12.053
- LOUBINOUX, J., BISSON-BOUTELLIEZ, C., MILLER, N. a LE FAOU, A. E., 2002. Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets: *Desulfovibrio fairfieldensis* in periodontal pockets. *Oral Microbiology and Immunology* [online]. **17**(5), 321–323. ISSN 09020055. Dostupné z: doi:10.1034/j.1399-302X.2002.170510.x
- LOZNIIEWSKI, A., LABIA, R., HARISTOY, X. a MORY, F., 2001. Antimicrobial Susceptibilities of Clinical *Desulfovibrio* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **45**(10), 2933–2935. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.45.10.2933-2935.2001

MORAIS-SILVA, F. O., REZENDE, A. M., PIMENTEL, C., SANTOS, C.I., CLEMENTE, C., VARELA-RAPOSO, A., RESENDE, D. M., SILVA, S. M., OLIVEIRA, L. M., MATOS, M., COSTA, D. A., FLORES, O., RUIZ, J. C. a RODRIGUES-POUSADA, C., 2014. Genome sequence of the model sulfate reducer *Desulfovibrio gigas* : a comparative analysis within the *Desulfovibrio* genus. *MicrobiologyOpen* [online]. **3**(4), 513–530. ISSN 2045-8827, 2045-8827. Dostupné z: doi:10.1002/mbo3.184

MURROS, K.E., HUYNH, V. A., TAKALA, T. M. a SARIS, P. E. J., 2021. Desulfovibrio Bacteria Are Associated With Parkinson's Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **11**, 652617. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2021.652617

MUYZER, G. a STAMS, A. J. M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **6**(6), 441–454. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro1892

NAKAO, K.-I., TANAKA, K., ICHIISHI, S., MIKAMO, H., SHIBATA, T. a WATANABE, K., 2009. Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* Isolates from Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **53**(12), 5308–5311. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00630-09

NASREDDINE, R., ARGUDIN, M. A., HERPOL, M., MIENDJE DEYI, V. Y. a DAUBY, N., 2019. First case of *Desulfovibrio desulfuricans* bacteraemia successfully identified using MALDI-TOF MS. *New Microbes and New Infections* [online]. **32**, 100614. ISSN 2052-2975. Dostupné z: doi:10.1016/j.nmni.2019.100614

NATIVIDAD, J. M., LAMAS, B., PHAM, H. P., MICHEL, M.-L., RAINTEAU, D., BRIDONNEAU, CH., DA COSTA, G., VAN HYLCKAMA, J., SOVRAN, B., CHAMIGNON, C., PLANCHAIS, J., RICHARD, M. L., LANGELLA, P., VEIGA, P. a SOKOL, H., 2018. *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nature Communications* [online]. **9**(1), 2802. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-05249-7

PIMENTEL, J. D. a CHAN, R. C., 2007. *Desulfovibrio fairfieldensis* bacteremia associated with choledocholithiasis and endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Journal*

of Clinical Microbiology [online]. **45**(8), 2747–2750. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00969-07

RABUS, R., VENCESLAU, S. S., WÖHLBRAND, L., VOORDOUW, G., WALL, J. D. a PEREIRA, I. A. C., 2015. A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes. In: *Advances in Microbial Physiology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 55–321. ISBN 978-0-12-803299-2. Dostupné z: doi:10.1016/bs.ampbs.2015.05.002

RAMEL, F., BRASSEUR, G., PIEULLE, L., VALETTE, O., HIRSCHLER-RÉA, A., FARDEAU, M. L. a DOLLA, A., 2015. Growth of the Obligate Anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough under Continuous Low Oxygen Concentration Sparging: Impact of the Membrane-Bound Oxygen Reductases. *PLOS ONE* [online]. **10**(4), e0123455. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0123455

ROGGENBUCK, D., REINHOLD, D., WERNER, L., SCHIERACK, P., BOGDANOS, D. P. a CONRAD, K., 2013. Glycoprotein 2 Antibodies in Crohn's Disease. In: *Advances in Clinical Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, s. 187–208. ISBN 978-0-12-407681-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-407681-5.00006-4

DEEPAK, S. A., KOTTAPALLI, K. R., RAKWAL, R., OROS, G., RANGAPPA, K. S., IWAHASHI, H., MASUO, Y. a AGRAWAL, G. K., 2007. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics* [online]. **8**(4), 234–251. ISSN 13892029. Dostupné z: doi:10.2174/138920207781386960

SAYAVEDRA, L., LI, T., BATISTA, M. B., SEAH, B. K. B., BOOTH, C., ZHAI, Q., CHEN, W. a NARBAD, A., 2020. *Desulfovibrio diazotrophica* sp. nov., a sulphate reducing bacterium from the human gut capable of nitrogen fixation [online]. preprint. B.m.: Microbiology. Dostupné z: doi:10.1101/2020.07.01.183566

SAYAVEDRA, L., LI, T., BATISTA, M. B., SEAH, B. K. B., BOOTH, C., ZHAI, Q., CHEN, W. a NARBAD, A., 2021. *Desulfovibrio diazotrophicus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium from the human gut capable of nitrogen fixation. *Environmental Microbiology* [online]. **23**(6), 3164–3181. ISSN 1462-2912, 1462-2920. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.15538

SCHINDLER, J., 2010. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3170-4.

SCHMIDT, T., 2019. *Encyclopedia of microbiology. Volume 1, Volume 1*, [online]. ISBN 978-0-12-811737-8. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/concordiaab-ebooks/detail.action?docID=5994475>

SRIVASTAVA, A., GUPTA, J., KUMAR, S. a KUMAR, A., 2017. Gut biofilm forming bacteria in inflammatory bowel disease. *Microbial Pathogenesis* [online]. **112**, 5–14. ISSN 08824010. Dostupné z: [doi:10.1016/j.micpath.2017.09.041](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.041)

TAJTI, G., SZANTO, T. G., CSOTI, A., RACZ, G., EVARISTO, C., HAJDU, P. a PANYI, G., 2021. Immunomagnetic separation is a suitable method for electrophysiology and ion channel pharmacology studies on T cells. *Channels* [online]. **15**(1), 53–66. ISSN 1933-6950, 1933-6969. Dostupné z: [doi:10.1080/19336950.2020.1859753](https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1859753)

VASOO, S., MASON, E. L., GUSTAFSON, D. R., CUNNINGHAM, S. A., COLE, N. C., VETTER, E. A., STEINMANN, S. P., WILSON, W. R., PATEL, R., BERBARI, E. F. a HENRY, N. K., 2014. *Desulfovibrio legallii* prosthetic shoulder joint infection and review of antimicrobial susceptibility and clinical characteristics of *Desulfovibrio* infections. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **52**(8), 3105–3110. ISSN 1098-660X. Dostupné z: [doi:10.1128/JCM.00083-14](https://doi.org/10.1128/JCM.00083-14)

VYTŘASOVÁ, J., BÍLKOVÁ, Z., UNIVERZITA PARDUBICE, a CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ FAKULTA, 2014. *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*. Pardubice: Univerzita Pardubice. ISBN 978-80-7395-747-6.

WARREN, Y. A., CITRON, D. M., MERRIAM, C. V., a GOLDSTEIN, E. J. C., 2005a. Biochemical differentiation and comparison of *Desulfovibrio* species and other phenotypically similar genera. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **43**(8), 4041–4045. ISSN 0095-1137. Dostupné z: [doi:10.1128/JCM.43.8.4041-4045.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4041-4045.2005)

WATANABE, K., MIKAMO, H. a TANAKA, K., 2007. Clinical significance of sulfate-reducing bacteria for ulcerative colitis. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*. **65**(7), 1337–1346. ISSN 0047-1852.

WESTERLAND, O. a GRIFFIN, N., 2016. Magnetic Resonance Enterography in Crohn's Disease. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* [online]. **37**(4), 282–291. ISSN 08872171. Dostupné z: [doi:10.1053/j.sult.2016.02.001](https://doi.org/10.1053/j.sult.2016.02.001)

- YAMAZAKI, T., JOSHITA, S., KASUGA, E., HORIUCHI, K., SUGIURA, A., FUJIMORI, N., KOMATSU, M., UMEMURA, T., MATSUMOTO, A. a TANAKA, E., 2018. A case of liver abscess co-infected with *Desulfovibrio desulfuricans* and *Escherichia coli* and review of the literature. *Journal of Infection and Chemotherapy* [online]. **24**(5), 393–397. ISSN 1341321X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiac.2017.11.006
- YU, Y. R. a RODRIGUEZ, J. R., 2017. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Seminars in Pediatric Surgery* [online]. **26**(6), 349–355. ISSN 10558586. Dostupné z: doi:10.1053/j.sempedsurg.2017.10.003
- YU, Z. a MORRISON, M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* [online]. **36**(5), 808–812. ISSN 0736-6205, 1940-9818. Dostupné z: doi:10.2144/04365ST04
- ZHOU, A., BAIDOO, E., HE, Z., MUKHOPADHYAY, A., BAUMOHL, J. K., BENKE, P., JOACHIMIAK, M. P., XIE, M., SONG, R., ARKIN, A. P., HAZEN, T. C., KEASLING, J. D., WALL, J. D., STAHL, D. A. a ZHOU, J., 2013. Characterization of NaCl tolerance in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough through experimental evolution. *The ISME Journal* [online]. **7**(9), 1790–1802. ISSN 1751-7362, 1751-7370. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2013.60