

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních  
zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Kolonizace trávicího traktu bifidobakteriemi**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Dana Hanzlíková**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Martina Geigerová, Ph.D.**

**© 2018 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Kolonizace trávicího traktu bifidobakteriemi" 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**

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) jméno vedoucího, případně dalších osob, a informace, za co děkujete.

# Kolonizace trávicího traktu bifidobakteriemi

## Souhrn

Střevní mikrobiota představuje složitou bakteriální komunitu. Rozvíjí se bezprostředně po narození. Důležitými kolonizátory jsou bifidobakterie, které pozitivně ovlivňují zdraví jedince, podporují fungování imunitního systému, syntetizují vitaminy, poskytují ochranu před patogenními bakteriemi. Jejich výskyt v trávicím traktu je ovlivněn řadou faktorů, především porodem a stravou. Mateřské mléko má zásadní podíl na kolonizaci trávicího traktu bifidobakteriemi díky obsahu oligosacharidů. Bifidobakterie jsou díky pozitivnímu vlivu na hostitele často využívány jako probiotické mikroorganismy.

V diplomové práci byla testována schopnost bifidobakterií kolonizovat dutinu ústní, tlusté střevo a mléko dojnic. Mléko může představovat potenciální zdroj bifidobakterií pro utváření střevní mikrobioty telete. K experimentu byl vybrán vhodný kmen bifidobakterií na základě jeho probiotických vlastností. Kvůli odlišení od ostatních bifidobakterií vyskytujících se v trávicím traktu byly z vybraného kmene *Bifidobacterium animalis* spp. *animalis* vytvořené rifampicin rezistentní mutanti, kteří byli podáni laktující dojnici. Kultivační metodou byly stanoveny celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterií, laktobacilů, koliformních bakterií, *Escherichia coli* a rifampicin rezistentních bifidobakterií (RRBIF). Přítomnost bifidobakterií byla ověřena pomocí fruktoso-6-fosfát fosfoketalásového testu.

Bifidobakterie byly ve výkalech stanoveny v počtu  $10^7 - 10^8$  KTJ/g. Rifampicin rezistentní bifidobakterie dočasně kolonizovaly tlusté střevo v počtu až  $10^5$  KTJ/g. V dutině ústní byly bifidobakterie nalezeny v počtu  $10^3 - 10^4$  KTJ/g. RRBIF byly detekovány po podání probiotik v počtu  $10^4$  KTJ/g. V mléce dojnice byly bifidobakterie stanoveny v počtu méně než  $10^2$  KTJ/g a RRBIF nebyly vůbec nalezeny kultivační metodou. Fruktoso-6-fosfát fosfoketalásový test vzorku mléka byl vyhodnocen negativně, v mléku nebyly přítomny žádné RRBIF. Zdá se, že mléko dojnice není zdrojem bifidobakterií pro střevní mikrobiotu telete.

**Klíčová slova:** střevní mikrobiota, kolonizace, bifidobakterie, probiotika, způsob porodu, mateřské mléko.

# Colonization of gastrointestinal tract by bifidobacteria

## Summary

Intestinal microbiota represents a complicated bacterial community. It is formed immediately after birth. The important colonizers are bifidobacteria having positive effect on health, they support function of immune system, synthesize vitamins, protect against pathogens. Many factors influence their presence in gastrointestinal tract, especially mode of delivery and diet. Breast milk has a major influence on colonization of gastrointestinal tract by bifidobacteria, because there are oligosaccharides in breast milk. Bifidobacteria have positive effects on host, they are used as probiotic microorganisms.

In this thesis we tested bifidobacterial ability to colonize the cow's oral cavity, colon and milk. The milk can be potential source of bifidobacteria for forming calf's gut microbiota. We chose suitable strain of bifidobacteria, which has probiotic properties. From strain *Bifidobacterium animalis* spp. *animalis* were prepared rifampicin-resistant mutants (RRBIF) to differ them from other species of bifidobacteria present in gut. RRBIF was administered to lactating cow. Total anaerobes, bifidobacteria, lactobacilli, coliform bacteria, *Escherichia coli* and RRBIF were determined by cultivation method. The presence of bifidobacteria in milk was checked also by fructose-6-phosphate phosphoketolase test.

Bifidobacteria were detected in faeces in counts  $10^7 - 10^8$  CFU/g. RRBIF temporarily colonized the colon, in faeces were found in counts  $10^5$  CFU/g. Bifidobacteria were detected in the oral cavity in counts  $10^3 - 10^4$  CFU/g. RRBIF were detected in counts  $10^4$  CFU/g during the administration period. Bifidobacteria were determined in milk in counts less than  $10^2$  CFU/g and RRBIF were not found by cultivation method at all. Fructose-6-phosphate phosphoketolase test was negative, no RRBIF were present in the milk. It seems, cow's milk isn't a source of bifidobacteria for calves.

**Keywords:** intestinal microbiota, colonization, bifidobacteria, probiotics, way of delivery, breast milk

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Lidská střevní mikrobiota .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty.....</b>	<b>4</b>
2.2.1	Kolonizace GIT .....	4
2.2.2	Mateřské mléko.....	6
2.2.3	Vliv antibiotik na střevní mikrobiotu.....	8
<b>2.3</b>	<b>Probiotika.....</b>	<b>9</b>
2.3.1	Kritéria pro výběr probiotických bakterií .....	10
2.3.2	Faktory ovlivňující přežití probiotik při průchodu GIT .....	11
2.3.3	Adheze .....	13
2.3.4	Prebiotika .....	14
<b>2.4</b>	<b>Rod <i>Bifidobacterium</i> .....</b>	<b>14</b>
2.4.1	Historie.....	14
2.4.2	Charakteristika .....	17
2.4.3	Fyziologie.....	18
2.4.4	Výskyt.....	18
<b>3</b>	<b>Hypotéza .....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>21</b>
5.1	Výběr vhodného probiotického kmenu .....	21
5.2	Příprava kultivačních médií.....	22
5.3	Kultivace .....	24
5.4	Kultivace vzorků mléka .....	25
5.5	Vyhodnocení .....	26
5.6	Detekce enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolsy (F6PPK test).....	26
<b>6</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>28</b>
6.1	Počty bakterií ve výkalech.....	28
6.2	Počty bakterií v zubním stěru .....	30
6.3	Počty bakterií v mléce .....	32
6.4	Fruktoso-6-fosfát fosfoketolasový test mléka .....	33
<b>7</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>34</b>
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>40</b>

# 1 Úvod

Střevní mikrobiota představuje složité společenství bakterií, které ovlivňuje řadu fyziologických procesů, napomáhá trávení živin, syntetizuje vitaminy, podílí se na fungování imunitního systému. Střevní mikrobiota se rozvíjí bezprostředně po narození, je ovlivněna řadou vnitřních i vnějších faktorů. Významný vliv představuje způsob porodu a následně způsob stravy v kojeneckém období.

Mezi důležité první kolonizátory trávicího traktu patří bifidobakterie, které tvoří převážnou část mikrobioty v prvních měsících života kojence krmeného mateřským mlékem. Jejich přítomnost poskytuje ochranu před patogenními bakteriemi. Bifidobakterie podporují správný vývoj imunitního systému. Díky svým vlastnostem patří mezi probiotické bakterie.

## 2 Literární rešerše

### 2.1 Lidská střevní mikrobiota

Lidskou střevní mikrobiotu představují symbiotické bakterie obývající tlusté střevo. Jedná se o extrémně složitou mikrobiální komunitu, která má významný vliv na fyziologii člověka (Turróni et al., 2008). Ve skutečnosti obsahuje 10krát více buněk než lidské tělo a 150krát více genů než lidský genom (Maukonen et Saarela, 2015). Střevní mikrobiota má zásadní vliv na zdraví a do značné míry se podílí i na homeostáze lidského těla. Mimo jiné, role lidské mikrobioty spočívá i v podpoře trávení živin v celém gastrointestinálním traktu (GIT) (Tidjani et al., 2016). Rozmanitost bakterií vyskytující se v lidském GIT je vysoká, odhady počtu se pohybují v rozmezí od 3000 do 5000 druhů. Ačkoli je střevní mikrobiota jednou z velmi dobře charakterizovaných nik díky molekulárně-genetickým metodám, mnohé z bakteriálních druhů jsou dosud neznámé nebo nekultivované (Fredricks, 2013).

Prostředí GIT se v každé své části značně liší, což vede k rozdílným mikrobiálním společenstvím v jednotlivých částech (Wilson, 2008). V horních oblastech GIT (žaludek, tenké střevo) není prostředí zcela vhodné pro kolonizaci mikroby, navíc v této oblasti dochází i k velkému vstřebávání živin ze stravy. Epiteliální povrch tenkého střeva u zdravých lidí není příliš kolonizován, bakterie jsou zde reprezentovány jen příležitostnými skupinami a nacházejí se v nízkých koncentracích (Fredricks, 2013). Mezi převládající bakterie kolonizující tenké střevo patří rody *Streptococcus*, *Bacteroidetes*, *Clostridium*, *Enterococcus* a *Lactobacillus* (Hayashi et al., 2005). Kvůli nutnosti použití invazivních postupů pro přístup do tenkého střeva není jeho mikrobiální systém příliš dobře prozkoumaný (Sundin et al., 2017). V tlustém střevě se nachází příznivé prostředí pro vytváření velkých a rozmanitých mikrobiálních společenstev. Existuje také horizontální stratifikace na jakémkoli místě v GIT. Lumen, slizniční vrstva a epitheliální povrch nabízejí odlišná prostředí, ve kterých se mohou rozvíjet různé mikrobiální kolonie (Wilson, 2008).

Složení a aktivita střevní mikrobioty má zásadní význam pro lidskou imunitu, fyziologii trávení a patologické procesy, a tedy pro celkové zdraví jednotlivce (Hayashi et al., 2002). Lidská mikrobiota tlustého střeva vykazuje nízkou rozmanitost na úrovni kmenů. Skládá se z jediného archaického kmenu Euryarchaeota a sedmi bakteriálních kmenů: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* a *Cyanobacterialike* (Talukdar et al., 2015). Mezi převládající rody patří *Bacteroides*,



*Eubacterium*, *Collinsella*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus* a *Peptostreptococcus* (Hayashi et al., 2002). Za hojnější rody jsou považovány *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* a *Collinsella* (Sánchez et al., 2013). Metabolické aktivity rodu *Bifidobacterium* mají na člověka prokazatelně pozitivní vliv (Russell et al., 2011).

Střevní mikrobiota poskytuje řadu funkčních výhod, které jsou rozhodující pro lidské zdraví (Pey et al., 2017). Hostitel a mikrobiota spolu fungují jako celek chránící své prostředí proti invazi potenciálními patogeny (Selber-Hnatiw et al., 2017). Za normálních okolností mikroorganismy působící v GIT napomáhají člověku, například rozkladem potravy, syntézou vitaminů a interakcí s imunitním systémem. Prostředí GIT zase naopak podporuje růst, reprodukci a dlouhověkost bakteriální komunity (Browne et al., 2017). Střevní mikrobiota inhibuje střevní kolonizaci patogenními mikroorganismy a má antikarcinogenní, imunostimulační a antidiareální vlastnosti, napomáhá zmírnit intoleranci laktózy a snížit hladinu cholesterolu (Russell et al., 2011).

Mikrobiota navíc produkuje metabolity, které mohou ovlivnit fyziologii člověka. Tyto metabolity také působí na imunitní systém a metabolismus prostřednictvím komplexního souboru chemických interakcí a signálních cest (Clemente et al., 2012). Tyto interakce mohou významně ovlivnit zdravotní stav hostitele (Livingston et al., 2017).

Střevní mikrobiota je nezbytná pro správný vývoj imunitního systému (Hooper et al., 2012). Industriální společnost vykazuje sníženou střevní mikrobiální rozmanitost v důsledku stravování s vysokým obsahem tuku a s nízkým obsahem vlákniny, zvýšeného používání antibiotik a zvýšené hygieny, čímž dochází k menšímu kontaktu s bakteriemi (Obregon-Tito et al., 2015). Tato nedostatečně rozvinutá střevní mikrobiota může vést k narušení imunitních funkcí, zvýšenému výskytu alergií a autoimunitních onemocnění (Blaser et Falkow, 2009). Narušení či změna složení mikrobioty nebo dysbióza je často spojena s onemocněním lidí, z čehož vyplývá, že i když neexistuje univerzální složení mikrobioty, její vyváženost je rozhodující pro lidské zdraví (Selber-Hnatiw et al., 2017).

Změny ve střevním prostředí způsobené stravou a fyziologií člověka, stejně jako požití mikrobů, mohou vytvořit zdroje pro konkurenční mikroby, které ovlivňují rezidentní mikrobiotu, což může působit na lidské zdraví (Sommer et Bäckhed, 2013). Změny v kompozici a aktivitě střevní mikrobioty byly také spojeny s různými metabolickými poruchami, včetně obezity, diabetu a kardiometabolických poruch (Cani et Knaut, 2016). Střevní mikrobiota je spojována s dalšími četnými nemocemi jako je syndrom dráždivého střeva, astma, metabolický syndrom, cukrovka, kardiovaskulární onemocnění a kolorektální karcinom (Blumberg et

Powrie, 2012), autismus, deprese a úzkost (Amato, 2017). Ke ztrátě střevní mikrobiální diverzity a zvýšenému výskytu nemocí dochází i po užívání antibiotik (Blaser et Falkow, 2009).

## 2.2 Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty

Dnes je dobře známo, že složení střevní mikrobioty je mezi jednotlivci velmi variabilní (Eckburg et al., 2005). Mikrobiota v dospělém věku je relativně stabilní, co se týká zastoupení jednotlivých druhů, ale mohou se objevit změny počtů daných druhů v důsledku působení různých vnějších i vnitřních faktorů (Holmes et al., 2012). Zdravá střevní mikrobiální kompozice se mění podle věku a genetiky (Maukonen et Saarela, 2015). Strava a fyziologie člověka ovlivňuje prostředí střev a tím i složení a funkci střevní mikrobioty (David et al., 2014). Tyto změny se mohou projevit na zdraví hostitele (Amato, 2017). Mezi vnitřní faktory, které mají vliv na mikrobiotu, patří teplota, pH, redoxní potenciál, množství kyslíku a aktivita vody (Maukonen et Saarela, 2015). Dalšími faktory, které mohou ovlivňovat bakteriální kolonizaci lidského střeva, jsou léky (především antibiotika), imunita a mikrobiologické interakce (Ghoddusi et Tamime, 2014).

### 2.2.1 Kolonizace GIT

Předpokládalo se, že střeva novorozence jsou sterilní a kolonizace mikroorganismy začíná až při porodu. V posledních letech však došlo k objevu bakterií nebo bakteriální DNA v pupečnickové krvi, placentě a mekoniu (Jiménez et al., 2008), což naznačuje možnou expozici bakterií již v prenatálním období. Navíc byly bakterie nalezeny i v mekoniu dětí narozených císařským řezem. Nejčastěji nalezené bakterie v mekoniu byly *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Nejvyšší počty vykazovaly bifidobakterie. Kolonizace trávicího traktu v prenatálním období není ještě dostatečně prozkoumaná a objasněna (Martin et al., 2016).

Mikrobiální ekosystém v GIT dítěte se začíná velmi rychle rozvíjet bezprostředně po narození (Cronin et al., 2011). Zmíněné rody *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* patří mezi první kolonizátory trávicího traktu, jedná se o fakultativně anaerobní bakterie, které redukují množství kyslíku a tím připravují prostředí pro striktně anaerobní bakterie jako jsou *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a *Clostridium*. Kolonizace jednotlivými druhy

a časový rámeček, ve kterém k tomu dojde, závisí především na způsobu porodu (Milani et al., 2015).

Během vaginálního porodu začíná kolonizace GIT bakteriemi, které pocházejí buď z mateřské mikrobioty (především ze střeva a pochvy) nebo z životního prostředí. (Derrien et Van Hylckama Vlieg, 2015). U dětí narozených císařským řezem (NČŘ) se předpokládá, že jsou kolonizovány bakteriemi z prostředí, tedy z kůže matky, nemocničního personálu a nemocničního prostředí (Martin et al., 2016).

Děti narozené vaginálním porodem (NVP) jsou při průchodu rodidly matky vystaveny velkému počtu bakterií, zatímco kojenci NČŘ postrádají přímý kontakt s mateřskou mikrobiotou a jsou vystaveny více bakteriím z prostředí, což zřejmě podporuje kolonizaci a růst fakultativně aerobních a kožních bakterií, jako jsou druhy *Staphylococcus*, *Propionibacterium* a *Clostridium*. Také byly detekovány ve vyšších počtech bakterie rodu *Enterococcus* a druhu *C. perfringens* u kojenců NČŘ v porovnání s dětmi NVP (Martin et al., 2016). Děti NČŘ měly v GIT nižší počet bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Bacteroides* ve srovnání s dětmi NVP (Thijs et al., 2006). Vliv na kolonizaci má i hospitalizace a předčasný porod, které jsou spojovány s vyšší pravděpodobností kolonizace *Clostridium difficile*. Dalšími faktory, které se podílejí na rozvoji střevní mikrobioty jsou hygienické podmínky, velikost porodnice a léčba antibiotiky (Vlková et al., 2005), která je u dětí spojována s nižším počtem rodů *Bifidobacterium* a *Bacteroides* (Thijs et al., 2006).

První týdny života jsou období, kdy je střevní mikrobiota velmi dynamická, přičemž velký vliv na rozvíjející se mikrobiotu má výživa. Mateřské mléko je jedinečné, protože odpovídá potřebám výživy kojence, a navíc stimuluje správný vývoj imunitního systému. Kromě nutriční podpory poskytuje mateřské mléko bioaktivní složky, které podporují rozvoj mikrobioty (Ranucci et al., 2017). U kojených kojenců dominují mikrobiotě bifidobakterie (Martin et al., 2016), jejichž úspěšná kolonizace GIT je způsobena jejich schopností využívat oligosacharidy mateřského mléka (Turrone et al., 2012). Složení mateřského mléka se odvíjí od zdravotního stavu matky a jejím způsobu stravování. Kojenci krmení náhradní stravou mají vyšší počty *Bacteroides*, *Clostridium* a *Lactobacillus* (Ranucci et al., 2017).

Pokud jsou děti NČŘ kojeny velmi rychle se u nich rozvíjí kolonizace bifidobakteriemi, kojení tedy může časem vykompenzovat jejich zpožděnou kolonizaci, vyrovnat jejich počty na stejné jako mají kojené děti NVP. Neexistuje přesně vymezené období, kdy by rozdíly ve složení střevní mikrobioty u kojenců NVP a NČŘ vymizely, někteří autoři uvádějí 1 měsíc, jiní 7 let (Martin et al., 2016).

Bylo zjištěno, že snížený počet bifidobakterií ve střevní mikrobiotě kojenců koreluje s enterickými poruchami (Di Gioia et al., 2014). Existuje několik studií, které ukázaly, že probiotické preparáty s bifidobakteriemi snižují výskyt a závažnost nekrotizující enterokolitidy způsobené klostridiemi (Musilová et al., 2015).

Bakterie rodu *Bifidobacterium* představují převládající populaci u novorozenců a kojenců (Mariat et al., 2009), jejich počty se však po ukončení kojení a přechodu na běžnou stravu podstatně snižují. Po zavedení pevné stravy pokračuje postupná změna mikrobioty, která se stále více podobá složení mikrobioty dospělého člověka. Přesný věk, ve kterém je vytvořena stabilní kompozice mikrobioty, je individuální, ale nejčastěji k tomu dochází kolem 3 let (Yatsunencko et al., 2012). I po uplynutí věku 3 let se však objevují v životě události, které mohou ovlivnit složení mikrobioty, jako jsou hormonální změny v období puberty nebo výrazné změny stravovacích návyků. Základní složení mikrobioty je však stejné, mění se zastoupení jednotlivých skupin. (Martin et al., 2016).

Zastoupení druhů rodu *Bifidobacterium* v lidském střevě se mění v závislosti na věku. *B. longum* se vyskytuje v lidském střevě po celý život. *B. breve* byl identifikován u 70 % dětí ve věku do 3 let. *B. adolescenti* a *B. catenulatum* převládaly u dětí po ukončení kojení. *B. bifidum* byl nalezen téměř ve všech věkových kategoriích. *B. dentium* se vyskytuje především u starších lidí (Kato et al., 2017). Na rozdíl od dětské střevní mikrobioty převažují u dospělých druhy *B. adolescentis* a *B. catenulatum* (Avershina et al., 2016). Tyto převládající druhy přetrvávají až do stáří s nárůstem výskytu druhu *B. dentium* (Ouwehand et al., 2008). Přes běžné druhy jako *B. dentium*, *B. longum ssp. longum*, *B. thermophilum*, *B. catenulatum* a *B. adolescentis* u seniorů bylo zjištěno, že se u nich navíc vyskytují druhy, jako je *B. minimum*, *B. gallinarum*, *B. pulloru*, *B. saecularmay* a *B. mongoliense*, které u dospělých lidí nenajdeme (Kato et al., 2017).

### 2.2.2 Mateřské mléko

Mateřské mléko představuje ideální výživu pro savčí mládě, přesně odpovídá jeho nutričním potřebám. Mléko obsahuje mnoho komplexních proteinů, lipidů a sacharidů. Zastoupení jednotlivých složek v mateřském mléku je uvedeno v tabulce č. 1, ve které je uvedeno pro porovnání i složení kravského mléka. Složení mléka se mění nejen během jednoho kojení, ale i v průběhu laktace, aby naplňovalo potřeby dítěte (Andreas et al., 2015). Kromě poskytnutí klíčových živin, které jsou nezbytné pro správný růst a vývoj dítěte obsahuje také řadu biologicky aktivních látek, jako jsou imunoglobuliny, laktoferin, lactofericin, lysozym,

lactoperoxidáza, haptokorin, volné mastné kyseliny, antimikrobiální peptidy a další. Za nejvýznamnější antimikrobiální látky jsou považovány laktoferin a lysozym. Antibakteriální efekt laktoferinu spočívá ve vychytávání volného železa, které je růstovým faktorem zejména koliformních bakterií. Lysozym je schopný degradovat vnější buněčnou stěnu gram-pozitivních bakterií. Lysozym v synergickém vztahu s laktoferinem je také schopný zabít bakterie. Laktoferin poskytuje prostřednictvím navázání lipopolysacharidů (a tím pádem jejich odstraněním z vnější buněčné membrány bakterií) lysozymu přístup k degradaci vnitřní proteoglykemické matrix, čímž dochází k usmrcení mikroorganismů. Odolnost vůči lysozymu se zdá být důležitou vlastností probiotických bakterií pro kojení, většina lidských druhů bifidobakterií je vůči lysozomu odolná. Navíc komponenty mateřského mléka nabízejí další důležité výhody, jako je vývoj trávicího ústrojí novorozenců, zvýšené vstřebávání vápníku, železa a dalších minerálů a podpora rozvoje centrální nervové soustavy. Kojení novorozenci mají obecně vyšší IQ, delší životnost a lepší odolnost proti infekčním chorobám (Rada et Ročková, 2011).

Podle WHO se doporučuje výhradní kojení po dobu šesti měsíců a u dětí kojených do jednoho roku lze pozorovat určité přínosy pro zdraví (Thomson et al., 2017). Mateřské mléko neslouží jen k výživě kojenců, ale je také zdrojem růstových faktorů pro střevní bakterie. Prebiotickou funkci mateřského mléka plní oligosacharidy. Pomocí vyvinuté metody hmotnostní spektrometrie byla sledována spotřeba bakterií jednotlivých oligosacharidů mateřského mléka (OMM), byla prokázána preferenční spotřeba OMM vybranými kmeny bifidobakterií. OMM představují čtvrtou nejvíce zastoupenou složku mateřského mléka. Kolostrum obsahuje až 20 g/l, poté obsah OMM klesá a pohybuje se v rozmezí 3 – 15 g/l (Rada et Ročková, 2011; Thomson et al., 2017). Ačkoli všechny fyziologické funkce OMM nejsou zcela známy, jednou z objasněných funkcí je, že zabraňují adhezi patogenů na epitelové buňky (Rada et Ročková, 2011). Kravské mléko má oproti lidskému menší obsah oligosacharidů, přesto telata krmena mlékem měla ve střevní mikrobiotě vyšší počty bifidobakterií než telata krmena umělou stravou (Vlková et al., 2008b).

OMM a další biologicky aktivní složky mateřského mléka se podílí na vývoji střevní mikrobioty, jejich začlenění do kojenecké výživy je složité. Porozumění funkcí těchto složek mateřského mléka umožní zlepšit kojeneckou výživu a pozitivní ovlivnění utváření střevní mikrobioty (Andreas et al., 2015).

**Tabulka č. 1: Složení lidského mateřského mléka (Park et al., 2007; Rada et Ročková, 2011)**

<b>Složka</b>	<b>Mateřské mléko [%]</b>	<b>Kravné mléko [%]</b>
Laktóza	6,9	4,7
Oligosacharidy	0,3 – 1,5	0,003 – 0,006
Proteiny	1,2	3,2
Kaseinové bílkoviny	0,4	2,6
Syrovátkové bílkoviny	0,7	0,6
Tuk	4	3,6

### **2.2.3 Vliv antibiotik na střevní mikrobiotu**

Mikrobiota GIT může být vystavena antibiotikům, která se používají k léčbě infekčních onemocnění způsobených bakteriemi (Duranti et al., 2017). Podávání antibiotik může způsobit narušení střevní mikrobioty. Vliv antibiotik není pro pacienta vždy prospěšný, protože mohou zničit nejen patogeny, ale i prospěšné bakterie. V důsledku tohoto oslabení může ve střevě dojít k rozšíření dalších patogenů. Po ukončení léčby antibiotiky ne vždy dochází k úplnému obnovení původní střevní mikrobioty (Mangin et al., 1999). Během antibiotické léčby i po jejím skončení se doporučuje užívání probiotik, které snižují rozsah narušení střevní mikrobioty způsobené antibiotickou terapií (Plummer et al., 2005).

Bakterie GIT mohou potlačovat působení antibiotik prostřednictvím získání specifického genetického vybavení, tzv. rezistence, které se podílí na inaktivaci antibiotik. Mechanismy pro rezistenci mohou být zakódovány v chromozomální DNA, ale i na extrachromozomálních mobilních genetických elementech, jako jsou plasmidy a fágy, které jsou přenositelné i na další bakterie střevní mikrobioty díky procesu horizontálního genového transferu. Rezistenci proti antibiotikům mohou bakterie získat také mutací v genu kódujícím antibiotický cíl (Duranti et al., 2017). Bakteriální komunity si geny pro rezistenci k antibiotikům uchovávají, což je považováno za nežádoucí, protože to může vést ke vzniku rezistence vůči antibiotikům (AR) i u patogenních bakterií. Pomocí mechanismů horizontálního

genového transferu může docházet k výměně AR genů nejen mezi bakteriemi původní mikrobioty, ale i na jiné bakterie, které právě procházejí trávicím traktem (Duranti et al., 2017).

Patel et al. (2012) uvádí citlivost rodu *Bifidobacterium* na ampicillin, penicillin G, bacitracin, cefalosporin, chloramphenicol, erythromycin, clindamycin, nitrofurantoin, tetracycline a rezistenci na vancomycin, gentamycin, streptomycin, polymyxin B, trimethoprim, colistin, metronidazol.

## 2.3 Probiotika

Všeobecně uznávanou definici probiotik navrhla Světová zdravotnická organizace (WHO), tj. probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos (WHO, 2001). Probiotika pozitivně ovlivňují střevní mikrobiotu, imunitní systém, snižují symptomy alergií, zmírňují akutní gastroenteritidy, snižují intoleranci laktózy a zmírňují střevní záněty (Turroni et al., 2011). Dále je studován jejich hypocholesterolemický potenciál (Abd El-Gawad et al., 2005) a antiobezitní vlastnosti, včetně jejich vlivu na tělesnou hmotnost, adipozitu nebo příjem potravy. Přesné fungování probiotik není zcela známo a stále je předmětem výzkumu (Arora et al., 2013).

V podstatě ale probiotika ovlivňují přímo i nepřímo řadu mechanismů, které přináší příznivý účinek. Požitím probiotik dochází k přechodné kolonizaci, která může ovlivňovat složení a aktivitu přirozené střevní mikrobioty, zvýšit počet prospěšných bakterií a omezit kolonie škodlivých mikroorganismů. Toho může být dosaženo tím, že probiotické bakterie produkují organické kyseliny a mastné kyseliny s krátkým řetězcem, čímž dojde ke snížení pH střev, tedy k méně vhodnému prostředí pro patogenní mikroorganismy (Amund, 2016).

Probiotika byla součástí lidské výživy i v minulosti ve formě různých fermentovaných potravin (Arora et al., 2013). Probiotický koncept pochází z roku 1908, kdy Metchnikoff zaznamenal, že konzumace určitých fermentovaných potravin má pozitivní vliv na lidské zdraví (Turroni et al., 2011). Jako probiotika se používají různé druhy bakterií a kvasinek. Nejčastěji používané druhy rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou uvedené v tabulce č. 2. (Lacroix a Yildirim 2007).

Probiotika běžně najdeme jako součást fermentovaných mléčných výrobků (Amund, 2016). Kvůli poptávce spotřebitelů, kteří trpí intolerancí laktózy, alergií na mléčné bílkoviny,

jsou na trhu probiotika ve formě tablet. Rozvíjí se i výzkum zaměřený na začleňování probiotik do nápojů, výrobků na bázi obilovin i cukrovinek (Tripathi et Giri, 2014).

**Tabulka č. 2: Využívané probiotické bakterie (Soccol et al., 2010)**

<b>Laktobacily</b>	<b>Bifidobakterie</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>

### 2.3.1 Kritéria pro výběr probiotických bakterií

Mikroorganismy určené k použití jako probiotika musí splňovat určitá kritéria pro výběr na základě bezpečnostních, technologických a funkčních charakteristik. Bezpečnost je jedním z nejdůležitějších kritérií výběru bakteriálních druhů (Gueimonde et al., 2013). Mikroorganismy pro probiotické použití by měly být lidského původu a izolovány ze zdravého lidského gastrointestinálního traktu, měly by být nepatogenní, netoxické a nesmí mít rezistence k antibiotikům (Saarela et al., 2000). Většina bakterií pro použití v probiotických produktech je izolována od lidí, aby se zvýšila pravděpodobnost kompatibility s lidským střevem a jeho mikrobiálními látkami a zlepšila se šance na přežití (Amund, 2016).

Technologická kritéria se zaměřují na začleňování probiotických mikroorganismů do potravinových produktů bez ztráty životaschopnosti (Lacroix et Yildirim 2007). Probiotické mikroorganismy vybrané pro začlenění do potravinářských produktů by měly zůstat naživu během podmínek výroby potravin a během skladování výrobku po dobu jeho trvanlivosti. Přidání probiotik do potravin by také nemělo ovlivňovat sensorické vlastnosti produktu (Sánchez et al., 2012).



Mikroorganismy pro probiotické využití musí být také schopné přežít prostředí trávicího traktu od ústní dutiny, přes žaludek až do střev (Lacroix a Yildirim 2007). Stresy způsobené průchodem trávicím traktem mohou ovlivnit jejich fyziologickou aktivitu a tím i jejich zamýšlenou funkčnost (Amund, 2016). Pochopení překonání stresových faktorů bakterií je nezbytné pro vhodný výběr probiotických druhů a vývoj nástrojů pro zlepšení jejich funkce (González-Rodríguez et al., 2013).

Očekávané vlastnosti a bezpečnostní kritéria pro probiotika: (Bunešová et al., 2015)

- Netoxické a nepatogenní
- Přesná taxonomická charakterizace a identifikace
- Mikroorganismus přirozeně se vyskytující u cílového hostitele
- Přežívání, kolonizace a metabolická aktivita v trávicím traktu hostitele, kdy je vyžadována:
  - Odolnost vůči žaludečním šťávám a žluči
  - Perzistence v gastrointestinálním traktu
  - Adheze na střevní epitel a hlen
  - Kompetice s rezidentní mikrobiotou
  - Produkce antimikrobiálních látek
  - Antagonismus vůči patogenním organismům
  - Modulace imunitní odpovědi
- Genetická stabilita
- Schopnost vyvinout alespoň jednu zdraví prospěšnou vědecky podpořenou vlastnost
- Poddajnost a stabilita kmene během zpracování, skladování a aplikace
- Životaschopnost ve vysokých počtech
- Žádoucí organoleptické a technologické vlastnosti

### **2.3.2 Faktory ovlivňující přežití probiotik při průchodu GIT**

Jednou z prvních bariér, na kterou požitá probiotická bakterie narazí v GIT, představuje kyselé prostředí v žaludku. Avšak při výrobě probiotik lze dosáhnout u vybraných probiotických bifidobakterií jisté tolerance vůči pH (González-Rodríguez et al., 2013). Vystavení účinkům nízkého pH ovlivňuje protonovou hybnou sílu, což má za následek

akumulaci  $H^+$  uvnitř buňky. V souladu s tím byla spojena nadprodukce podjednotek F0-F1-ATPázy, které proti této akumulaci reagují zvýšenou aktivitou vytlačováním  $H^+$  (Sanechez et al., 2008). Kromě toho bakterie také zvýší produkci aminokyselin s rozvětveným řetězcem a amoniaku, které zachycují protony a působí tak jako cytoplazmatický pufr. Adaptace na kyselé prostředí souvisí i s dalšími změnami, jako jsou změny metabolismu siřných aminokyselin, ačkoli jeho přesné spojení s adaptací zůstává nejasné (González-Rodríguez et al., 2013). Změny v povrchových vlastnostech ovlivňujících adhezi a fermentační schopnosti byly také spojeny se získáváním tolerance ke kyselému prostředí (Collado et Sanz, 2006).

Většina druhů bifidobakterií má přirozenou schopnost přežít roztoky obsahující pankreatin a pepsin (Masco et al., 2007). Přesné účinky trávicích enzymů na vlastnosti bifidobakterií však dosud nebyly popsány (González-Rodríguez et al., 2013).

V GIT bifidobakterie rovněž čelí enterickým antimikrobiálním peptidům, konkrétně defenzinům. Jsou součástí vrozeného imunitního systému u savců a přispívají k obraně hostitele před střevními mikrobiálními infekcemi. Bylo prokázáno, že některé myší defenziny jsou zvláště účinné proti patogenům, a nikoliv proti komenzálním mikroorganismům. Avšak tolerance bifidobakterií a jejich reakce na savčí defenziny nebyly příliš zkoumány (González-Rodríguez et al., 2013).

Je tedy zřejmé, že bifidobakterie musí mít specifické adaptační mechanismy na prostředí, ve kterém žijí, protože jsou klíčové pro úspěšnou kolonizaci GIT. Genetické pozadí genomu rodu *Bifidobacterium* naznačuje, že tato skupina mikroorganismů se vyvinula, aby využila zdroje energie, které lze nalézt ve střevě, pro člověka nestavitelné oligosacharidy (Bottacini et al., 2010). Dále tyto bakterie obsahují specifické detoxikační systémy pro škodlivé sloučeniny nacházející se ve střevě. Další výhodou těchto bakterií je, že jsou schopny přizpůsobit své enzymatické mechanismy, což vede ke zlepšení jejich schopnosti přežít a přetrvat v GIT (Sánchez et al., 2013).

Probiotické bakterie se v GIT setkávají ještě s jednou překážkou, která jim ztěžuje usídlení a kolonizaci střev, tzv. kolonizační rezistence, která funguje především jako obrana proti patogenním mikroorganismům. GIT je totiž hustě osídlen rezidentní mikrobiotou, která tvoří silný stabilní ekosystém, který plně využívá dostupné živiny pro svůj vlastní růst. Navíc je pro nové bakterie obtížné proniknout skrze silně kolonizovanou vnější vrstvu mucinu a uchytit se na střevní epitel. Tento jev omezuje vytvoření a růst kolonií bakterií procházejících GIT (Lawley et Walker, 2013). Díky mikrobiální kompetici o živiny, může dostupnost hostitelských a dietních sacharidů ve střevě ovlivnit složení mikrobioty (Kim et al., 2017).

### 2.3.3 Adheze

Adheze ke střevním povrchům je důležitá pro kolonizaci lidského střeva, protože zabraňuje eliminaci probiotik peristaltikou a poskytuje konkurenční výhodu oproti patogenům. Je to důležitý faktor, aby probiotika splnila očekávanou funkčnost, tedy aby se probiotické bakterie uchytily ve střevě a mohly tak pozitivně ovlivnit zdraví hostitele (Amund, 2016.)

Velmi málo prozkoumaný je molekulární základ interakce mezi hostitelským intestinálním epitelem a bifidobakteriemi. Předpokládá se, že bifidobakterie kódují struktury spojené s buněčnou stěnou, které mohou hrát klíčovou roli při určování interakce mezi mikroby a hostitelem. Vypadá to, že se jedná o extracelulární polysacharid nebo kapsulární polysacharid a může být důležitý při adhezi bakterií k hostitelským buňkám, nebo také může přispět k rezistenci na žaludeční a žlučové kyseliny (Ventura et al., 2004). Dalšími předpokládanými kódujícími strukturami bílkovinné povahy jsou struktury podobné fimbriím (Schell et al., 2002). Přestože dosud nebyla určena přesná role takových struktur u bifidobakterií, u jiných střevních bakterií bylo zjištěno, že zprostředkovávají mikrobiální adhezi a kolonizaci intestinálních epitelních buněk i jiných hostitelských buněk (Turroni et al., 2011).

Molekulární mechanismy, které jsou základem interakce mezi bifidobakterií a buňkami trávicího traktu, zůstávají z velké části nejasné a vědecké úsilí v této oblasti se zaměřilo na přilnavost a specifické rysy bakteriální buněčné stěny, které mohou být zapojeny do přímé nebo nepřímé interakce (Cronin et al., 2011). Přilnavost mikroorganismů k intestinální sliznici je důležitým rysem, který se podílí na kolonizaci a souvisí se schopností bakterií interagovat s hostitelem. Adhezní schopnost bakterií se také zdá být důležitá pro imunitní modulaci a kompetitivní vyloučení patogenů (González-Rodríguez et al., 2013).

Mechanismy adheze bakterií na gastrointestinální sliznici jsou složité a zahrnují jak nnespecifické jevy, jako jsou elektrostatické síly a hydrofobní interakce, tak i specifické jevy závislé na přítomnosti bakteriálních adhezínů a mukózních receptorů. Faktory, jako jsou vlastnosti a složení buněčné stěny a přítomnost adhezínů, tedy představují nejdůležitější determinanty schopnosti bakterie přilnout k sliznici. U bifidobakterií byly zjištěny oba typy mechanismů, specifické i nnespecifické. Přilnavost bifidobakterií k lidské střevní sliznici je tedy mnohostranným procesem, ve kterém se zdá, že hrají roli molekuly různé povahy, včetně proteinů, lipidů a sacharidů (Gueimonde et al., 2007). Navíc bylo zjištěno, že adhezi ovlivňuje i sám hostitel prostřednictvím pH, žluči a trávicích enzymů (de los Reyes-Gavilan et al., 2011). Na adhezi se hodně podílejí proteinové složky, především extracelulární proteiny, které jsou

navázány na povrch bakteriální buňky nebo uvolněny do prostoru. Některé z těchto proteinů mohou přímo interagovat s imunitními buňkami hostitele (González-Rodríguez et al., 2013).

Bylo prokázáno, že *in vitro* adheze bifidobakterií k lidským intestinálním epiteliálním buňkám se liší u jednotlivých druhů (Riedel et al., 2006). Kolonizace těmito bakteriemi je ovlivněna také faktory GIT, jako je přítomnost specifických sacharidů a žlučových kyselin a pH (Guglielmetti a kol., 2009).

#### **2.3.4 Prebiotika**

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravy, které slouží jako strava pro střevní mikrobiotu, tím mohou stimulovat růst prospěšných bakterií (Quigley, 2011). Prebiotika jsou často spojována s probiotiky kvůli lepšímu pozitivnímu účinku. Prebiotika podporují přežívání probiotik při průchodu trávicím traktem. Kombinace prebiotik a probiotik se nazývají synbiotika (Tidjani et al., 2016).

### **2.4 Rod *Bifidobacterium***

#### **2.4.1 Historie**

Bifidobakterie byly poprvé objeveny ve výkalech kojenců Tissierem, který bakterie izoloval a nazval je *Bacillus bifidus*. V roce 1917 Winslow navrhl tyto bakterie zařadit do čeledi *Lactobacillaceae* a o tři roky později je Holland pojmenoval *Lactobacillus bifidus*. V roce 1924 byly zařazeny do rodu *Lactobacillus* (Biavati et al., 2000). V 8. vydání Bergey's Manual of Determinative Bacteriology už byl vytvořen samostatný rod *Bifidobacterium*, který spadal pod čeleď *Actinomycetaceae* řádu Actinomycetales. Další korekce klasifikace byla provedena po zavedení elektroforézy, což vedlo k uznání 24 druhů uvedených v dalším vydání Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Stackebrand a kol. v roce 1997 prostřednictvím analýzy 16S rRNA navrhli vytvoření nové taxonomické jednotky, ve které zařadili rod *Bifidobacterium* s rodem *Gardnerella* do jedné čeledi *Bifidobacteriaceae* řádu Bifidobacteriales (Biavati et al., 2000).

**Tabulka č. 3: Seznam druhů a poddruhů rodu *Bifidobacterium* (Mattarelli et al., 2017)**

<b>Druh a poddruh</b>	<b>Prvně identifikováno v</b>	<b>Reference</b>
<i>B. actinocoloniiforme</i>	trávicí trakt čmeláka	Killer et al. (2011)
<i>B. aquikefiri</i>	kefír	Laureys et al. (2016)
<i>B. adolescentis</i>	bachor skotu, střeva dospělých	Reuter (1963)
<i>B. aerophilum</i>	výkaly tamarína pinčího	Michelini et al.
<i>B. aesculapii</i>	výkaly kosmana bělovousého	Modesto et al. (2014)
<i>B. angulatum</i>	lidské výkaly, kanalizace	Scardovi and
<i>B. animalis ssp. animalis</i>	kryší výkaly, kuřecí výkaly	Scardovi and
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	jogurt	Meile et al. (1997)
<i>B. asteroides</i>	trávicí trakt včel	Scardovi and
<i>B. avesanii</i>	výkaly tamarína pinčího	Michelini et al.
<i>B. biavatti</i>	výkaly tamarína žlutorukého	Endo et al. (2012)
<i>B. bifidum</i>	střeva dospělých, stolice kojených	Orla-Jensen (1924)
<i>B. bohemicum</i>	trávicí trakt čmeláka	Killer et al. (2011)
<i>B. bombi</i>	obsah trávicího traktu čmeláka	Killer et al. (2009)
<i>B. boum</i>	bachor skotu	Scardovi et al. (1979)
<i>B. breve</i>	střevo kojence	Reuter (1963)
<i>B. callitrichos</i>	výkaly kosmana bělovousého	Endo et al. (2012)
<i>B. catenulatum</i>	lidské výkaly, kanalizace	Scardovi and
<i>B. choerinum</i>	výkaly selete	Scardovi et al. (1979)
<i>B. commune</i>	trávicí trakt čmeláka	Praet et al. (2015)
<i>B. coryneforme</i>	trávicí trakt včel	Biavati et al. (1982)
<i>B. crudilactis</i>	syrové mléko a syrové mléčné	Delcenserie et al.
<i>B. cuniculi</i>	králičí výkaly	Scardovi et al. (1979)
<i>B. dentium</i>	zubní kaz	Scardovi and
<i>B. eulemuris</i>	výkaly lemura tmavého	Michelini et al.
<i>B. faecale</i>	výkaly kojence (2 týdny)	Choi et al. (2014)
<i>B. gallicum</i>	střeva dospělého	Lauer (1990)
<i>B. gallinarum</i>	slepé střevo kuřete	Watabe et al. (1983)

<i>B. hapali</i>	výkaly kosmana bělovousého	Michelini et al.
<i>B. indicum</i>	trávicí trakt včel	Scardovi and
<i>B. kashiwanohense</i>	výkaly zdravého dítěte (1,5 roku)	Morita et al. (2011)
<i>B. lemurum</i>	výkaly lemura katy	Michelini et al.
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	střeva kojence	Reuter (1963)
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	telecí výkaly, střeva dospělého	Reuter (1963)
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i>	prasečí výkaly	Matteuzzi et al.
<i>B. longum</i> ssp. <i>suillum</i>	prasečí výkaly	Mattarelli et al.
<i>B. magnum</i>	králičí výkaly	Scardovi and Zani
<i>B. merycicum</i>	bachor dobytka	Biavati and
<i>B. minimum</i>	kanalizace	Biavati et al. (1982)
<i>B. mongoliense</i>	mongolský nápoj vyrobené	Watanabe et al.
<i>B. moukalabense</i>	výkaly z divoké gorily nížinné	Tsuchida et al. (2014)
<i>B. pseudocatenulatum</i>	lidské výkaly, kanalizace	Scardovi et al. (1979)
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	bachor	Biavati et al. (1982)
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>	prasečí výkaly, kuřecí výkaly	Mitsuoka (1969)
<i>B. psychraerophilum</i>	slepé střevo prasete	Simpson et al. (2004)
<i>B. pullorun</i>	kuřecí výkaly	Trovatelli et al.
<i>B. ramosum</i>	výkaly tamarína pinčího	Michelini et al.
<i>B. reuteri</i>	výkaly kosmana bělovousého	Endo et al. (2012)
<i>B. ruminantium</i>	bachor dobytka	Biavati and
<i>B. saeculare</i>	králičí výkaly	Biavati et al. (1991)
<i>B. saguini</i>	výkaly tamarína žltorukého	Endo et al. (2012)
<i>B. scardovii</i>	lidská krev	Hoyles et al. (2002)
<i>B. stellenboschense</i>	výkaly tamarína žltorukého	Endo et al. (2012)
<i>B. subtile</i>	kanalizace	Biavati et al. (1982)
<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>porcinum</i>	výkaly ze selete	Zhe et al. (2003)

<i>B. thermacidophilum ssp. thermacidophilum</i>	odpadní voda z farmy	Dong et al. (2000)
<i>B. thermophilum</i>	prasečí výkaly, bachor skotu	Mitsuoka (1969)
<i>B. tissieri</i>	výkaly kosmana bělovousého	Michelini et al.
<i>B. tsurumiense</i>	zubní plak křečka	Okamoto et al.

#### 2.4.2 Charakteristika

Rod *Bifidobacterium* patří do čeledi *Bifidobacteriaceae*, řádu Bifidobacteriales, třídy Actinobacteria a kmene Actinobacteria, který představuje jednu z největších bakteriálních taxonomických jednotek (O'Callaghan et Van Sinderen, 2016). Dosud bylo do tohoto bakteriálního rodu zahrnuto 54 druhů s 10 poddruhy, které jsou uvedeny v tabulce č. 3. Bifidobakterie jsou klíčovými komenzály v lidském střevě a jsou spojeny se zdravím svých hostitelů (Songling et al., 2015). Mohou se vyskytovat v koncentracích vyšších než  $10^{10}$  buněk na gram výkalů. Mnohem více je najdeme u novorozenců a kojenců než u dospělých a starších lidí (Arboleya et al., 2011). Bifidobakterie tvoří jednu z hlavních bakteriálních populací u zdravých jedinců (Qin et al., 2010). Odhaduje se, že 1 – 3 % lidské intestinální mikrobioty průměrného dospělého člověka tvoří rod *Bifidobacterium*, který zahrnuje několik probiotických druhů (Ventura et al., 2004, Derrien et Van Hylckama Vlieg, 2015).

Bifidobakterie jsou nepohyblivé, nesporetvorné, striktně anaerobní bakterie (Cronin et al., 2011), ale existují i druhy s mírnou tolerancí ke kyslíku (Wilson, 2008). Pro tento rod je charakteristický vysoký obsah guaninu a cytosinu v genomu, minimum je 51 % (Turrone et al., 2011). Bifidobakterie jsou grampozitivní tyčinky, které se vyskytují jednotlivě nebo v řetízcích, některé druhy se mohou shlukovat (Wilson, 2008). Bifidobakterie jsou chemoorganotrofní, mají fermentační typ metabolismu (Felis and Dellaglio, 2007).

Jsou schopny množení v teplotním rozmezí 20 – 46 °C, jejich optimální teplota pro růst je 37 – 41 °C. Výjimkou je termofilní druh *B. thermacidophilum*, který je schopný růst i při teplotě 49,5 °C. (Dong et al., 2000). Bifidobakterie do určité míry tolerují kyselé prostředí, jejich ideální pH je 6,4 – 7. Nebyl zaznamenán růst žádného druhu při pH nižším než 4,5 a vyšším než 8,5 (Biavati et al., 2000).

### 2.4.3 Fyziologie

Bifidobakterie jsou sacharolytické organismy (Cronin et al., 2011). Fermentují širokou škálu sacharidů a umí hydrolyzovat různé polysacharidy, včetně škrobu, xylanu, pektinu, inulinu, arabské gumy a dextranu. Bifidobakterie degradují hexózy prostřednictvím specifického enzymu fruktóza-6-fosfoketolaza (EC 4.1.2.2). Tento enzym byl považován za taxonomickou charakteristiku pro identifikaci na úrovni rodu, ale kvůli reklasifikaci druhů *Bifidobacterium* do nových rodů ho lze považovat za taxonomický marker pro čeleď *Bifidobacteriaceae* (Felis a Dellaglio, 2007). Kromě toho je aktivita bifidobakterií spojována s produkcí řady metabolitů podporujících zdraví, včetně mastných kyselin s krátkým řetězcem, konjugované kyseliny linolové a bakteriocinů (Arboleya et al., 2016). Také mohou hydrolyzovat proteiny a peptidy (Wilson, 2008).

Produkují řadu enzymů, které jsou důležité při degradaci mucinů, včetně sialidáz,  $\alpha$ - a  $\beta$ -glykosidáz,  $\alpha$ - a  $\beta$ -d-glukosidáz,  $\alpha$ - a  $\beta$ -d-galaktozidáz a  $\beta$ -d-fukosidázy (Wilson, 2008). Bifidobakterie mohou produkovat řadu vitaminů B, včetně thiaminu (B1), pyridoxinu (B6), kyseliny listové (B11) a kyseliny nikotinové (B3), některé druhy také obsahují geny pro riboflavin (B2) (Turroni et al., 2009).

### 2.4.4 Výskyt

Druhy bifidobakterií obývají běžně celý trávicí trakt teplokrevných živočichů, ale i hmyzu se sociálním způsobem života, jsou součástí vaginální mikrobioty, přidávají se do potravin, byly nalezeny i v odpadních vodách (Russell et al., 2011). Každý jedinec má jedinečné složení střevní mikrobioty (Ley et al., 2006), je kolonizován omezeným počtem druhů bifidobakterií, tyto druhy přetrvávají v dané osobě po poměrně dlouhou dobu (Wilson, 2008). Druhy vyskytující se u lidí byly identifikovány jako *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum subsp. longum* a *subsp. infantis*, *B. pseudolongum subsp. pseudolongum* (Russell et al., 2011) a *B. animalis subsp. lactis* (Turroni et al., 2011).

Druhy vyskytující se v GIT zvířat představují především *B. pseudolongum*, *B. thermophilus* a *B. animalis*. Některé druhy jsou specifické pro hostitele, například *B. magnum* a *B. cuniculi*, které byly nalezeny pouze ve vzorcích výkalů králíků, *B. pullorum*



a *B. gallinarum* v kuřecím střevě a *B. longum* subsp. *suis* pouze v trusu prasat. *B. minimum* a *B. subtile* byly identifikovány pouze v odpadních vodách (Russell et al., 2011).

### **3 Hypotéza**

Kolonizace nastává hned po narození a je ovlivňována mnoha faktory jako je způsob porodu, mikrobiota matky, prostředí a strava. Stravu pro mláďata savců představuje především mateřské mléko, které by mohlo být možným zdrojem bifidobakterií pro kolonizaci trávicího traktu bifidobakteriemi. Předpokládáme, že bifidobakterie původně izolované z trávicího traktu telat budou schopny kolonizovat tlusté střevo, ústní dutinu a mléčnou žlázu dojnic.

### **4 Cíl práce**

Cílem diplomové práce je popsat faktory ovlivňující kolonizaci trávicího traktu člověka, ale i dalších živočichů probiotickými bakteriemi. Na základě stanovené hypotézy, je dalším cílem sledování schopnosti podaných bifidobakterií kolonizovat tlusté střevo, dutinu ústní a případně i mléko dojnic.

## 5 Materiál a metody

Experiment probíhal na farmě mléčného skotu Vítězslava Škody ve Vražkově. V pokusu byla sledována kráva holštýnsko-fríského plemene. Krávě bylo podáno 250 ml mléka prokysaného kmenem *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* 23II. Po prokysání mléko obsahovalo  $10^8$  KTJ/ml (stanoveno kultivační metodou). Mléko bylo podáváno spolu s krmivem jednou denně po dobu 5 dnů. Pro stanovování bakterií byly odebrány vzorky výkalů, mléka a zubního stěru před podáním probiotik (kontrola), dále pak 4., 8. a 11. den od prvního podání probiotik. Přežívání podaného bifidobakteriálního kmenu a ovlivnění dalších skupin bakterií trávicího traktu bylo stanoveno kultivačně na selektivních médiích.

### 5.1 Výběr vhodného probiotického kmenu

Bifidobakterie, které byly podány krávě jako probiotika, byly vybrány na základě předchozích studií, které byly zaměřené na výběr vhodných bifidobakterií jako probiotik pro skot. V těchto studiích bylo testováno *in vitro* 30 kmenů bifidobakterií, které byly odebrány z výkalů telat. Pokud bifidobakterie pocházejí z mikrobioty tlustého střeva stejného živočišného druhu, kterému jsou podávána, je větší šance na zachování jejich životaschopnosti při průchodu trávicím traktem a jejich následnou kolonizaci. Vybrané kmeny byly posuzovány na základě probiotických kritérií jako je odolnost vůči žluči, odolnost vůči nízkému pH, jejich autoagregační aktivita a schopnost adherence ke střevnímu epitelu. Na základě výsledků těchto testů bylo vybráno 10 kmenů, které byly dále testovány *in vivo*. Kmeny bifidobakterií byly identifikovány pomocí metod API, PCR a 16S rDNA (Bunešová et al., 2010).

Kmen *B. animalis* ssp. *animalis* 23II byl odolný vůči nízkému pH a žluči. Pro stanovení tolerance pH byla bakteriální suspenze smíchána s 2 ml pufru o pH 3 (PBS, pH upravené pomocí HCl). Pro test žlučové tolerance byla smíchána s 2 ml PBS pufru (pH 7,2) obsahujícího 1,5 % žlučového extraktu. Pro kontrolu se k bakteriální suspenzi přidaly 2 ml PBS pufru (pH 7,2). Bakteriální suspenze byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 1 a 2 hodin (test tolerance pH), 2 a 3 hodiny (test tolerance žluči) a 0 a 3 hodiny (kontrola). Počty životaschopných bakterií byly stanoveny pomocí kultivační metody a spočítání narostlých kolonií (Vlková et al., 2009).

Kmen *B. animalis* ssp. *animalis* 23II vykazoval dobrou autoagregační aktivitu. Při jejím testování byla bifidobakteriální kultura přes noc inkubována s protřepáváním při 37 °C.

Po inkubaci byla v časech 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 a 5 hodin měřena absorbance při 600 nm (A600) Autoagregační schopnost byla vyjádřena jako procento autoagregace po 5 hodinách inkubace (Vlková et al., 2008a).

Následně se provedlo testování přežívání kmene *B. animalis* ssp. *animalis* 23II spolu s dalšími 9 kmeny v *in vivo* podmínkách trávicího traktu telat. Pro odlišení testovaných kmenů bifidobakterií od ostatních bifidobakterií, které se běžně vyskytují v trávicím traktu, byly vytvořeny rifampicin rezistentní mutanti (RRBIF) gradientovou deskovou metodou. Rifampicin byl zvolen z toho důvodu, že odolnost bifidobakterií na něj je vzácná. Do Petriho misky byl nalit živný agar, miska se mírně naklonila a agar se nechal ztuhnout, poté se miska postavila rovně a zalila se agarem, do kterého byl přidán rifampicin (100 mg/l) a nechal se zatuhnout, vytvořil se antibiotický gradient. Na ztuhlý agar se naočkoval vybraný kmen. Po kultivaci byly RRBIF izolovány z oblasti s nejvyšší koncentrací rifampicinu (Vlková et al., 2009). Rifampicin rezistentní varianty kmenů bifidobakterií byly podány ve formě kysaného mléka a následně bylo jejich přežívání sledováno kultivačně na selektivním médiu s obsahem rifampicinu. Kmen *B. animalis* ssp. *animalis* 23II vykazoval nejlepší schopnost dočasně kolonizovat trávicí trakt telat (Bunešová et al., 2010), proto byl vybrán jako nejvhodnější pro testování v rámci této diplomové práce.

## 5.2 Příprava kultivačních médií

Pro stanovení bakterií bylo připraveno 5 různých kultivačních médií. Jednalo se o Wilkins-Chalgren agar (Oxoid), který se použil pro stanovení celkového počtu anaerobních bakterií. Pro kultivaci bifidobakterií byly použité dva typy agarů (agar B a agar N), oba měly stejné složení jako Wilkins-Chalgren agar, ale navíc do agaru B se přidala ledová kyselina octová (1 ml/l) a mupirocin (100 mg/l), do agaru N se přidala ledová kyselina octová (1 ml/l), mupirocin (100 mg/l) a norfolxacín (200 mg/l). Pro rifampicin rezistentní bifidobakterie se použil agar B navíc s přidáním rifampicinu (100 mg/l). Pro kultivaci laktobacilů byl použit Rogosa agar (Oxoid). Pro stanovení *E. coli* a koliformní bakterie byl připraven TBX agar (Oxoid) Složení jednotlivých agarů je uvedeno v tabulkách č. 4, 5 a 6 (Vlková et al., 2010; Vlková et al., 2015).

**Tabulka č. 4: Složení Wilkins-Chalgren agaru**

<b>Látka</b>	<b>Množství</b>
Trypton	10 g
Pepton želatiny	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukosa	1 g
NaCl	5 g
L-arginin	1 g
Pyruvát sodný	1 g
Menadion	0,5 mg
Hemin	5 mg
Voda	1000 ml
Agar	10 g
Sojový pepton	5 g
Cystein	0,5 g
Tween	1 ml

**Tabulka č. 5: Složení Rogosa agaru**

Látka	Množství
Trypton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukosa	20 g
Tween	1 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Citrát amonný	2 g
Acetát sodný	17 g
MgSO <sub>4</sub>	0,575 g
MnSO <sub>4</sub>	0,12 mg
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	34 mg
Agar	20 g
Voda	1000 ml

**Tabulka č. 6: Složení TBX agaru**

Látka	Množství
Trypton	20 g
Žlučové soli	1,5 g
X-glukuronid	75 mg
Agar	15 g
Voda	1000 ml

### 5.3 Kultivace

Vzorky byly odebírány do zkumavek s anaerobním fyziologickým roztokem. Vzorek byl zvážen. Prošel homogenizací pomocí vortexu. Byla vytvořena ředící řada desítkového ředění až do ředění 10<sup>-9</sup>. Ve vialkách ředící řady se nachází Wilkins-Chalgren bujón (Oxoid), který byl připraven metodou roll-tube (anaerobní prostředí vytvořené probubláváním média oxidem uhličitým), jeho složení je uvedeno v tabulce č. 7. Zředěné vzorky byly převedeny

na Petriho misky a ihned zalaty agarem. Vše probíhalo asepticky, aby se předešlo možné kontaminaci z prostředí.

Kultivace bifidobakterií a celkových počtů anaerobních bakterií probíhala anaerobně při 37 °C 48 hodin. Pro vytvoření anaerobní atmosféry byly misky umístěné do anaerostatu s vyvíječem anaerobní atmosféry (Anaerogen, Oxoid). Laktobacily se kultivovaly při 37 °C 48 hodin v mikroaerofilním prostředí, které bylo zajištěno dvojí vrstvou agaru. Suspenze bakterií v Petriho misce byla zalita agarem a po jeho zatuhnutí byla přelita další vrstvou agaru. Po zatuhnutí se misky umístily do termostatu dnem vzhůru. Bakteriální suspenze pro kultivaci koliformních bakterií se nanasla na předem nalitý a ztuhlý agar, na jehož povrchu byla rozetřena pomocí sterilní mikrobiologické hokejky. Kultivace probíhala aerobně při 37 °C 24 hodin, misky byly umístěny dnem vzhůru (Vlková et al., 2010).

**Tabulka č. 7: Složení Wilkins-Chalgren bujónu**

Látka	Množství
Trypton	10 g
Pepton želatiny	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukosa	1 g
NaCl	5 g
L-arginin	1 g
Pyruvát sodný	1 g
Menadion	0,5 mg
Hemin	5 mg
Voda	1000 ml

#### **5.4 Kultivace vzorků mléka**

V odebraných vzorcích mléka se očekávala velmi nízká koncentrace RRBIF, kultivační metodou na selektivním agaru by tedy nebyly stanoveny, proto byl 1 ml vzorku přidán do 10 ml modifikovaného Wilkins-Chalgrens bujónu s přidáním ledové kyseliny octové (1 ml/l), mupirocinem (100 mg/l) a rifampicinem (100 mg/l). Přidání rifampicinu potlačuje růst ostatních kmenů bifidobakterií, pokud by se ve vzorku nacházely RRBIF, došlo by jejich

nárůstu a jejich snadnějšímu stanovení. Kultivace probíhala 24 hodin při 37 °C. Poté byl potenciální nárůst zkontrolován mikroskopicky a pomocí fruktoso-6-fosfát fosfoketolázového testu.

## 5.5 Vyhodnocení

Po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie. Konečné hodnoty byly přepočteny a vyjádřeny jako počet kolonie tvořících jednotek/g [KTJ/g]. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí ANOVY v programu Statistica12. Narostlé kolonie bifidobakterií byly zkontrolovány mikroskopicky a pomocí fruktoso-6-fosfát fosfoketolázového testu.

## 5.6 Detekce enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolázy (F6PPK test)

Bifidobakterie štěpí hexosy pomocí specifického enzymu F6PPK. Pro jeho detekci je nutné nejdříve narušit bakteriální buňky, aby se jejich obsah spolu s intracelulárními enzymy vylil do roztoku. K roztoku se dále přidají činidla, která způsobí jeho zbarvení. Pokud buňka obsahuje F6PPK, je fruktoso-6-fosfát tímto enzymem štěpen na erytroso-4-fosfát a acetyl-1-fosfát, který reaguje s  $\text{FeCl}_3$  za vzniku komplexní sloučeniny, která má fialové zbarvení. Při pozitivní reakci tedy dochází k vytvoření fialového zbarvení a izolát může být označen jako rod *Bifidobacterium*. Pro kontrolu správnosti provedení je vhodné stanovovat zároveň aktivitu F6PPK u typového kmene rodu *Bifidobacterium* jako pozitivní kontrolu a jiného příbuzného rodu jako negativní kontrolu (např. *Lactobacillus*).

Pro fosfoketolázový test byla použita činidla:

Roztok 1 (fosfátový pufr): 0,12 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,33 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 g cystein; 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Roztok 2: roztok NaF (0,6 g/100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ), Na-iodoacetát (1 g/100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

Roztok 3: roztok hydroxylaminu (13,9 g/100 ml), pH 6,5 (NaOH)

Roztok 4: 15% roztok TCA (trichloroctové kyseliny)

Roztok 5: 4 M HCl

Roztok 6: roztok  $\text{FeCl}_3$  (5 g/100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; + 310  $\mu\text{l}$  HCl)

Roztok 7: fruktoso-6-fosfát (substrát pro působení enzymu, 1 dávka = 6,6 mg/0,02 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )



Roztok 8: roztok detergentu cetrídium bromidu (CTAB, 45 mg//100 ml H<sub>2</sub>O)

Pro testování bylo použito 10 ml kultury kultivované 24 hodin ve Wilkings-Chalgren bujónu (Oxoid). Následně byl testovaný materiál přelit do zkumavek a centrifugován po dobu 8 minut při 9000 ot/min při teplotě 20° C. Poté byl slit supernatan a vzorky byly propláchnuté roztokem 1 a v 0,5 ml téhož roztoku byly rozpuštěny. Bylo přidáno 200 µl roztoku 8 a 5 minut byly kultivovány při pokojové teplotě. Následně bylo do vzorků napipetováno 200 µl roztoku 2 a 200 µl roztoku 7. Vzorky byly řádně promíchány a umístěny na 30 minut do vodní lázně o teplotě 37°C. Po vyjmutí z vodní lázně bylo přidáno 750 µl roztoku 3 a inkubováno 10 minut při pokojové teplotě. Nakonec se postupně přidalo 500 µl roztoku 4, 5 a 6. Test byl posléze vyhodnocen na základě zbarvení roztoku, při pozitivní reakci dochází k fialovému zbarvení, při negativní se roztok zbarví žlutě (Orban et Patterson, 2000).

## 6 Výsledky

Po podání probiotik ve formě fermentovaného mléka byly odebrány vzorky výkalů, mléka a stěru zubů, ve kterých byly kultivační metodou sledovány celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterií, rifampicin rezistentních bifidobakterií, laktobacilů, *E. coli* a koliformních bakterií.

### 6.1 Počty bakterií ve výkalech

Počty bakterií jsou uvedeny v tabulce č. 8. Ve výkalech byl stanoven celkový počet anaerobních bakterií před podáním probiotik  $7,85 \pm 0,06$  log KTJ/g. V průběhu podávání probiotik i po jeho ukončení nebyly zaznamenány výrazné rozdíly v celkových počtech anaerobních bakterií. Počty laktobacilů ve výkalech se pohybovaly v rozmezí  $10^4$  až  $10^6$  KTJ/g. *E. coli* byly detekovány před podáním probiotik ve výkalech v počtu  $5,57 \pm 0,09$  log KTJ/g, 4. den v podobném počtu  $5,02 \pm 0,05$  log KTJ/g, 8. a 11. den jen v počtu pod  $10^4$  KTJ/g. Koliformní bakterie byly stanoveny před podáním v počtu  $5,25 \pm 0,09$  log KTJ/g, v posledním odběru vzorků v nižším počtu  $4,33 \pm 0,58$  log KTJ/g. Počty bifidobakterií ve výkalech jsou uvedeny v tabulce č. 9 a znázorněny pomocí grafu (Graf č. 1). Bifidobakterie byly stanoveny na dvou typech agarů. Rozdíl v jejich selektivě byl minimální, počty po celou dobu experimentu byly  $10^7$  KTJ/g, rozdíly v počtu bifidobakterií na agaru B a agaru N nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). RRBIF ve výkalech nebyly před podáním probiotik vůbec detekovány, stejně tak 11. den. 4. den byly stanoveny v počtu  $5,19 \pm 0,04$  log KTJ/g, 8. den v počtu  $3,11 \pm 0,16$  log KTJ/g. Podávání RRBIF statisticky neovlivnilo celkový počet bifidobakterií na obou typech agarů ( $p > 0,05$ ).

**Tabulka č. 8: Průměrné hodnoty počtu bakterií ve výkalech (uvedené v log KTJ/g ± směrodatná odchylka; n = 3)**

Výkaly	CP	LB	EC-M	EC-B
<b>Před podáním</b>	7,85 ± 0,06	5,35 ± 0,13	5,57 ± 0,09	5,25 ± 0,09
<b>4. den</b>	7,90 ± 0,16	6,15 ± 0,17	5,02 ± 0,05	5,93 ± 0,21
<b>8. den</b>	7,73 ± 0,37	4,17 ± 0,15	<4	<4
<b>11. den</b>	8,09 ± 0,25	5,22 ± 0,11	<4	4,33 ± 0,58

CP = celkové počty anaerobních bakterií

LB = laktobacily

EC-M = *E. coli*

EC-B = koliformní bakterie

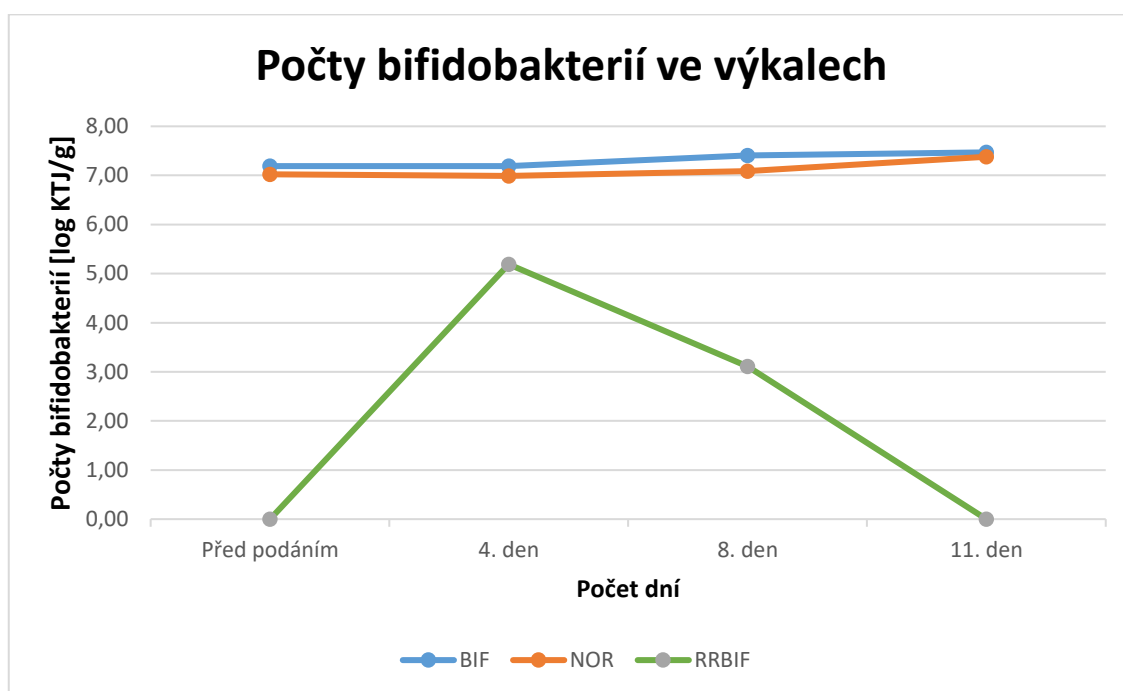
**Tabulka č. 9: Průměrné hodnoty počtu bifidobakterií ve výkalech (uvedené v log KTJ/g ± směrodatná odchylka, n = 3)**

Výkaly	BIF	NOR	RRBIF
<b>Před podáním</b>	7,19 ± 0,06	7,02 ± 0,03	<1
<b>4. den</b>	7,19 ± 0,25	6,99 ± 0,06	5,19 ± 0,04
<b>8. den</b>	7,41 ± 0,24	7,09 ± 0,06	3,11 ± 0,16
<b>11. den</b>	7,47 ± 0,13	7,38 ± 0,03	<1

BIF = bifidobakterie kultivované na agaru B

NOR = bifidobakterie kultivované na agaru N

**Graf č. 1: Grafické znázornění počtu bifidobakterií v průběhu pokusu**



## 6.2 Počty bakterií v zubním stěru

Celkové počty anaerobních bakterií byly v průběhu celého pokusu v počtu  $10^6$  KTJ/g (tabulka č. 10). Laktobacily se vyskytovaly v zubním stěru po celou dobu v počtu  $10^4$  KTJ/g. *E. coli* byly stanoveny v počtu pod  $10^2$  KTJ/log, pouze poslední den v mírně vyšším počtu  $2,33 \pm 0,58$  log KTJ/g. Koliformní bakterie byly v průběhu sledování stabilní v počtu  $10^5$  KTJ/g. U počtu bifidobakterií byl jen zanedbatelný rozdíl v počtech při kultivaci na agaru B a agaru N. V průběhu experimentu došlo k viditelnému nárůstu bifidobakterií po podání probiotik z hodnoty  $3,10 \pm 0,12$  log KTJ/g na počet  $4,67 \pm 0,10$  log KTJ/g (tabulka č. 11 a graf č. 2). 11. den se projevil pokles bifidobakterií na  $3,15 \pm 0,13$  log KTJ/g. Rozdíly v počtu bifidobakterií na agaru B a agaru N nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). RRBIF nebyly před podáním probiotik detekovány stejně tak i 11. den. V průběhu podávání byly stanoveny v počtu  $4,75 \pm 0,1$  log KTJ/g. Podávání RRBIF statisticky ovlivnilo celkový počet bifidobakterií na agaru B i N ( $p < 0,05$ ).

**Tabulka č. 10: Průměrné hodnoty počtu bakterií v zubním stěru (uvedené v log KTJ/g ± směrodatná odchylka, n = 3)**

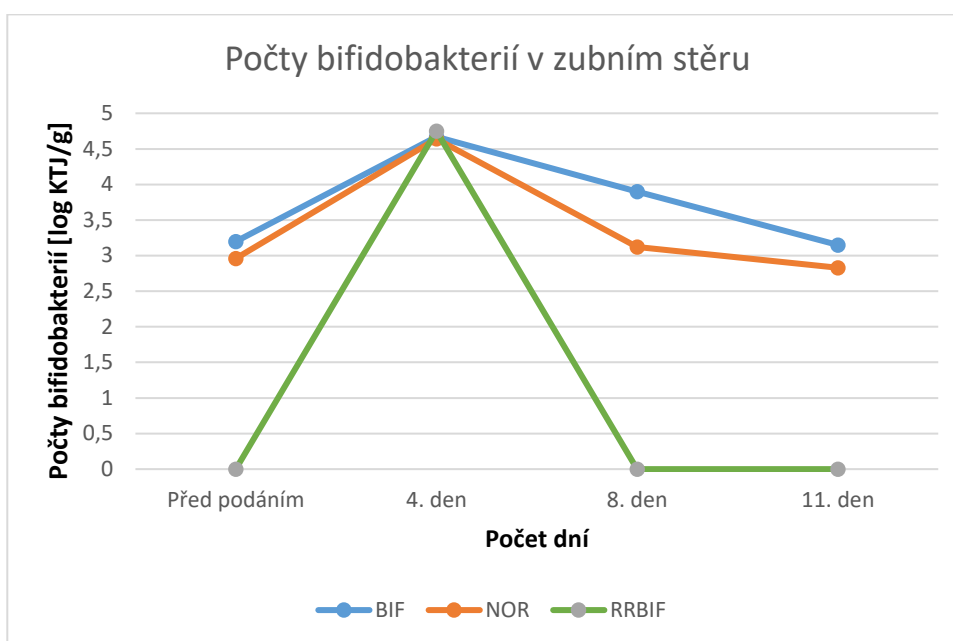
Zubní stěr	CP	LB	EC-M	EC-B
Před podáním	6,11 ± 0,12	4,25 ± 0,17	<2	5,86 ± 0,16
4. den	6,26 ± 0,11	4,66 ± 0,25	<2	5,68 ± 0,20
8. den	6,46 ± 0,41	4,54 ± 0,05	<2	5,53 ± 0,06
11. den	6,09 ± 0,10	4,81 ± 0,16	2,33 ± 0,58	5,38 ± 0,19

**Tabulka č. 11: Průměrné hodnoty počtu bifidobakterií v zubním stěru (uvedené v log KTJ/g ± směrodatná odchylka, n = 3)**

Zubní stěr	BIF	NOR	RRBIF
Před podáním	3,10 ± 0,12 <sup>A</sup>	2,96 ± 0,06 <sup>A</sup>	<1 <sup>A</sup>
4. den	4,67 ± 0,10 <sup>B</sup>	4,64 ± 0,10 <sup>B</sup>	4,75 ± 0,10 <sup>B</sup>
8. den	3,90 ± 0,11 <sup>A</sup>	3,12 ± 0,23 <sup>A</sup>	<1 <sup>A</sup>
11. den	3,15 ± 0,13 <sup>A</sup>	2,83 ± 0,06 <sup>A</sup>	<1 <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými indexy se statisticky významně liší (p < 0,05).

**Graf č. 2: Grafické znázornění počtu bifidobakterií v zubním stěru**



### 6.3 Počty bakterií v mléce

Celkové počty anaerobních bakterií se pohybovaly v rozmezí  $10^3$  až  $10^4$  KTJ/g. Laktobacily, *E. coli*, koliformní bakterie i bifidobakterie se vyskytovaly v počtu pod  $10^2$  KTJ/g. Počty bakterií jsou uvedeny v tabulce č. 12, bifidobakterie v tabulce č. 13. Rozdíly v počtu bifidobakterií na agaru B a agaru N nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). Podávání RRBIF statisticky neovlivnilo celkový počet bifidobakterií ( $p > 0,05$ ).

**Tabulka č. 12: Průměrné hodnoty počtu bakterií v mléce (uvedené v log KTJ/g  $\pm$  směrodatná odchylka, n = 3)**

Mléko	CP	LB	EC-M	EC-B
Před podáním	3,48 $\pm$ 0,10	<2	<2	<2
4. den	3,27 $\pm$ 0,02	<2	<2	<2
8. den	4,17 $\pm$ 0,07	<2	<2	<2
11. den	3,11 $\pm$ 0,43	<2	<2	<2

**Tabulka č. 13: průměrné hodnoty počtu bifidobakterií v mléce (uvedené v log KTJ/g ± směrodatná odchylka, n = 3)**

<b>Mléko</b>	<b>BIF</b>	<b>NOR</b>	<b>RRBIF</b>
<b>Před podáním</b>	<2	<2	<1
<b>4. den</b>	<2	<2	<1
<b>8. den</b>	<2	<2	<1
<b>11. den</b>	<2	<2	<1

#### **6.4 Fruktoso-6-fosfát fosfoketalasový test mléka**

Při mikroskopickém pozorování vzorku mléka kultivovaného v modifikovaném bujónu s přídavkem rifampicinu nebyly pozorovány žádné bifidobakterie. Při fruktoso-6-fosfát fosfoketalasovém testu došlo ke žlutému zbarvení, test byl negativní. Ve vzorku mléka se nevyskytovaly žádné RRBIF.

## 7 Diskuze

Střevní mikrobiota představuje složité společenství bakterií a dalších mikroorganismů, které významně ovlivňuje zdraví člověka. Složení střevní mikrobioty je velmi individuální. Narušení nebo změny mikrobioty jsou spojovány s řadou onemocnění jako je například syndrom dráždivého střeva, kardiovaskulární choroby, vysoká hladina cholesterolu, diabetes, astmata i řada psychických poruch. Mikrobiota se rozvíjí bezprostředně po narození. Její vytvoření je komplexní proces, který je ovlivněn řadou vnějších i vnitřních faktorů a interakcemi mezi mikroby a hostitelem. Mezi důležité faktory vývoje mikrobioty patří způsob porodu a strava (Moro et Arslanoglu, 2005). Prvními kolonizátory střev jsou fakultativně anaerobní bakterie, které spotřebují kyslík, čímž se vytvoří vhodné prostředí pro anaerobní bakterie, mezi které patří i rod *Bifidobacterium*, který při správné stravě dominuje kojenecké mikrobiotě. Jeho vysoká hladina má pozitivní vliv na zdraví hostitele, především snížením výskytu střevních infekcí a průjmů, bariérou proti patogenům, správným vývojem imunitního systému (LoCascio et al, 2009).

Biasucci et al., 2010 zkoumali vliv porodu na složení mikrobioty pomocí PCR. Jejich výsledky ukázaly, že děti NČŘ měli nižší počty rodů *Bifidobacterium* a *Bacteroides* a byly častěji kolonizovány *Clostridium difficile* oproti kojencům NVP. Navíc u dětí narozených ČŘ dochází k pozdější kolonizaci bifidobakteriemi oproti dětmi NVP. Na rozdíl od NVP děti vykazují střevní mikrobiota kojenců NČŘ výrazně menší podobnost s fekální mikrobiotou jejich matek (Bäckhed et al., 2015). Toto tvrzení potvrzuje Makino et al, 2013, kteří zjistili, že 72 % raných kolonizátorů VP narozených dětí bylo nalezeno ve stolici matky. Zatímco u dětí NČŘ to bylo jen 41 %.

Dalším důležitým faktorem, který moduluje střevní mikrobiotu je strava. Strava kojenců představuje nejčastěji mateřské mléko. Z různých důvodů však v některých případech není možné krmit kojence mateřským mlékem, proto je nahrazeno umělou výživou určenou pro kojence. V řadě studií je prokázán rozdíl ve vývoji a složení mikrobioty v závislosti na typu stravy (Bäckhed et al., 2015). Locasio et al., 2009 uvádí, že u výhradně kojených dětí mohou bifidobakterie představovat až 90 % střevní mikrobioty, zatímco střevní mikrobiota u kojenců na umělé výživě je více komplexnější a podobá se střevní mikrobiotě dospělého člověka. Dále bylo u kojenců na umělé výživě pozorováno ve vyšším počtu *Clostridium*, *Bacteroides* a *Enterobacteriaceae* oproti kojeným dětem. Ve většině případů se u nich bifidobakterie vyskytují v desetkrát menším počtu než u kojených (Moro et Arslanoglu, 2005).



Na základě těchto rozdílů bylo zkoumáno složení mateřského mléka. Aby se našly složky, které podporují růst bifidobakterií, mohly se jimi obohatit umělá výživa určená pro kojence. Mateřské mléko představuje ideální stravu pro kojence díky svému unikátnímu složení. Mléko obsahuje několik antimikrobiálních molekul, jako jsou enzymy, peptidy a lipidy, které omezují kolonizaci určitých patogenních bakterií a tím umožňují růst prospěšných bakterií (Sela, 2011). Po bílkovinách, lipidech a laktóze jsou nejvíce zastoupenou složkou oligosacharidy. V mateřském mléce jich bylo identifikováno více než 200 a představují důležitý faktor pro podporu správného vývoje střevní mikrobioty, z toho důvodu jsou označovány jako bifidogenní faktor. Nejvíce totiž slouží jako selektivní strava pro bifidobakterie, které díky jejich dostatečnému příjmu mohou hojně kolonizovat tlusté střevo. Pozorování tohoto bifidogenního účinku mateřského mléka vedlo k výzkumu, který prokázal odolnost oligosacharidů mateřského mléka (OMM) vůči enzymatickému trávení v horní části trávicího traktu (Moro et Arslanoglu, 2005). Fermentační studie *in vitro* prokázala, že rozklad OMM vyžaduje rozsáhlou sérii glykosidových hydroláz, které se v tenkém střevě kojence nenachází, proto OMM prochází až do tlustého střeva v nepozměněné formě, kde slouží jako zdroj energie pro mikrobiotu (Marcobal et Sonnenburg, 2012). OMM jsou tedy charakteristické prebiotickými účinky. OMM podporují prospěšnou interakci mezi bifidobakteriemi a intestinálním epitelem, což vede ke snížené expresi zánětlivých genů a přispívá k udržení integrity střevní sliznice (Wickramasinghe et al., 2015).

Mateřské mléko bylo tradičně považováno za sterilní. Nedávno několik studií ukázalo, že kolostrum a mateřské mléko obsahuje bakterie. V mateřském mléce byl stanoven celkový počet bakterií pod  $10^3$  KTJ/ml (Perez et al., 2007). První popisy bakteriální rozmanitosti mateřského mléka u zdravých žen byly založeny na použití kultivačních médií a ukázaly převahu stafylokoků, streptokoků, bakterií mléčného kvašení (BMK), propionibakterií. Skutečnost, že bakterie byly izolovány z čerstvého mléka zdravých žen, naznačuje, že jejich přítomnost je běžná, měly by být tedy považovány jako součást přirozené mikrobioty lidské prsní žlázy, a ne jako pouze přechodnou bakteriální kontaminaci. Mikrobiota prsní žlázy se začíná objevovat v posledním trimestru těhotenství, největšího rozvoje dosahuje na konci tohoto období, zůstává poměrně konstantní během laktace. Při odstavení prudce klesá a velmi rychle zmizí úplně, když dojde k ukončení tvorby mléka a involuci prsní žlázy (Fernández et al., 2013)

Mateřské mléko by mohlo být zdrojem prospěšných bakterií pro utváření střevní mikrobioty dítěte. Vliv těchto bakterií na střevní mikrobiotu dítěte je zatím předmětem

výzkumu (Gomez-Gallego et al., 2016). Původ bakterií přítomných v mateřském mléce se v posledních letech stal kontroverzním tématem. Nálezy bakterií v mléce byly spojovány s onemocněním a záněty, proto bylo analyzováno pouze na přítomnost patogenních bakterií (Fernández et al., 2013). Teprve nález nepatogenních bakterií vedl k dalšímu výzkumu mikrobioty mléka. Předpokládalo se, že docházelo ke kontaminaci bakteriemi z kůže nebo z dutiny ústní kojence. Infračervené fotografování ukázalo, že během kojení dochází k určitému retrográdnímu toku mléka zpět do mléčných kanálků. Je zřejmé, že takovýto zpětný tok může poskytnout ideální způsob výměny bakterií z dutiny ústní dítěte do mléčné žlázy. Stejně tak ale může být mateřské mléko zdrojem bakterií pro mikrobiotu dutiny ústní kojence. Teorie o možném endogenním původu těchto bakterií v mléce vychází z nálezů anaerobních bakterií, které v aerobních podmínkách nejsou schopny přežít.

Cílem této práce bylo otestovat schopnost bifidobakterií kolonizovat dutinu ústní, trávicí trakt a mateřské mléko. K testování byl využit zvířecí model, konkrétně laktující kráva, které byly podány bifidobakterie, ze kterých byly vytvořeny rifampicin rezistentní mutanti, aby byly snadno odlišitelné od ostatních bifidobakterií, které se nachází v trávicím traktu. Jejich schopnost přežití průchod trávicím traktem byla vyhodnocena kultivační metodou na specifických pěstebních půdách. RRBIF byly ve výkalech stanoveny v počtu  $5,19 \pm 0,04$  log KTJ/g 4. den pokusu a  $3,11 \pm 0,16$  log KTJ/g 8. den pokusu. Jejich možný transport endogenní cestou do mateřského mléka se ale nepotvrdil, v mléku RRBIF nebyly vůbec nalezeny. Byla ale zjištěna schopnost RRBIF kolonizovat dutinu ústní, RRBIF byly stanoveny v počtu  $4,75 \pm 0,10$  log KTJ/g 4. den pokusu. Naše výsledky tedy podporují hypotézu o možné zpětné kontaminaci mléka z dutiny ústní kojence. Tento výsledek je podpořen studií, ve které byla testována přítomnost bifidobakterií v mateřském mléku. Analyzovány byly dvě skupiny žen, první skupina byla zastoupena 18 ženami, u jejichž dětí byly nalezeny bifidobakterie ve výkalech. Druhá skupina představovala 43 žen u jejichž dětí nebyly nalezeny bifidobakterie. Přítomnost bifidobakterií ve výkalech bylo testováno kultivačně a pomocí FISH. Následně bylo testováno mléko na přítomnost bifidobakterií kultivačně a F6PPK testem. V první skupině byla přítomnost bifidobakterií identifikována u 35 % vzorků, ve druhé skupině nebyly v mléku nalezeny žádné bifidobakterie. Tato studie se přiklání k možnosti zpětné kontaminace mléka z mikrobioty kojenců (Rada et al., 2011).

Další studie sledovala bifidobakterie v mléce a výkalech u 102 zdravých matek a jejich dětí. Mléko bylo odebráno před porodem, následně kolostrum a pak 7. a 30. den po porodu, výkaly kojenců byly odebrány 7. a 30. den po narození a mekonium. Analýza proběhla pomocí kultivační metody a následné identifikace jednotlivých druhů pomocí 16S rRNA. Ve vzorcích

mléka před porodem a kolostrem nebyl izolován žádný bifidobakteriální kmen, zatímco kmeny bifidobakterií byly nalezeny v několika vzorcích mekonia. Bifidobakterie se vyskytovaly v mléku vždy ve stejném čase jako ve výkalech kojenců, nebo později, tedy napřed byly identifikovány ve výkalech kojenců a potom byly nalezeny v mléku. V závěru je navrženo použití značených kmenů bakteriálních kmenů k otestování možnosti přenosu z mléka (Makino et al., 2015)

Teorii možného přenosu bakterií ze střev matky do mateřského mléka zkoumali Martin et al., 2003. Ve studii, které se zúčastnilo 8 zdravých žen a jejich kojenci, sledovala se přítomnost bakterií mléčného kvašení (BMK) v mateřského mléku. Z důvodu zkoumání původu BMK v mléce byly testovány i stěry z kůže na prsou a areol, výkaly kojenců a stěr z jejich dutiny ústní. BMK byly stanoveny kultivačně na selektivních půdách a následně analyzovány metodou náhodné amplifikace polymorfni DNA (RAPD). Výsledky analýz ukazují, že RAPD profily BMK izolovaných z kůže prsů byly jiné než profily RAPD BMK izolovaných z mateřského mléka. To naznačuje, že tyto BMK mají endogenní původ. BMK přítomné v kolostru a mateřském mléku pravděpodobně tvoří biofilm na mléčné žláze uvnitř systému mléčného kanálku. Mléčná žláza se připravuje na laktaci prostřednictvím řady vývojových kroků již během dospívání. K hlavnímu rozvoji dochází v průběhu těhotenství nárůstem alveolů a mléčných kanálků. V pozdní fázi těhotenství jsou alveoly maximálně vyvinuty a může dojít i k uvolňování malého množství kolostra. Navíc se výrazně zvětší i areola a bradavka. Tyto změny poskytují dobré podmínky pro tvorbu biofilmu. Zvýšená lymfatická a krevní zásoba mléčné žlázy, uvolňování oxytocinu, které způsobuje kontrakci myoepitelových buněk může také podporovat přítomnost BMK v mateřském mléce.

Martin et al., 2012 podrobili dalšímu výzkumu hypotézu endogenního původu bakterií v mateřském mléce. V této studii uvádí možný transport bakterií ze střeva matky do mléčné žlázy stejnou cestou jako probíhá transport buněk imunitního systému. Ve studii bylo prokázáno, že dendritické buňky mohou proniknout do střevního epitelu a zachytit bakterie ze střevní mikrobioty a že antigenem stimulované buňky se pohybují ze střevní sliznice, aby kolonizovaly vzdálené slizniční povrchy v těle. Na základě těchto hypotéz bylo testováno 20 párů matek s jejich kojenci. Pomocí qRTi-PCR (kvantitativní PCR v reálném čase) byla testována přítomnost DNA rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Staphylococcus* v mateřském mléku a výkalech kojenců. U 11 párů byla nalezena DNA bakterií rodů *Staphylococcus*, u 9 párů *Lactobacillus* a u 3 párů *Bifidobacterium*.

Martin et al., 2009 testovali kultivační metodou přítomnost *Bifidobacterium* v mateřském mléku 23 žen a ve výkalech jejich dětí. Bifidobakterie byly nalezeny v 8 vzorcích mléka a ve 21 výkalech, příslušnost k danému rodu byla určena pomocí F6PPK testu. Následně byly identifikovány jednotlivé druhy pomocí qRTi-PCR. Ve studii nejsou sledovány výtěry dutiny ústní kojenců, ani střevní mikrobioty matky. Výsledky nalezených bakteriálních druhů v mateřském mléku nejsou porovnávány s druhy nalezenými ve výkalech kojenců. V závěru je však naznačen možný transport bakterií endogenní cestou ze střev matky do mléčné žlázy.

Většina studií analyzuje především mateřské mléko a střevní mikrobiotu kojence, jejich složení mezi sebou porovnává. Vzhledem k možnosti zpětné kontaminaci mateřského mléka z kojenecké dutiny ústní by měly být do výzkumu zahrnuty i výtěry z dutiny ústní kojence. K potvrzení možného endogennímu transportu by měla být analyzována i mateřské fekální mikrobiota, její složení by mělo být porovnáno s bakteriemi mateřského mléka. Vzhledem ke složitosti mikrobioty je třeba dalších výzkumu, aby byla mikrobiota pochopena a možnost transportu bakterií do mléka. V současné době byla testována přítomnost bakterií v mateřském mléce a jejich identifikace, ale je třeba i analýz, které zjistí vliv těchto bakterií na rozvoj střevní mikrobioty kojenců. Pokud by byl jejich vliv významný, mohly by se uplatnit pro navržení specifických probiotik pro kojence, které jsou krmeny umělou výživou, aby podpořily správný vývoj mikrobioty.

## 8 Závěr

Na základě vhodných vlastností byl vybrán kmen *Bifidobacterium animalis* spp. *animalis* 23II, z kterého byli vytvořeni rifampicin rezistentní mutanti. RRBIF dobře procházely horní části trávicího traktu a dočasně kolonizovaly tlusté střevo dojnice. RRBIF kolonizovaly dočasně i dutinu ústní. V mléku nebyly kultivační metodou detekovány. F6PPK test pro ověření možné kolonizace RRBIF mléka byl vyhodnocen negativně, v mléku se nevyskytovaly žádné bifidobakterie. Z výsledků této práce vyplývá, že mléko dojnic pravděpodobně není potenciálním zdrojem bifidobakterií pro kolonizaci trávicího traktu telat.

## 9 Seznam literatury

Abd El-Gawad, I. A., El-Sayed, E. M., Hafez, S. A., El-Zeini, H. M., Saleh, F. A. 2005. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal*. 15 (1). 37-44.

Amato, K. R. 2017. An introduction to microbiome analysis for human biology applications. *American Journal of Human Biology*. 29 (1). 1-17.

Amund, O. D. 2016. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 62 (9). 715-725.

Arboleya, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de los Reyes-Gavilán, C. G., Gueimonde, M. 2011. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *International Journal of Food Microbiology*. 149 (1). 28-36.

Arora, T., Singh, S., Sharma, R. K. 2013. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition*. 29 (4). 591-596.

Avershina, E., Lundgård, K., Sekelja, M., Dotterud, C., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., Rudi, K. 2016. Transition from infant- to adult-like gut microbiota. *Environmental Microbiology*. 18 (7). 2226-2236.

Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen, K., Dahlgren, J., Wang, J. 2015. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*. 17 (5). 690-703.

Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 50. 117-131.

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 (1). 13-15.

Blaser, M. J., Falkow, S. 2009. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Reviews Microbiology*. 7 (12). 887-894.

Blumberg, R., Powrie, F. 2012. Microbiota, Disease, and Back to Health: A Metastable Journey. *Science Translational Medicine*. 4 (137). 1-21.

Bottacini, F., Medini, D., Pavesi, A., Turroni, F., Foroni, E., Riley, D., Glubellini, V., Tettelin, H., van Sinderen, D., Ventura, M. 2010. Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology*. 156 (11). 3243-3254.

Browne, H. P., Forster, S. C., Anonye, B. O., Kumar, N., Neville, B. A., Stares, M. D., Goulding, D., Lawley, T. D. 2017. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. 533 (7604). 543-546.

Bunešová, V., Vlková, E., Ročková, Š., Killer, J., Rada, V. 2010. Přežívání bifidobakterií v trávicím traktu telat v závislosti na věku. *Náš chov*. 12. 60-62.

Bunešová, V., Geigerová, M., Vlková, E. 2015. Bifidobakterie jako možná probiotika pro mláďata přežvýkavců. *Veterinářství*. 65 (7). 528-532.

Cani, P. D., Knauf, C. 2016. How gut microbes talk to organs: The role of endocrine and nervous routes. *Molecular Metabolism*. 5 (9). 743-752.

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., Knight, R. 2012. Impact of the Gut Microbiota on Human Health. An Integrative View. *Cell*. 148 (6). 1258-1270.

Collado, M. C., Sanz, Y. 2006. Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *Journal of Microbiological Methods*. 66 (3). 560-563.

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.

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., Turnbaugh, P. J. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 505 (7484). 559-563.

Derrien, M., van Hylckama Vlieg, J. E. T. 2015. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*. 23 (6). 354-366.

Di Gioia, D., Aloisio, I., Mazzola, G., Biavati, B. 2014. Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Applied Microbiology*. 98 (2). 563-577.

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 (1). 119-125.

Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Turrone, F., Milani, C., Mangifesta, M., Ferrario, C., Anzalone, R., Viappiani, A., van Sinderen, D., Ventura, M. 2017. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes among Human Gut-Derived Bifidobacteria. *Applied*. 83 (3). 1-14.

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A.. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 308 (5728). 1635-1638.

Felis, G.E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8. 26-46.

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). 1-10.

Fredricks, D. N. 2013. *The human microbiota: how microbial communities affect health and disease*. John Wiley a Sons. New Jersey. 378 s. ISBN: 9780470479896.

Ghoddusi, H. B., Tamime, A. Y. 2014. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press. 3248 s. ISBN: 9780123847331.

Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S., Collado, M. C. 2016. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal*. 21 (6). 400-405.

González-Rodríguez, I., Ruiz, L., Gueimonde, M., Margolles, A., Sánchez, B. 2013. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*. 340 (1). 1-10.

Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Minuzzo, M., Arioli, S., Parini, C., Comelli, E., Mora, D. 2009. Study of the Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to Human Intestinal Cell Lines. *Current microbiology*. 59 (2). 167-172.



- Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 4 (202). 1-6.
- Hayashi, H., Sakamoto, M., Benno, Y. 2002. Phylogenetic Analysis of the Human Gut Microbiota Using 16S rDNA Clone Libraries and Strictly Anaerobic Culture-Based Methods. *Microbiology and Immunology*. 46 (8). 535-548.
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., Benno, Y. 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and rectosigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*. 54 (11). 1093-1101.
- Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R., Nicholson, J. K. 2012. Gut Microbiota Composition and Activity in Relation to Host Metabolic Phenotype and Disease Risk. *Cell Metabolism*. 16 (5). 559-564.
- Hooper, L. V., Littman, D. R., Macpherson, A. J. 2012. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*. 336 (6086). 1268-1273.
- Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J. M. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*. 159 (3). 187-193.
- Kato, K., Odamaki, T., Mitsuyama, E., Sugahara, H., Xiao, J. -zhong, Osawa, R. 2017. Age-Related Changes in the Composition of Gut Bifidobacterium Species. *Current Microbiology*. 74 (8). 987-995.
- Kim, S., Covington, A., Pamer, E. G. 2017. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews*. 279 (1). 90-105.
- Lacroix, C., Yildirim, S. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*. 18 (2). 176-183.
- Lawley, T. D., Walker, A. W. 2013. Intestinal colonization resistance. *Immunology*. 138 (1). 1-11.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., Gordon, J. I. 2006. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*. 124 (4). 837-848.

Livingston, K. A., Sawicki, C. M., McKeown, N. M., Obin, M., Roberts, S. B., Mei Chung. 2017. Dietary Fiber and the Human Gut Microbiota: Application of Evidence Mapping Methodology. *Nutrients*. 9 (2). 1-21.

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.

Makino, H., Martin, R., Ishikawa, E., Gawad, A., Kubota, H., Sakai, T., Oishi, K., Tanaka, R., Ben-Amor, K., Knol, J., Kushiro A. 2015. Multilocus sequence typing of bifidobacterial strains from infant's faeces and human milk: are bifidobacteria being sustainably shared during breastfeeding?. *Beneficial Microbes*. 6 (4). 563-572.

Mangin, I., Bouhnik, Y., Bisetti, N., Decaris, B. 1999. Molecular monitoring of human intestinal Bifidobacterium strain diversity. *Research in Microbiology*. 150 (5). 343-350.

Marcobal, A., Sonnenburg, J. L. 2012. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology*. 18. 12-15.

Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., Kubota, H., Swinkels, S., Sakai, T., Oishi, K., Kushiro, A., Knol, J. 2016. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS ONE*. 11 (6). 1-30.

Martin, R., Jimenez, E., Heilig, H., Fernandez, L., Marin, M. L., Zoetendal, E. G., Rodriguez, 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.

Martin, R., Jimenez, E., Heilig, H., Fernandez, L., Marin, M. L., Zoetendal, E. G., Rodriguez, 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.

Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R. del, Fernández, L., Rodríguez, J. M., Jiménez, E. 2012. Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. *Journal of Human Lactation*. 28 (1). 36-44.

Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J., Huys, G. 2007. In Vitro Assessment of the Gastrointestinal Transit Tolerance of Taxonomic Reference Strains from Human Origin and Probiotic Product Isolates of Bifidobacterium. *Journal of dairy science*. 90 (8). 3572-3578.

Mattarelli, P. Biavati, B., Holzapfel, W. H., Wood, B. J. 2017. *The Bifidobacteria and Related Organisms: Biology, Taxonomy, Applications*. Academic Press. London. 324 s. ISBN: 9780128050606

Maukonen, J., Saarela, M. 2015. Human gut microbiota: does diet matter? *Proceedings of the Nutrition Society*. 74 (1). 23-36.

Milani, C., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Duranti, S., Turrone, F., Ferrario, C., Mangifesta, M., Viappiani, A., Ferretti, P., Gorfer, V., Tett, A., Segata, N., van Sinderen, D., Ventura, M., Griffiths, M. W. 2015. Exploring Vertical Transmission of Bifidobacteria from Mother to Child. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (20). 7078-7087.

Moro, G. E., Arslanoglu, S. 2005. Reproducing the bifidogenic effect of human milk in formula-fed infants: Why and how?. *Acta Paediatrica. Supplement*. 94 (449). 14-17.

Musilova, S., Rada, V., Vlkova, E., Bunesova, V., Nevoral, J. 2015. Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Paediatrica*. 104 (4). 184-186.

Obregon-Tito, A. J., Tito, R. Y., Metcalf, J., Sankaranarayanan, K., Clemente, J. C., Ursell, L. K., Zech Xu, Z., Van Treuren, W., Knight, R., Gaffney, P. M., Spicer, P., Lawson, P., Marin-Reyes, L., Trujillo-Villarreal, O., Foster, M., Gujja-Poma, E., Troncoso-Corzo, L., Warinner, C., Ozga, A. T., Lewis, C. M. 2015. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nature Communications*. 6 (3). 6505-6505.

O'Callaghan, A., van Sinderen, D. 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*. 7 (925). 1-23.

Ouwehand, A. C., Bergsma, N., Parhiala, R., Lahtinen, S., Gueimonde, M., Finne-Soveri, H., Strandberg, T., Pitkälä, K., Salminen, S. 2008. Bifidobacterium microbiota and parameters of immune function in elderly subjects. *FEMS immunology and medical microbiology*. 53 (1). 18-25.

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F. W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 2007 (68). 88–113.

Patel, A. R., Shahand, N. P., Prajapati, J.B. 2012. Antibiotic Resistance Profile of Lactic Acid Bacteria and Their Implications in Food Chain. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 7 (2). 202-211.

Pey Yee Lee, Siok-Fong Chin, Hui-min Neoh, Jamal, R. 2017. Metaproteomic analysis of human gut microbiota: where are we heading? *Journal of Biomedical Science*. 24. 1-8.

Plummer, S. F., Garaiova, I., Sarvotham, T., Cottrell, S. L., Le Scouiller, S., Weaver, M. A., Tang, J., Dee, P., Hunter, J. 2005. Effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 (1). 69-74.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Junhua Li, Junming Xu, Shaochuan Li, Dongfang Li, Jianjun Cao, Bo Wang, Huiqing Liang, Huisong Zheng, Yinlong Xie. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464 (7285). 59-65.

Quigley, E. M. M. 2011. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Current Opinion in Pharmacology*. 11 (6). 593-603.

Rada, V., Nevoral, J., Flajšmanová, K., Ročková, Š., Krčmářová, I., Grmanová, M., Vlková, E., Nováková I., Killer, J., Kopečný J. 2011. Occurrence of bifidobacterie in human milk. *Milchwissenschaft*. 66 (2). 123-126.

Rada, V., Ročková, Š. 2011. Mateřské mléko – naše první potravina. *Potravinářská revue*. 4. 12-14.

Ranucci, G., Buccigrossi, V., Freitas, M. B. de, Guarino, A., Giannattasio, A. 2017. Early-Life Intestine Microbiota and Lung Health in Children. *Journal of Immunology Research*. 1-5.

de los Reyes-Gavilán, C. G., Suárez, A., Fernández-García, M., Margolles, A., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P. 2011. Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Research in Microbiology*. 162 (5). 514-519.

Riedel, C. U., Foata, F., Goldstein, D. R., Blum, S., Eikmanns, B. J. 2006. Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells—adhesion and impact on expression profiles. *International Journal of Food Microbiology*. 110 (1). 62-68.

Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 149 (1). 88-105.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 84 (3). 197-215.

Sánchez, B., Ruiz, L., de los Reyes-Gavilan, C. G. 2008. Proteomics of stress response in *Bifidobacterium*. *Frontiers in Bioscience*. 13. 6905-6919.

Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A. 2012. Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends in Food Science*. 26 (1). 56-63.

Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A. 2013. Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacological Research*. 69 (1). 127-136.

Sela, D. A. 2011. Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides. *International Journal of Food Microbiology*. 149 (1). 58-64.

Sommer, F., Bäckhed, F. 2013. The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 11 (4). 227-238.

Selber-Hnatiw, S., Rukundo, B., Ahmadi, M., Akoubi, H., Al-Bizri, H., Aliu, A. F., Ambeaghen, T. U., Avetisyan, L., Bahar, I., Baird, A., Begum, F., Soussan, H. B., Blondeau-Éthier, V., Bordaries, R., Bramwell, H., Briggs, A., Bui, R., Carnevale, M., Chancharoen, M., Chevassus, T., Choi, J. H., Coulombe, K., Couvrette, F., D'Abreau, S., Davies, M., Desbiens, M., Di Maulo, T., Di Paolo, S., Do Ponte, S., dos Santos Ribeiro, P., Dubuc-Kanary, L., Duncan, P. K., Dupuis, F., El-Nounou, S., Eyangos, C. N., Ferguson, N. K., Flores-Chinchilla, N. R., Fotakis, T., Oumarou, M. G., Georgiev, M., Ghiassy, S., Glibetic, N., Bouchard, J. G., Hassan, T., Huseen, I., Quilatan, M. I., Iozzo, T., Islam, S., Jaunky, D. B. Jeyasegaram, A., Johnston, M., Kahler, M. R., Kaler, K., Kamani, C., Rad, H. K., Konidis, E., Konieczny, F., Kurianowicz, S., Lamothe, P., Legros, K., Leroux, S., Li, J., Rodriguez, M. L., Luponio-Yoffe, S., Maalouf,

Y., Mantha, J., McCormick, M., Mondragon, P., Narayana, T., Neretin, E., Nguyen, T. T. T., Niu, I., Nkemazem, R. B., O'Donovan, M., Oueis, M., Paquette, S., Patel, N., Pecsí, E., Peters, J., Pettorelli, A., Poirier, C., Pompa, V. R., Rajen, H., Ralph, R., Rosales-Vasquez, J., Rubinshtein, D., Sakr, S., Sebai, M. S., Serravalle, L., Sidibe, F., Sinnathurai, A., Soho, D., Sundarakrishnan, A., Svistkova, V., Ugbeye, T. E., Vasconcelos, M. S., Vincelli, M., Voitovich, O., Vrabel, P., Wang, L., Wasfi, M., Zha, C. Y., Gamberi, C. 2017. Human Gut Microbiota: Toward an Ecology of Disease. *Frontiers in Microbiology*. 8. 1-19.

Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D., Arigoni, F. 2002. The Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* Reflects Its Adaptation to the Human Gastrointestinal Tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (22). 14422-14427.

Socol, R., C., Souza, L., P., Spier, M., R., Medeiros A., B., P., Lindner, J., D. 2010. The Potential of Probiotics. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (4). 413–434.

Songling Liu, Fazheng Ren, Liang Zhao, Lu Jiang, Yanling Hao, Junhua Jin, Ming Zhang, Huiyuan Guo, Xingen Lei, Erna Sun, Hongna Liu. 2015. Starch and starch hydrolysates are favorable carbon sources for *Bifidobacteria* in the human gut. *BMC Microbiology*. 15 (1). 1-9.

Sundin, O. H., Mendoza-Ladd, A., Mingtao Zeng, Diaz-Arévalo, D., Morales, E., Fagan, B. M., Ordoñez, J., Velez, P., Antony, N., McCallum, R. W. 2017. The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiology*. 17. 1-17.

Talukdar, R., Jandhyala, S. M., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Reddy, D. N., Sasikala, M. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*. 21 (29). 8787-8803.

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

Thomson, P., Medina, D. A., Garrido, D. 2017. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology*. 1-10.

- Tidjani A., M., Lagier, J. -C., Raoult, D. 2016. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome Journal*. 1. 3-11.
- Tripathi, M. K., Giri, S. K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 9. 225-241.
- Turroni, F., Ribbera, A., Foroni, E., van Sinderen, D., Ventura, M. 2008. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek* 94 (1). 35-50.
- Turroni, F., Canchaya, C., Ventura, M., van Sinderen, D., O'Toole, P. W., Vaughan, E. E. 2009. Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Frontiers In Bioscience*, 14 (1). 3214-3863.
- Turroni, F., van Sinderen, D., Ventura, M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*. 149 (1). 37-44.
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., Gueimonde, M., Margolles, A., De Bellis, G., 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). 1-12.
- Ventura, M., van Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., Zink, R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86 (3). 205-223.
- Vlková, E., Nevoral, J., Jencikova, B., Kopečný, J., Godefrooij, J., Trojanová, I., Rada, V. 2005. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods*. 60 (3). 365-373.
- Vlková, E., Rada, V., Smehilova, M., Killer, J. 2008a. Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica*. 53 (3). 263-269.
- Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I., Killer, J., Šmehilová, M., Molatová, Z. 2008b. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Archives of Animal Nutrition*. 62 (5). 359-365.
- Vlková, E., Grmanová, M., Rada, V., Homutova, I., Dubna, S. 2009. Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. *Czech Journal of Animal Science - UZEI (Czech Republic)*. 54 (12). 552-565.

Vlková, E., Grmanová, M., Killer, J., Mrázek, J., Kopečný, J., Bunešová, V., Rada, V. 2010. Survival of bifidobacteria administered to calves. *Folia Microbiologica*. 55 (4). 390-392.

Vlková, E., Salmonová, H., Bunešová V., Geigerová, M., Rada V., Musilová, Š. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe*. 34. 27-33.

Wickramasinghe, S., Pacheco, A. R., Lemay, D. G., Mills, D. A. 2015. Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiology*. 15 (172). 1-12.

Wilson, M. 2008. *Bacteriology of humans: an ecological perspective*. Blackwell Pub. Malden. 360 s. ISBN: 9781405161657.

Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 486 (7402). 222-227.