

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Rozdíly ve složení střevní mikrobioty lidí s konvenční,
vegetariánskou a veganskou dietou.**

Bakalářská práce

Autor práce:

EVA MRÁČKOVÁ

Vedoucí práce:

Ing. VĚRA BUNEŠOVÁ Ph.D

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "**Rozdíly ve složení střevní mikrobioty lidí s konvenční, vegetariánskou a veganskou dietou**" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 31.3.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Věře Bunešové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a odborné vedení mé práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Haně Salmonové za pomoc se statistickým zpracováním výstupních dat mého výzkumu. A dále také celé Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky.

Rozdíly ve složení střevní mikrobioty lidí s konvenční, vegetariánskou a veganskou dietou

Souhrn

Již mnoho let je věnována pozornost složení střevní mikrobioty v závislosti na stravování. Je prokázán rozdíl ve složení střevních mikroorganismů u jednotlivých etnických skupin, což je přisuzováno právě rozdílům ve skladbě potravy. Jedná se především o konzumaci mléčných výrobků, čerstvé zeleniny, ovoce a způsobu úpravy pokrmů. Významný je zejména obsah vlákniny, která je řazena do prebiotik, jedná se o nestravitelnou složku potravy (oligosacharidy), tedy látky tvořící živnou půdu pro střevní mikrobiotu. Cílem této práce bylo zjistit, jak velký význam má způsob stravování na přítomnost mikroorganismů v trávicím traktu člověka. V práci jsme se zaměřili na skupinu deseti lidí s konvenční (omnivorní, všežravou) dietou a stejně početnou skupinu s vegetariánským typem diety (herbivory, osoby nekonzumující maso a masné výrobky).

Jednalo se o výzkum založený na kultivaci a kvantifikaci jednotlivých druhů mikroorganismů na selektivních médiích. Mezi sledované skupiny bakterií byly zařazeny rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, dále G- bakterie, enterokoky, koliformní bakterie a *Escherichia coli*. V práci byly též analyzovány metabolity těchto bakterií ve stolici, jednalo se především o nenasycené mastné kyseliny s krátkým řetězcem, mezi něž patří například kyselina valerová, isovalerová, máselná a další metabolity, jako je laktát, malát, pyruvát a sukcinát. Dále bylo měřeno pH vzorků stolice.

Z výsledků této práce bylo zjištěno, že mezi počty bakterií kolonizujících lidské střevo vegetariánů a lidí na konvenční dietě není podle t-testu statisticky významný rozdíl. Z naměřených hodnot dále vyplývají byť malé, ale viditelné rozdíly v naměřeném obsahu jednotlivých skupin bakterií. Stolice masožravců obsahovala více laktobacilů, gramnegativních bakterií, enterokoků a koliformních bakterií u vegetariánů se našlo více bifidobakterií a *Escherichia coli*.

Po analýze obsahu bakteriálních metabolitů ve stolici bylo u vegetariánů zaznamenáno vyšší množství laktátu produkovaného druhem *Lactobacillus* a formátu. U masožravců pak bylo nalezeno vyšší množství ostatních metabolitů jako je acetát, propionát, butyrát, valerát, malát, pyruvát a sukcinát.

Při měření pH stolice vegetariánů a masožravců nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, avšak hodnoty průměrného pH byli vyšší u masožravců. Což bylo předpokládáno.

Klíčová slova: dieta, střevní mikroflóra, kultivace, kvantifikace

Differences in the gut microbiota in human with conventional, vegetarian and vegan diet.

Summary

For many years the attention is paid to the composition of the intestinal microbiota in relation to meals. There is the evidence of the difference in the composition of intestinal microorganisms in each ethnical groups based on the differences in composition of the food. This fact is based especially on the consumption of dairy products, fresh vegetables, fruits and a methods of cooking. High importance has content of fiber, which is classified as prebiotics, it is a digestible food ingredient (oligosaccharides). It is a substances forming a breeding ground for the intestinal microbiota. The aim of this study was to determine how important is a way of eating for the presence of microorganisms in the digestive tract of humans. In this work, we focused on a group of ten people with conventional (omnivorous) diet and an equally large group of people on vegetarian diet (herbivory, people who don't eat a meat and meat products).

This research was based on the cultivation and quantification of individual species of microorganisms on selective media. The monitored bacterial groups included a genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, further G- bacteria, Enterococci, Coliforms and *Escherichia coli*. In this work the metabolites of these bacteria in the stool, being mainly unsaturated fatty acids having short chain, which include for example, valeric acid, isovaleric acid, butyric acid and other metabolites such as lactate, malate, pyruvate and succinate were also analyzed. The pH was measured stool samples as a next point.

The result, of this work, base ont-test, shows that the numbers of bacteria colonizing the intestine of vegetarians against of people on a conventional diet was not significantly difference. A small, but visible difference was in the measured content of the various groups of bacteria measured from the values. Stool carnivores contained more lactobacilli, gram-

negative bacteria, coliforms and enterococci in vegetarians was found more *Bifidobacteria* and *Escherichia coli*.

The vegetarians showed a higher amounts of lactate produced by *Lactobacillus* species and size, after analysis of the bacterial metabolites in faeces. For carnivores then were found higher amounts of other metabolites, such as acetate, propionate, butyrate, valerate, malate, pyruvate and succinate.

There was no statistically significant difference, when the pH of vegetarians and carnivores stool was measured, but the average pH values were higher in carnivores. That was expected.

Keywords: diet, intestinal microflora, cultivation, quantification

1. Úvod.....	9
2. Střevní mikroflóra.....	10
2.1 Mikroflóra trávicího traktu člověka.....	10
2.2 Vliv věku na složení střevní mikroflóry	13
2.3 Funkce mikroflóry.....	16
2.4 Vliv diety na složení střevní mikroflóry	18
2.5 Deklarované rozdíly ve složení střevní mikroflóry v závislosti na dietě	20
2.6 Možnosti sledování složení střevní mikroflóry	24
3. Hypotéza	26
4. Cíl práce	27
5. Metodická část.....	28
5.1 Informace o dárcích	28
5.2 Odběr vzorku.....	29
5.3 Kultivační stanovení.....	29
5.4 Kvantifikace bakterií	34
5.5 Měření obsahu metabolitů.....	34
5.6 Měření pH stolice	35
6. Vyhodnocení výsledků	36
7. Diskuze	44
8. Závěr	47
Citovaná literatura.....	48

1. Úvod

Střevní mikrobiota člověka se skládá z velkého množství mikroorganismů, které hrají důležitou roli v našem metabolismu, úzce souvisí s imunitním systémem, prevencí onemocnění a tvorbou některých důležitých látek, jako jsou vitamíny a rozkladné produkty nutrietů. Na složení této mikrobioty působí celá řada faktorů a to například způsob porodu, prostředí v něm žijeme a náš způsob života. Tyto faktory dělíme na endogenní, které příliš ovlivnit nemůžeme a faktory exogenní které ovlivnit lze, sem patří především dieta.

V dnešní moderní a uspěchané době stále hledáme zdravější způsob života, a tak je velice populární upínat se k alternativnímu způsobu stravování, kam patří například vegetariánství a veganství. Diety jistě všem známé, s dlouholetou tradicí, zejména ve východních náboženstvích jako je buddhismus a hinduismus. Na rozdíl od všežravců (takzvaného komerčního způsobu diety), tito lidé vyloučili ze své stravy živočišné potraviny, ať už částečně, nebo zcela.

Víme, že naše zdraví a správná funkce trávicího traktu je závislá na jeho osídlení mikroorganismy. Tyto mikroorganismy potřebují k životu určité podmínky, které se vlivem způsobu našeho stravování mění, to znamená, že složení mikroflóry ve střevě vegetariána by mělo být rozdílné než u všežravce. Studie založené na sekvenování ukázaly, že lidskou mikrobiotu tvoří tři základní enterotypy *Bacteroides*, *Prevotella* a *Ruminococcus*. Dále bylo zjištěno, že složení mikrobioty závisí na věku, pohlaví, ale i na národnosti a životním stylu.

Rozmanitost střevní symbiotické mikrobioty, zastoupení a kvantitu různých bakteriálních a dalších skupin můžeme sledovat pomocí kultivace na selektivních pěstebních prostředcích a jednotlivé bakteriální izoláty poté můžeme identifikovat pomocí různých molekulárně-genetických metod, biochemických testů a hmotnostní chromatografie. Další možností je izolace totální bakteriální DNA přímo ze stolice, bez kultivace s následnou identifikací a kvantifikací bakteriálních skupin. Cílem této práce je porovnat složení střevní mikrobioty lidí na konvenční dietě a vegetariánů, či veganů pomocí kultivace na selektivních médiích a analyzovat obsah bakteriálních metabolitů ve stolici.

2. Střevní mikroflóra

2.1 Mikroflóra trávicího traktu člověka

Trávicí trakt je v podstatě trubice začínající ústí a končící řitním otvorem. Velký důraz je kladen především na tlusté střevo, protože zde probíhá resorpce prospěšných látek a vody a také tvorba vitamínu K, či sběr odpadních látek (Rokyta a kol., 2000). V proximální části tlustého střeva je pH mírně kyselé a to především díky bakteriální fermentaci, v ostatních částech se pomocí fyziologických pochodů stává více neutrální (Gibson a kol., 2010).

Střevní mikroflóra je důležitou součástí trávicího traktu, podílí se jak na výživě, přeměně přijímaných živin, produkci některých vitamínů, jako bariéra proti patogenům, tak na správné funkci imunitního systému (Maynard a kol., 2012). Kolonizace každého jedince je individuální a tedy i osídlení je vysoce specifické, a záleží na genetických i environmentálních faktorech (Moschen a kol., 2012). Komplexní a dynamické interakce mezi mikrobiotou a jejím lidským hostitelem je vyvrcholením téměř půlmiliardy let koevoluce mikroorganismů s obratlovci (Maynard a kol., 2012). Skládá se z několika set různých druhů mikroorganismů, jejich množství je asi sto biliónů a jedná se především o bakterie. Jejich množství zhruba desetkrát převyšuje celkové množství buněk lidského organismu (Fonty, 2003). V tlustém střevě, které je z trávicího traktu osídleno nejvíce se nacházejí především striktně anaerobní bakterie. Najdeme zde *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* a koliformní bakterie, *Clostridium*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, pseudomonády, a také kvasinky rodu *Candida* (Švestka, 2007).

Je stále více důkazů o tom, že složení střevní mikrobioty je rozdílné u obézních a neobézních lidí (Turnbaugh a kol., 2006; Flint, 2011). Kdy střevní mikroorganismy a jejich metabolické produkty mohou ovlivňovat střevní hormony, výskyt zánětů a pohyblivosti střev (Flint, 2011).

Osídlení mikroflórou a to především její množství, složení a činnost však záleží také na způsobu stravování, tedy dietě daného jedince (Matijašič, 2013). Zde můžeme uvést například nestravitelné cukry z lidské potravy, ty jsou hlavním zdrojem energie pro mikroorganismy (Kabeerdoss a kol., 2011).

V roce 2011 bylo rozhodnuto, že střevní mikrobiota bude rozdělena do tří skupin enterotypů a to na *Bacteroides*, *Prevotella* a *Ruminococcus* (Arumugam a kol., 2011).

Mikroorganismy jako jsou rody *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., gramnegativní bakterie, koliformní bakterie a *Escherichia coli*, jsou běžné pro trávicí trakt člověka a je možné je selektivně kvantifikovat a identifikovat na kultivačních médiích.

***Lactobacillus* sp.**

Rod *Lactobacillus* je rod grampozitivních, nesporulujících, fakultativně anaerobních tyček. Patří mezi takzvané bakterie mléčného kvašení. Tento rod je velmi rozšířenou skupinou a dělíme jej na tři podskupiny. A to na fakultativně heterofermentativní, které tvoří kyselinu mléčnou z hexóz a z pentózových cukrů ještě navíc kyselinu octovou, etanol a CO₂, sem řadíme například *Lactobacillus casei* a *L. plantarum*. Druhou skupinou jsou obligátně homofermentativní laktobacily produkující pouze kyselinu mléčnou, sem řadíme *L. delbrueckii* a *L. acidophilus*. A třetí, poslední skupinou obligátně heterofermentativní laktobacily, ty vytvářejí zhruba z padesáti procent kyselinu mléčnou a dále kyselinu octovou, etanol a oxid uhličitý (Shepard a Gilmore, 2002).

***Enterococcus* sp.**

Rod *Enterococcus*, patří mezi grampozitivní koky, takzvané enterokoky. Jsou fakultativně anaerobní a mohou tvořit krátké řetězce. Produkují především kyselinu mléčnou. Vyskytují se v trávicím traktu zvířat a člověka. Při výskytu mimo trávicí trakt, v pitné vodě a dalších poukazují na fekální kontaminaci. Jako obvyčejné enterokokové infekce označujeme infekce močových cest, krevního oběhu, endokardu, infekce při poranění. Patří sem například *Enterococcus faecium* a *E. faecalis*, *E. gallinarum* (Shepard a Gilmore, 2002).

***Bifidobacterium* sp.**

Rod *Bifidobacterium* zahrnuje grampozitivní bakterie patřící mezi nesporulující anaerobní mikroorganismy. Nabývají tvaru kokovitých, až dlouhých větvených tyčinek. V současnosti bylo popsáno okolo 50 druhů bifidobakterií. Nicméně velká část byla vyizolována z trávicího traktu zvířat a hmyzu se sociálním způsobem života (Bunešová a kol., 2014). Pro člověka jsou typické především *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* ssp. *longum*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. pseudocatenulatum* a *B. pseudolongum* ssp. *pseudolongum* (Turroni a kol., 2009). Vyskytují se zejména v trávicím traktu lidí a zvířat,

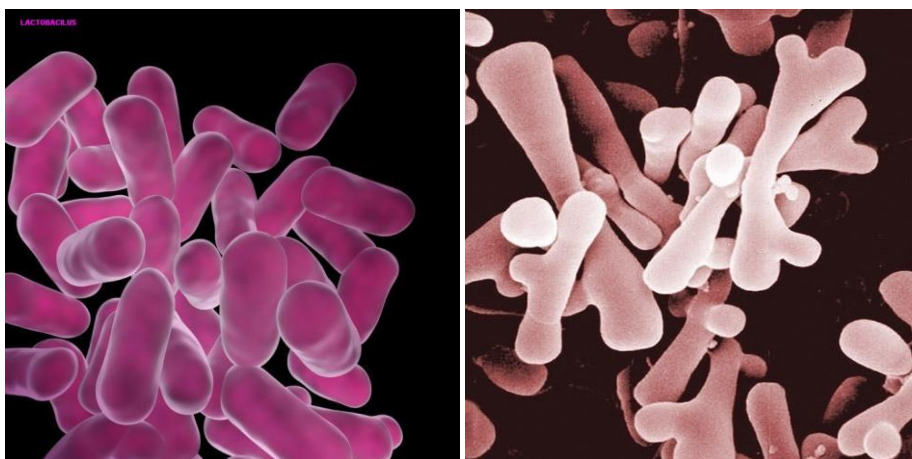
především u mláďat savců. Používají se ve formě probiotik a funkčních potravin s probiotickými vlastnostmi (Ventura a kol., 2007).

Gramnegativní tyčinky

Gramnegativní tyčinky dělíme na aerobní, mezi něž řadíme rody *Acetobacter*, *Actinobacter*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* a na fakultativně anaerobní, sem řadíme rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*. Jde o bakterie způsobující systémové infekce, které se vyznačují vysokou mírou úmrtnosti v důsledku "septického syndromu" (Rathinam a kol., 2012).

Escherichia sp.

Zájem je zejména o rod gramnegativních fakultativně anaerobních tyčinek *Escherichia* což je rod kokovitých tyček vyskytující se především v trávicím traktu lidí a zvířat. Zajímáme se především o druh *Escherichia coli*, která byla velice důkladně prozkoumaná a je ukazatelem fekálního znečištění, pokud se objeví mimo trávicí trakt. Mnohé kmeny způsobují průjemová onemocnění a infekce močových cest. *E. coli* využíváme také jako rekombinantního hostitele pro expresi bakteriálních genů, zejména pro rod *Bifidobacterium* (Cecchini a kol., 2013).

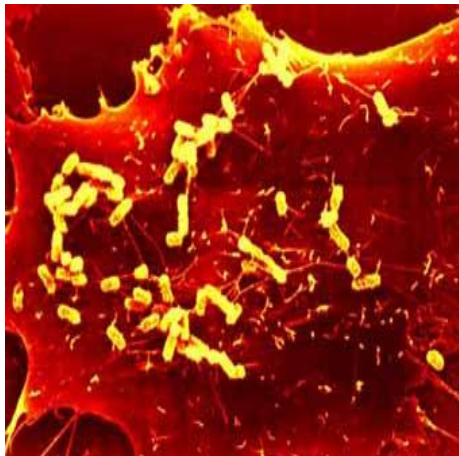


Obrázek1 *Lactobacillus* a *Bifidobacteria*

<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/MicrobeWiki>



Obrázek 2 <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Microbe Wiki>



Obrázek 3 *Escherichia coli*

<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Microbe Wiki>

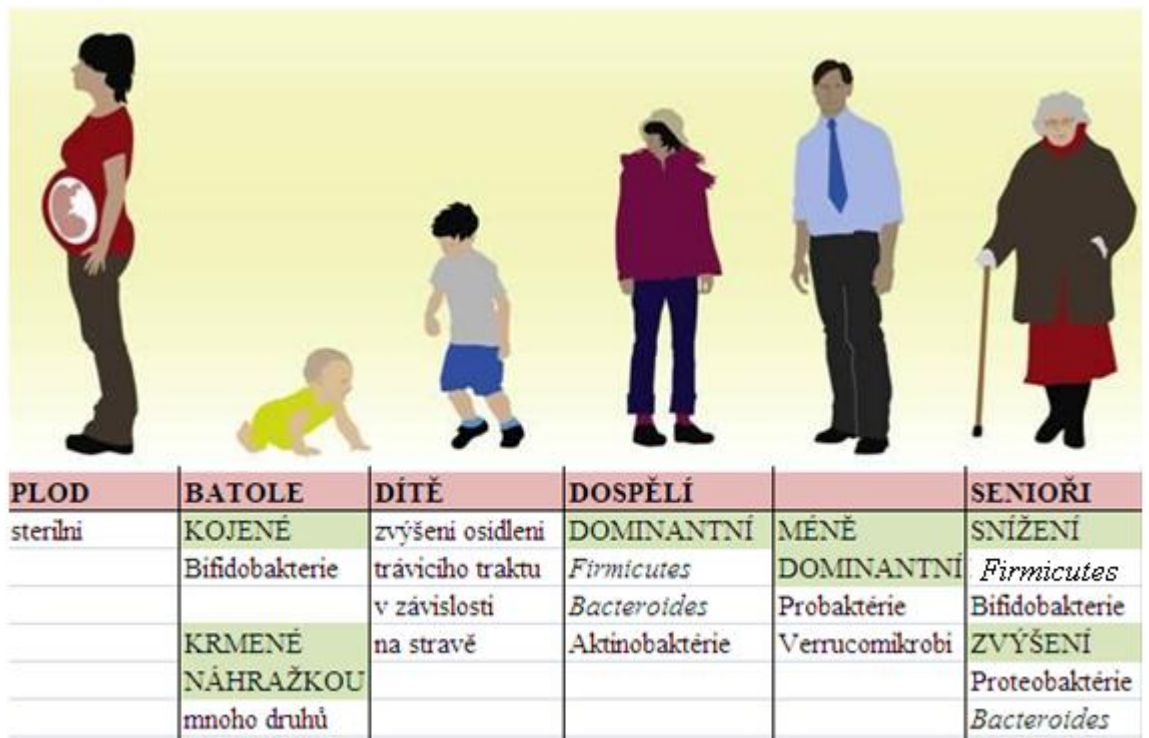
2.2 Vliv věku na složení střevní mikroflóry

Plod je v těle matky sterilní a k první kolonizaci mikroorganismy dochází během porodu od matky a po porodu. Záleží tedy i na způsobu porodu, pokud je dítě porozeno vaginálně, dochází k prvnímu osídlení vaginální mikroflórou, pokud císařským řezem je nejprve osídleno epidermální mikroflórou a to především klostridii. Při průchodu dítěte porodními cestami ženy se do dutiny ústní a postupně dále do trávicího traktu dostávají první mikroorganismy (Tláskal, 2008). Vzniká tak střevní mikroflóra, tzv. mikrobiom (microbiota), což je strukturované mikrobiální společenství, na jehož vytvoření se pozitivně podílí kojení

(Krejsek a kol., 2007). U dětí kojených se vyskytují především fakultativně anaerobní mikroorganismy, jako jsou enterobakterie, enterokoky a laktobacily (Tojo a kol., 2014). Anaerobní mikroorganismy, jako je rod *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a *Clostridium* osidlují trávicí trakt dítěte postupně a tak dochází k postupnému snížení fakultativně anaerobních bakterií (Arboleya a kol., 2014). U dětí nekojených, ale živěných substitučními přípravky na bázi mléka se za krátkou dobu vytvoří tzv. “úplná” mikroflóra, kde dominují enterobakterie a bakteroidy (Maynard a kol., 2012). Přecházením na pevnou stravu dochází k osidlování dalšími mikroorganismy, zde se jedná především o anaerobní rod *Firmicutes* (Duncan a Flint., 2013). Zhruba ve třech letech věku se střevní mikrobiální flóra složením a rozmanitostí podobá střevní mikroflóře dospělých a do dospělosti zůstává více či méně stabilní (Claesson a kol., 2011).

I další roky života jsou ovlivněny dobou kojení a způsobem výživy v kojeneckém období. Během dospělosti je sestavení mikroflóry dáno především místem pobytu a individuálními stravovacími návyky. Ve vyšším věku se mění osídlení především kvantitativně a to zejména u anaerobů (Maynard a kol., 2012). Dnes již víme, že počet bifidobakterií klesá s věkem hostitele, ovšem dříve bylo prohlašováno, že počet bifidobakteriální mikroflóry zůstává po celý život člověka stabilní (Reuter, 2001). Podle Salazara a kol. (2013) zde dochází k snižování počtu rodu *Bifidobacterium* a zvyšování počtů u rodu *Enterobacterium*, také rod *Bacteroidetes* je silněji zastoupen u starší populace na rozdíl od rodu *Firmicutes*, který se vyskytuje v menším množství (Salazar a kol., 2013).

Mezi mikroorganismy s dominantním zastoupením v tlustém střevě u dětí po ukončení kojení a dospělých pod 65 let, patří druhy rodu *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Actinobacteria* s *Proteobacteria* a *Verrucomicrobia* (Duncan a kol., 2013). Například *Bifidobacterium pseudolongum* a *B. bifidum* se nacházejí výlučně u dospělých jedinců. Ale naproti tomu najdeme i taková bifidobakteria, jejichž přítomnost není ovlivněna věkem, sem patří *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. pseudocatenulatum* a *B. adolescentis* (Turroni a kol., 2009).



Obrázek 4 Vývoj mikroflóry-Rody

2.3 Funkce mikroflóry

Symbiotická mikroflóra člověka zastává řadu významných funkcí, které se podílejí například na obranyschopnosti člověka vůči nepříznivému působení různých vlivů.

Mikroflóra funguje například jako bariéra proti patogenům jako je *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* a další a také proti potencionálním patogenům jako je *Helicobacter* a *Clostridium*. Působí několika způsoby, jako je brzdění růstu, blokace receptorů pro patogeny, snížením pH, či antagonismem, tedy protichůdným působením (Maynard a kol., 2012). Například některé druhy rodu *Bifidobacterium* jsou již léta přidávány do některých druhů funkčních potravin s probiotickými účinky, které podporují zdraví (Arvanitoyannis a kol., 2005). Mezi tyto probiotické účinky řadíme: snížení infekčních onemocnění (bakteriálních a virových průjmů), zmírnění chronických zánětlivých onemocnění (jako je ulcerózní kolitida), zlepšení fyziologických pochodů (snížení cholesterolu, nesnášenlivosti laktózy) a také snížení rizik ovlivňující zdraví (zubní kaz, alergie, rakovina; Marco a kol., 2006).

Mechanismy možného působení probiotik

1. Stabilizace střevní flóry kompeticí s patogenními

mikroorganismy o vazebná místa na receptorech a o živiny

2. Produkce mastných kyselin s krátkými řetězci (zvl. kyselina máselná)

3. Pokles pH střevního obsahu

4. Zvýšení rozpustnosti minerálních látek

5. Omezení zpětné resorpce žlučových kyselin

6. Stabilizace střevní slizniční bariéry, úprava střevní permeability

7. Produkce antimikrobiálních substancí

8. Modifikace toxinů a toxinových receptorů

9. Stimulace imunitní odpovědi na patogeny (zvýšená produkce sekrečního IgA,

IgG, IgM, protizánětlivě působících cytokinů IL-10, TGF- β , snížená produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α , Interferonu- γ stejně jako mediátorů zánětu např. matrixmetalloproteinás)

Tabulka 1 MECHANIZMY PŮSOBNÍ PROBIOTIK - PROBIOTICKÉ PŮSOBNÍ MIKROORGANISMŮ (Nevoral, 2005)

Mikroflóra se postupně vyvíjela s adaptivním imunitním systémem, jehož hlavními součástmi jsou B- a T- lymfocyty. V trávicím traktu na sliznicích dochází k jakési symbióze imunitního systému (jehož slizniční složkou je IgA) a mikroflóry. Mikroflóra posiluje a takzvaně trénuje imunitní systém. Zvyšuje schopnost pohlcování negativních složek mikrořágy (Maynard, 2012).

Dále se některé organismy mikrořágy, a to především *E. coli* a i některé druhy anaerobů podílí na tvorbě některých vitamínů. Jedná se o vitamín B12 (kobalamin), K1 (fylochinon) a K2 (menachinon) a B9 (kyselinu listovou). A také na syntéze bioaktivních látek (Matijašič a kol., 2013). Enzymy produkované bakteriemi jsou důležité pro uvolňování živin z komplexních potravin (O'Connor a kol., 2014).

Také se předpokládá, že střevní mikrořágy moduluje lipidy a zajiřtuje homeostázi glukósy, čímž ovlivňuje hmotnostní přírůstek (Matijašič, 2013). Duncan a Flint (2013) ve své práci udávají, že velké množství anaerobních mikrořágy tlustého střeva může fermentovat velkou škálu sacharidů, které uniknou trávení hostitelskými enzymy, vytvoří mastné kyseliny krátkého řetězce (SCFA) a dále acetát, propionát a butyrát, které se podílí na pochodech ve střevě (Duncan a Flint, 2013). Mikrořágy ve střevě využívají nestravitelné sacharidy jako zdroj energie, díky této fermentaci a tvorbě SCFA navrací část energie hostiteli (Kabeerdoss a kol., 2011). Lidskému genomu chybí velké množství enzymů, které potřebuje na rozkládání rostlinných polysacharidů. A právě tyto enzymy poskytují člověku mikrořágy žijící v lidském tlustém střevě. Ty mohou metabolizovat celulózu, škroby a některé méně obvyklé cukry, jako je arabinóza, manóza a xylóza (Gill a kol., 2006).

Jak mikrořágy reaguje s vnitřním prostředím hostitele, ovlivňuje tak genovou expresi v různých tkáních a ovlivňuje tím metabolické procesy, čímž může ovlivňovat vývoj i výskyt některých poruch metabolismu, jako je například cukrovka a obezita druhého typu. Interakce

střevní mikrobioty a hostitele také souvisí s výskytem syndromu dráždivého tračníku a zánětlivých onemocnění střev (jako je např. ulcerózní kolitida a Crohnova nemoc; Matijašič, 2013).

Mnohé studie a analýzy zjistili, že jedním z nejhojnějších druhů ve střevě je *Faecalibacterium prausnitzii* mající silné protizánětlivé účinky. Zaujímá více než 5% z celkového množství mikrobioty u zdravých, dospělých osob. Množství *Faecalibacterium prausnitzii* ve výkalech lze použít jako bioindikátor lidského zdraví (Miquel a kol., 2013).



Obrázek 5 *Faecalibacterium prausnitzii* <http://www.ibdwatch.com/tag/faecalibacterium-prausnitzii/>

2.4 Vliv diety na složení střevní mikroflóry

Je obecně známo, že střevní mikroflóra je ovlivněna geneticky, prostředím v němž jedinec žije a také jeho stravou. Naši stravou ovlivňujeme střevní peristaltiku, živiny, žaludeční kyselost, imunologické mechanismy a intenzivní konkurenci mezi jednotlivými bakteriemi (Peltonen a kol., 1995). Strava je individuální pro každého z nás. Je ovlivněna tradicemi, dobou, místem našeho života a také společenským postavením. Dále také závisí na složení, způsobu, úpravě a přípravě jednotlivých pokrmů, zda konzumujeme potraviny čerstvé, vařené, mražené. U mléčných výrobků záleží na jejich úpravě zda-li jsou připravovány z mléka pasterovaného vysokou teplotou či nízkou, jakou dobu, zda jsou fermentované. Je zcela zřejmé, že je velký rozdíl v osídlení střeva mikroorganismy mezi všežravci, což je pro člověka zcela přirozené, či vegetariány, vegany a dalšími typy diet (Moschen a kol., 2012).

Vegetariánství je nejvíce známou formou alternativního stravování. Jako vegetariána označujeme člověka, který nekonzumuje maso a výrobky z něj. Vegetariánství můžeme rozdělit do několika podskupin:

TYP VEGETARIÁNSTVÍ	Z ŽIVOČIŠNÝCH PRODUKTŮ KONZUMUJÍ
Semi	<i>Ryby drůbež a další produkty živočišné výroby jsou povoleny vylučují pouze červené maso</i>
Pulo	<i>maso drůbeží, mléko a mléčné výrobky vejce</i>
Pesco	<i>ryby měkkýše mléko a mléčné výrobky</i>
Lactouovo	<i>vajíčka mléko a výrobky z něj</i>
Lacto	<i>pouze mléko a mléčné výrobky</i>
Ovo	<i>pouze vajíčka</i>

Dalším způsobem výživy je tzv. **veganství**, což je forma stravování vylučující konzumaci jakéhokoli živočišného produktu. **Vitariánství** je stravování se pouze stravou v syrovém stavu, dále pak **fruktariáni**, ti konzumují pouze plody, odmítají jakékoli zabití, ať už rostliny, či zvířete (Tonstad a kol., 2009)

Výsledky mnoha studií dokazují, že snížený příjem, či úplné vynechání masa ze stravy příznivě ovlivňují výskyt chronických onemocnění jako je již zmíněná cukrovka druhého typu, obezita, zánětlivá onemocnění střev, některých druhů rakoviny trávicího traktu a

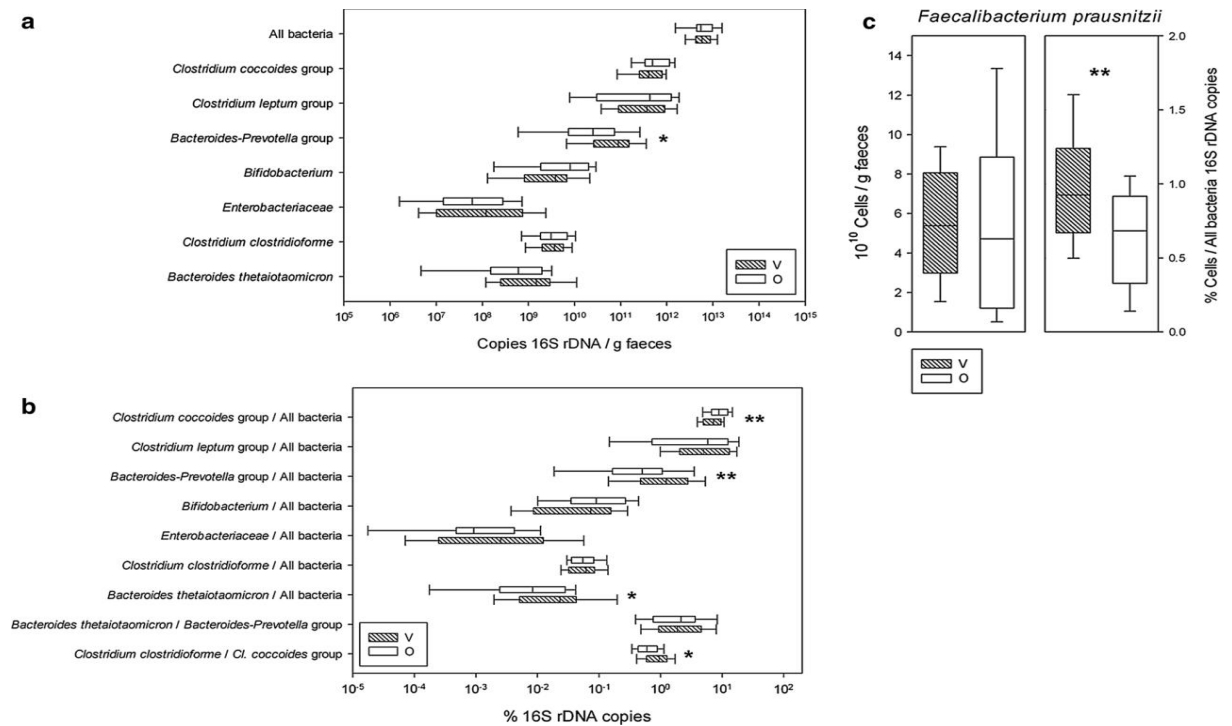
kardiovaskulárních onemocnění (Matijašič a kol., 2013). Existuje také studie u pacientů s Crohnovou nemocí, kteří přešli na semivegetariánskou stravu, která měla pozitivní účinky na průběh onemocnění (Chiba a kol., 2010).

Nedávné studie také poukazují na rozdíl v mikroflóře mezi dětmi v Africe a dětmi v Itálii, což je zejména zapříčiněno rozdílnou stravou. U afrických dětí se vyskytuje více rod *Prevotella*, jelikož přijímají více nerafinovaných sacharidů a u dětí italských se vyskytuje hojně rod *Bacteroides*, což je zapříčiněno stravou s jednoduchými cukry (Duncan a kol., 2013).

2.5 Deklarované rozdíly ve složení střevní mikroflóry v závislosti na dietě

Vliv diety na složení střevní mikroflóry je nyní velmi aktuálním tématem a je prováděno mnoho studií. V roce 2013 proběhla studie například na Slovinské Universitě v Ljublaně (Matijašič a kol., 2013) a udává tyto výsledky. Mikroorganismy ze stolice lidí na různé diety byly kvantifikovány pomocí metody real-time PCR, kdy byl zjištěn rozdíl u vegetariánů a omnivorů. Ve stolici vegetariánů bylo obsaženo více *Bacteroides-Prevotella* skupiny a *Bacteroides thetaiotaomicron*, dále méně *Clostridium clostridioforme* a *Clostridium coccoides*. A také přítomnost *Faecalibacterium prausitzii* byla u vegetariánů vyšší (v poměru buňka/celkový počet mikroorganismů). Podrobná data jsou zobrazena na obrázku 6.

Dále studovali relativní množství a identifikace vybraných DNA-bendů z denaturační gradientové elektroforézy (DGGE) ve vztahu k dietnímu typu (Tabulka 2). Výsledky této studie jsou pozitivnější pro všežravce-omnivory, měli vyšší počty zástupců rodů *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Collinsella* a *Lachnospiracea*.



Obrázek 6 Kvantifikace bakteriální mikroflóry z výkalů vegetariánů V a omnivorů O, pomocí real-time PCR (Matijašič a kol., 2013)

Skupina Mikroorganismů	Množství (%) Vegetariáni	Množství (%) Všežravci
<i>Erysipelotrichaceae</i>	2,37	3,74
<i>Ruminococcaceae</i>	2,23	3,03
<i>Lachnospiraceae</i>	5,59	8,15
<i>Faecalibacterium</i>	8,33	6,72
<i>Streptococcus</i>	0,41	1,68
<i>Subdoligranulum</i>	3,34	1,74
<i>Dialister</i>	1,07	1,34
<i>Bifidobacterium</i>	7,83	8,02

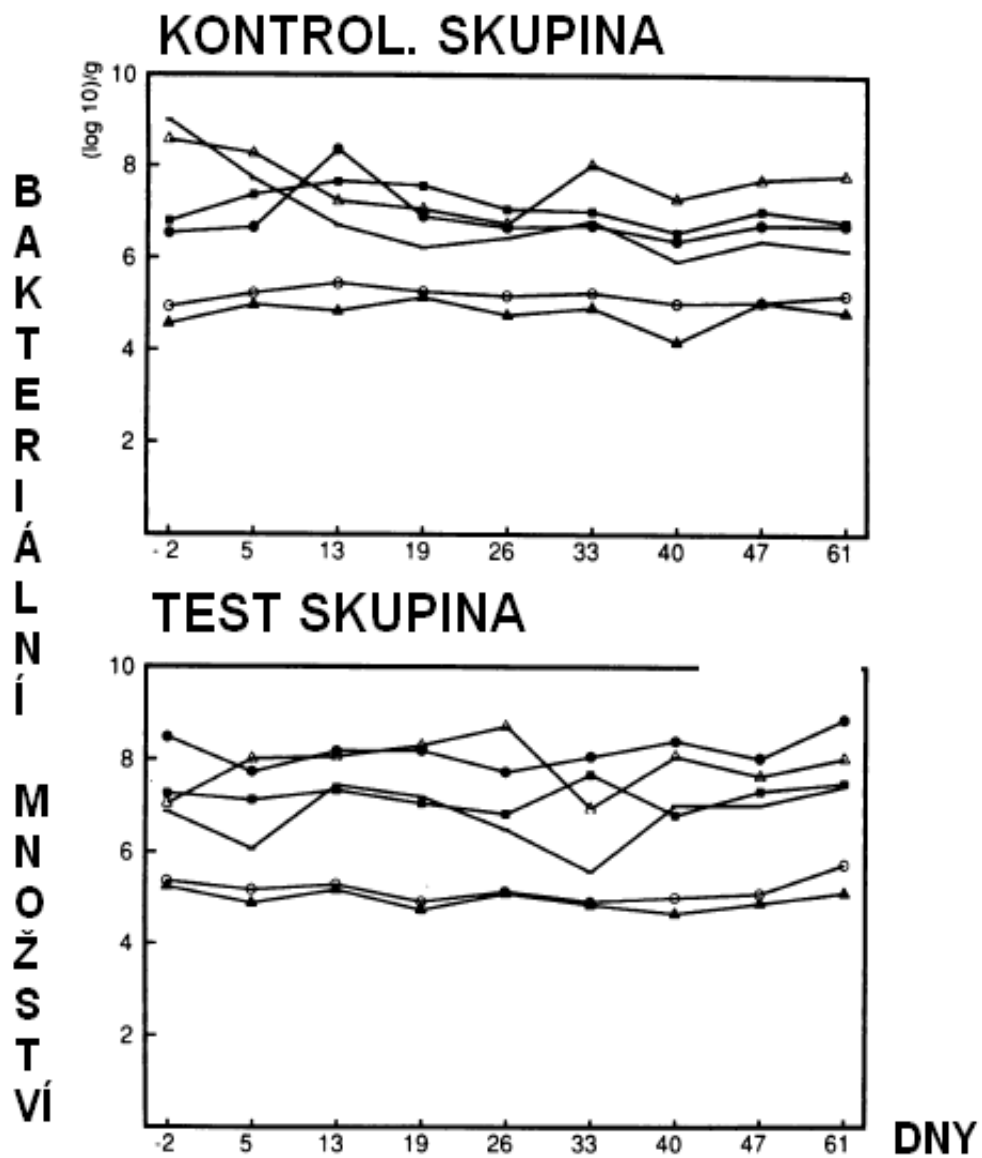
<i>Collinsella</i>	2,50	5,14
--------------------	------	------

Tabulka 2 relativní množství a identifikace vybraných DGGE bendů ve vztahu k dietnímu typu pomocí PCR-DGGE (Matijasič a kol., 2013)

Další studie z roku 2013 z University v Soulu deklaruje snížení poměru rodu *Firmicutes* k rodu *Bifidobacterium* a že vegetariánství vede k poklesu patogenních mikroorganismů rodu *Enterobacteriaceae* a zvyšuje přítomnost *Bacteroides fragilis* a *Clostridium* spp. (Min-Soo Kim a kol., 2013)

Vědci z Eberhard Karls University of Tübingen v roce 2011 také zkoumali změnu ve složení střevní fekální mikroflóry člověka u vegetariánů, veganů a všežravců, zde přišli na to, že obsah, celkové počty *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* a *Enterobacteriaceae* spp. byly o poznání nižší u vegetariánů a veganů, než u lidí na konvenční dietě. Přičemž další druhy, jako je *Klebsiella* spp. biovary., *Enterobacter* spp., *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Citrobacter* spp. a *Clostridium* spp. nižší u vegetariánů a veganů nebyli. Po zařazení veganů, vegetariánů a omnivorů do jedné skupiny zjistili, že se celkové počty mezi skupinami nelišily. Dále se v této studii ukázalo, že pH stolice se výrazně liší, vegetariáni a vegani mají pH stolice nižší, oproti všežravcům (Zimmer a kol., 2011).

Studie pomocí plynové chromatografie GLC (gas-liquid chromatography), která proběhla na Department of Medical Microbiology, Turku University ve Finsku (1992). Cílem této studie bylo sledovat vliv striktní syrové veganské diety na střevní mikrobiotu v průběhu jednoho měsíce. Složení a množství mikrobioty zde sledovali na obsahu bakteriálních mastných kyselin ve stolici. Každý pík na křivce z GLC znamenal relativní množství každého jedince ze symbiotických mikroorganismů střeva. Výška jednotlivých píků značila relativní množství mastné kyseliny ve vzorku. Byly zjištěny vysoké rozdíly obsahu mikroorganismů ve stolici u veganů a jedinců na konvenční dietě (Peltonen a kol., 1992).



Obrázek 7 MNOŽSTVÍ BAKTERIÍ NA GRAM VÝKALU *Bacteroides* sp.;

• aerobic gram-negative rods; ▲ anaerobic gram-positive bacteria;

– *Lactobacillus* sp.; ° anaerobní gram-negativní bacteria; △ *Enterococcus* sp. (Peltonen 1992)

2.6 Možnosti sledování složení střevní mikroflóry

Složení střevní mikrobioty, zastoupení a kvantitu různých bakteriálních a dalších skupin můžeme sledovat pomocí kultivačních metod na selektivních pěstebních prostředcích nebo přímým stanovením v původním vzorku bez kultivace.

Sledování pomocí kultivace je velice jednoduché a řadíme jej mezi takzvané referenční metody. Izolaci a kultivaci bakterií poprvé použil Robert Koch (1843–1910). Nicméně možnosti kultivace jsou omezené. Jedná se o plotny se selektivními agary pro jednotlivé druhy mikroorganismů. Každá kultivační plotna s agarem by měla obsahovat zdroj dusíku, uhlíku, zdroj energie pro mikroorganismy, pufovací soli pro udržení určitého pH rozpětí a růstové faktory pro kultivované bakterie. Ze vzorku stolice je připravena ředící řada a jednotlivá ředění jsou nanášena na kultivační misky s agarem nebo v případě anaerobů jsou agarem přelity a poté kultivovány za podmínek odpovídajících detekované bakteriální skupině, rodu či druhu. Na kultivačním agaru narostou v takzvané kolonie, viditelné pouhým okem, s těmito jednotlivými koloniemi dále pracujeme. Již pouhým okem můžeme zjistit stav bakterií, záleží tady na vzhledu i konzistenci jednotlivých kolonií, které poté můžeme sledovat mikroskopem. V případě kultivace pak můžeme jednotlivé bakteriální kolonie - izoláty identifikovat pomocí různých molekulárně-genetických metod, biochemických testů a hmotnostní chromatografie. Z molekulárně genetických metod je v současnosti asi nejrozsáhlejší a nejspolehlivější sekvenování. Rozšířená a zavedená je především polymerázová řetězová reakce (PCR) s použitím rodově či druhově specifických sond.

Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace FISH je dnes velmi rozšířenou metodou, umožňuje identifikovat jednotlivé mikrobiální buňky bez kultivace a izolace DNA za pomoci fluorescenčního mikroskopu, či průtokové cytometrie (Lenaerts a kol., 2007). Je to hybridizace s použitím rRNA specifické oligonukleotidové sondy, která je fluorescenčně značená (DeLong a kol., 1999). Každá sonda má vlastní specifitu rozpoznání určité bakterie. Tato metoda má výhodu, že může být kvantitativní a automatizovaná, pomocí průtokové cytometrie a snímání počítačem může být zaznamenán obraz analýzy, což zobrazí i prostorové rozložení bakterií (Palma a kol., 2009).

Další možností je izolace totální bakteriální DNA přímo ze stolice bez kultivace s následnou identifikací a kvantifikací bakteriálních skupin.

Q-PCR nebo také real time PCR je kvantitativní řetězová polymerázová reakce ve skutečném čase. Tato metoda se skládá z několika protokolů spojených v řadě: odběr a příprava vzorku, čištění nukleové kyseliny, amplifikace a interpretace dat (Haugland a kol., 2005). Kvantifikace se provádí pomocí fluorescenčně značené specifické sondy, nebo pomocí nesekvenčně specifického DNA barviva (SYBER) v průběhu amplifikace cílového genu. Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci cílové DNA ve vzorku, to znamená, že je úměrná také výskytu cílových bakterií. Tato Q-PCR může být použita jak pro absolutní, tak i relativní kvantifikaci bakterií (Cheng a kol., 2013, Gill a kol., 2008; Ott a kol., 2004).

Metagenomika je nový rozvíjející se vědní obor zabývající se genomickou analýzou seskupení mikroorganismů. Pomocí těchto metod jsme objevili asi stokrát větší množství bakterií, než se nám podaří objevit pouhou kultivací a to navíc v přirozeném prostředí. Jedná se o komplexní studium složení, struktury a funkce mikroflóry, veškeré informace získáme v jednom kroku (Gill a kol., 2006; Kurokawa a kol., 2007). S touto metodou se extrahuje celá DNA ze vzorku a je automaticky sekvenován celý genom (Hess a kol., 2011; Tasse a kol., 2010). Vše se identifikuje za pomoci databází například „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“, tyto databáze nejsou však zatím úplné a zcela dostupné.

3. Hypotéza

Strava je hlavním faktorem ovlivňujícím složení a metabolismus střevní mikrobioty. V některých pracích autoři uvádějí, že vegetariánská strava má značné, pozitivní vlivy na složení střevní mikrobioty lidí, čímž pozitivně ovlivňuje celkové lidské zdraví. To je ovlivněno především vysokým obsahem nestravitelných oligosacharidů. U vegetariánů a veganů lze tedy očekávat rozdílné zastoupení bakteriálních skupin ve stolici oproti lidem s konvenční dietou.

4. Cíl práce

Cílem práce bylo porovnat složení a kvantitu střevní mikrobioty lidí na konvenční dietě, vegetariánů a veganů pomocí kultivace na selektivních mediích. A dále porovnat obsah mikrobiálních metabolitů bakterií ve stolici pomocí iontové chromatografie.

5. Metodická část

5.1 Informace o dárcích

V našem pokusu byla testována stolice 21 dárců, z nichž deset bylo na konvenční dietě a jedenáct vegetariánů. Jeden dárc z vegetariánů byl kojeneček, a proto v některých statistikách není zahrnut.

Každá skupina se skládala z jednoho dítěte ve věku 7 let a devíti dospělých ve věkovém rozmezí 21, až 50 let, mužů a žen. Informace o dárcích uvádí tabulka číslo 3.

SKUPINA	VEGETARIÁNI		VŠEŽRAVCI	
Vzorek	VĚK	POHLAVÍ	VĚK	POHLAVÍ
1	32	F	28	F
2	34	F	29	F
3	7	F	50	M
4	39	M	26	F
5	27	F	7	F
6	30	F	24	F
7	36	F	24	M
8	21	F	36	F
9	33	F	36	F
10	32	F	26	F
11	2měsíce	M		

Tabulka 3 Základní údaje o dárcích M-muž F-žena

5.2 Odběr vzorku

Každému z dárců byl předán kit na odběr vzorku skládající se ze skleněné zkumavky, ve které byl připraven živný bujon Wilkins-Chalgren (Oxoid) se záznamem o její váze, dále kryozkumavka, špachtle na odebrání vzorku, neprůhledného zipového sáčku a návodu na odběr a případné uchovávání.

Odběr vzorku se prováděl z čerstvé stolice. Vzorek o váze zhruba 1 g (velikost lískového oříšku) tedy na hrot špachtle, byl převeden do zkumavky s bujonem a promíchán, tak, aby byl vzorek ponořen, ale zároveň tak, aby nedošlo k přílišnému kontaktu s kyslíkem, nepřitelem anaerobních mikroorganismů. Do kryozkumavky (eppendorfký), bylo odebráno stejné množství vzorku, čili kolem 1 g stolice. Dárce musel také dávat pozor, aby se bujon ze zkumavky neulil, ba dokonce vylil, to by znamenalo nekorektnost váhy a způsobilo by chybu. Dále musel dát pozor, aby se nesmazaly číselné údaje na zkumavkách. Po odběru byl vzorek ihned v chladu přepraven do laboratoře popřípadě skladován v chladícím zařízení a v co nejzazší době do 12 hodin předán k rozboru.

5.3 Kultivační stanovení

Jednotlivé vzorky byly podrobeny analýze, tedy rozboru pomocí kultivace na selektivních médiích, kde byly detekovány a kvantifikovány jednotlivé skupiny mikroorganismů. Ty se na selektivní média převedou tzv. inokulací - zaočkováním inokula. Jednalo se o rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, dále G- bakterie, enterokoky, koliformní bakterie a *Escherichia coli*. Tabulka číslo 4 nám udává podmínky kultivace jednotlivých skupin. Dále pak v tabulce číslo 5, uvádím podrobné složení kultivačních médií.

ROD	KULTIVACE		
	TEPLOTA[°C]	ČAS	ATMOSFÉRA
<i>Bifidobacterium</i>	37	48 hod	anaerobní
<i>Lactobacillus</i>	37	48 hod	mikroaerofilní
G- bakterie	37	48 hod	anaerobní
<i>Enterococcus</i>	37	48 hod	aerobní
<i>Escherichia coli</i>	37	24 hod	aerobní
Koliformní bakterie	37	24hod	aerobní

Tabulka 4 PODMÍNKY KULTIVACE

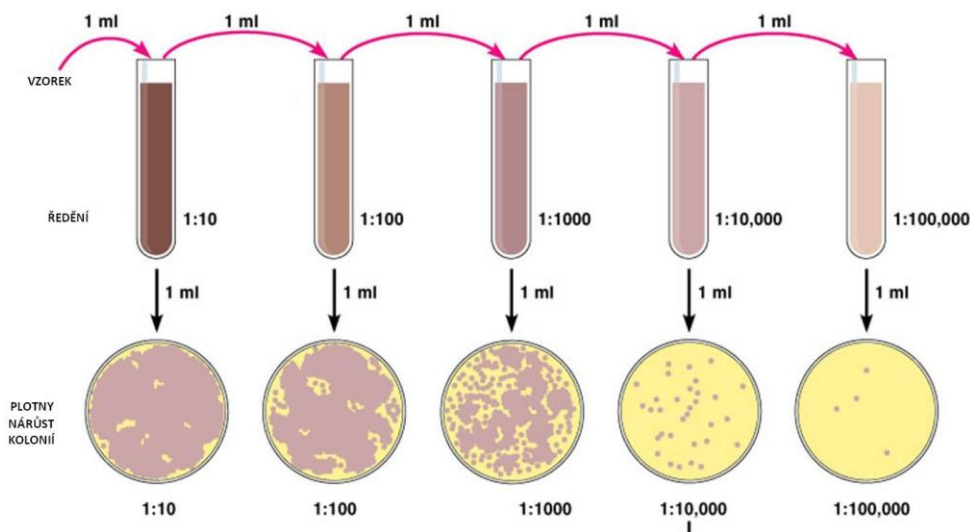
SKUPINA	SLOŽENÍ SELEKTIVNÍHO MÉDIA	MNOŽSTVÍ
CELKOVÉ POČTY	agar Wilkins-Chalgren (Oxoid)	4,3g
	sojový pepton (Oxoid)	0,5g
	L-cystein (Sigma)	0,05g
	Tween 80 (Sigma)	0,1ml
	destilovaná voda	100ml
BIFIDOBACTERIE	agar Wilkins-Chalgren (Oxoid)	4,3g

	sojový pepton (Oxoid)	0,5g
	L-cystein (Sigma)	0,05g
	Tween 80 (Sigma)	0,1ml
	destilovaná voda	100ml
	Mupirocin (Oxoid)	10 mg
	Ledová kyselina octová	100 μ l
LAKTOBACILY		
	agar Rogosa (Oxoid)	6g
	destilovaná voda	94ml
	kyselina octová (Sigma)	132 μ l
GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE		
	agar Wilkins-Chalgren (Oxoid)	4,3g
	L-cystein (Sigma)	0,05g
	destilovaná voda	100ml
	koňská krev (Oxoid)	5ml
	G- suplement (Oxoid)	2ml
ESCHERICHIA COLI		
	TBX medium (Oxoid)	3,7g
	destilovaná voda	100ml
ENTEROKOKY		
	Slanetz a Bartley medium	4,2g

(Oxoid)	
destilovaná voda	100ml

Tabulka 5 SLOŽENÍ SELEKTIVNÍCH MÉDIÍ

Pro kulturační stanovení ze vzorku byla nejprve vytvořena ředící řada, což je série roztoků s klesající koncentrací. Zkumavka se vzorkem stolice byla 1. ředěním, kdy došlo k jejímu zvážení, a byla odečtena hmotnost zkumavky před odběrem. Vzniklý rozdíl byl vydělený číslem 1. Takto bylo zjištěno množství vzorku, které bylo třeba aplikovat do 2. ředění. Poté už byl po promíchání aplikován vždy 1 ml vzorku z předchozí zkumavky do následujících. Ve zkumavkách ředící řady máme předem připraven ředící roztok (Peptonová voda, Oxoid). Tak pokračujeme, až do poslední zkumavky viz obrázek číslo 8. Z této řady pak vybereme ředění, ve kterých předpokládáme nárůst kolonií stanovovaných bakterií, které je možno v tomto ředění i detekovat. Pokud je ředění příliš malé dojde k velkému nárůstu kolonií a ty pak není možné detekovat a počítat, jak je také vidět na obrázku číslo 8.



Obrázek 8 TVORBA ŘEDÍCÍ ŘADY (<http://2014.igem.org/Team:NYMU-Taipei/safety>)

Na základě předpokládaných počtů jednotlivých kvantifikovaných bakteriálních skupin byly z ředících řad vybrány následující ředění (celkové počty 7-9, pro bifidobakterie 3-9, pro laktobacily 3-8, pro gramnegativní bakterie 7-9, pro plotny s TBX médiem na

stanovení *Escherichia coli* 3-9 a pro plotny s SB médiem pro enterokoky 2-6 ředění) a ty aplikovány na Petriho misky injekční stříkačkou. Vše musí probíhat za aseptických podmínek, jich dosáhneme přítomností plamene a použitím sterilních pomůcek.

Pro stanovení celkových počtů anaerobních bakterií, bifidobakterií a gramnegativních bakterií přeneseme vždy jeden ml každého zvoleného ředění na Petriho misku a přelijeme agarem, zamícháme, uzavřeme a vložíme do nádoby s anaerobní atmosférou (AnaeroPack, Thermo Scientific).

Při stanovení laktobacilů se vzorek agarem přelévá a to 2krát, pro vytvoření mikroaerofilního prostředí a uzavře se do folie. U stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií na TBX, či enterokoků na SB médiu byl nanesen vzorek na Petriho misku s utuhlým médiem a rozetřen sterilní skleněnou tyčinkou. Takto připravené půdy jsme dali inkubovat, dobu inkubace máme uvedenou v tabulce číslo 4.

Podmínky pro inkubaci - je důležité, udržení určitého pH, čehož dosáhneme pufrů, udržení optimální teploty růstu pro jednotlivé druhy bakterií a přítomnost, či nepřítomnost kyslíku, protože některé bakterie řadíme mezi anaeroby a jiné jsou aerobní. Pokud provádíme anaerobní kultivaci je důležité vzorky inkubovat v anaerostatu (obrázek č. 9), což je vzduchotěsná nádoba ze které kyslík odčerpáváme a vytvoříme takzvaně řízenou atmosféru, kdy kyslík nahradíme jiným plynem (CO_2 , H_2).



Obrázek 9 anaerostat <http://web.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/yuka/cns/abscesy.htm>

5.4 Kvantifikace bakterií

Kvantifikací bakterií se rozumí stanovení počtu mikroorganismů, jejichž výsledkem je hodnota vyjádřená jednotkou KTJ (kolonie tvořící jednotka)/ CFU (Colony Forming Unit).

Narostlé kolonie byly spočítány pomocí počítačky kolonií a označeny nesmazatelným fixem. Počet KTJ byl vypočítán podle vzorce:

$$\text{KTJ/g} = \sum(a+b+c+d) / [V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2)] \cdot d$$

a, b, c, d..... součty všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách

V..... použitý objem inokula

n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění

n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění

d..... faktor prvního pro výpočet použitého ředění

Pro ověření selektivity testovaných médií byla také provedena mikroskopická kontrola morfologie kolonií. Ta byla provedena odběrem vybrané kolonie mikrobiologickou kličkou či jehlou a rozetřena na podložní skličko, překryta sklíčkem krycím a pozorována při zvětšení min 400x.

Získané hodnoty, přesněji počty jednotlivých bakteriálních skupin v závislosti na dietě byly poté porovnány a statisticky vyhodnoceny pomocí testů v programu STATISTICA 12 a to dvouvýběrovým (párovým) t-testem.

5.5 Měření obsahu metabolitů

Obsah metabolitů ze vzorků stolice jsme stanovovali iontovou chromatografií s potlačenou vodivostí na iontovém chromatografu (ICS 1600; Dionex, USA). Jedná se o metodu založenou na principu elektrostatické interakce, kdy dojde k odtržení iontu (bílkoviny) vázaného v tuhé nemísitelné fázi, jeho převodu do roztoku a následnou náhradu jiným iontem (bílkovinou) z roztoku.

Navážený 1 g vzorku stolice byl převeden do 15 mililitrové zkumavky Neptun, a poté byl homogenizován v 10 ml destilované vody. Následně byl vzorek stočen po dobu 3 minut

při 10 tisících otáčkách. Ze získaného supernatantu byl odpipetován 1 ml, který byl následně 100x naředěn a přefiltrován přes bakteriologický filtr. Takto získaný vzorek, byl poté použit pro vlastní analýzu obsahu esterů/ solí mastných kyselin s krátkým řetězcem (kyselina valerová, isovalerová, máselná, isomáselná, kyselina propionová, octová a kyselina mravenčí) a dalších metabolitů jako laktátu, malátu, pyrulátu a sukcinátu.

5.6 Měření pH stolice

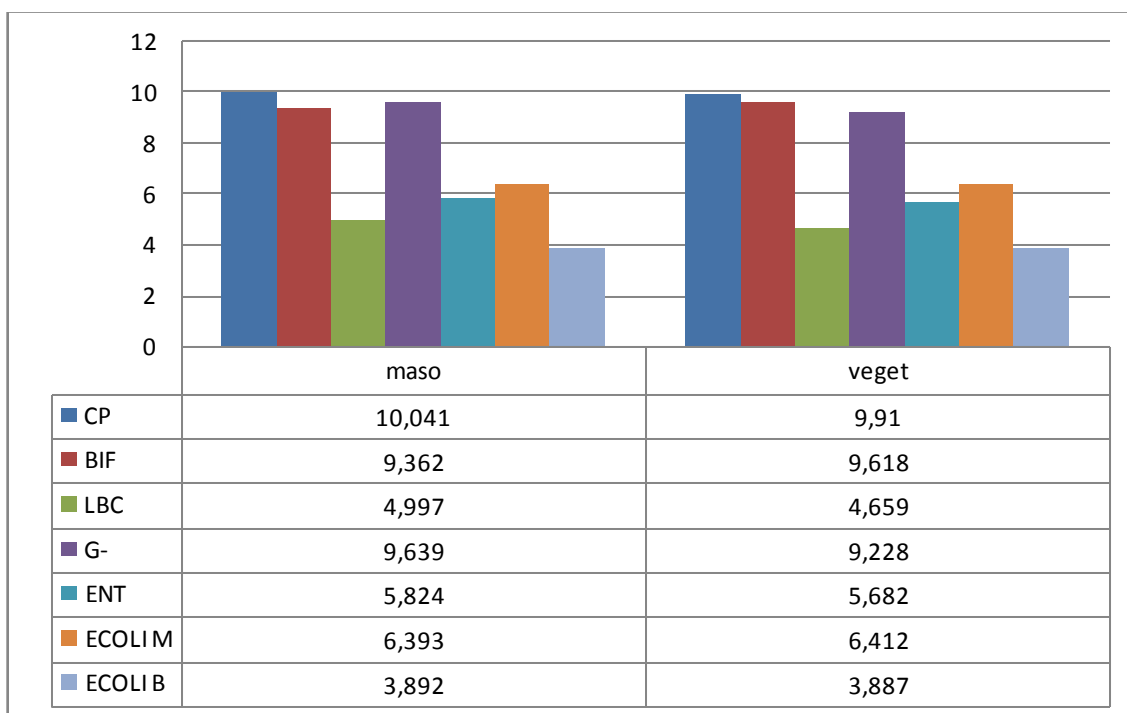
Měření pH stolice dárců bylo prováděno pomocí pH metru Handylab (SchottGlas, Mainz, Německo) a dotykové pH elektrody THETA 90 HC 163 (Česká Republika). Vzorky stolice byly v tenké vrstvě natřeny na podložní sklíčka a po přiložení dotykové elektrody byla změřena hodnota pH daného vzorku. Měření probíhalo při pokojové teplotě.

6. Vyhodnocení výsledků

V této bakalářské práci jsme se věnovali kultivaci a kvantifikaci bakteriální mikroflóry a jejich metabolitů ve stolici jedinců s rozdílnou dietou. Sledovali jsme rozdíly ve složení této mikrobioty u lidí na konvenční dietě a vegetariánů. Sledované skupiny byly složeny z devíti dospělých jedinců různého pohlaví a jednoho dítěte ve věku sedmi let. Dále jsme také testovali stolicí dvouměsíčního kojence kojeného vegetariánskou matkou.

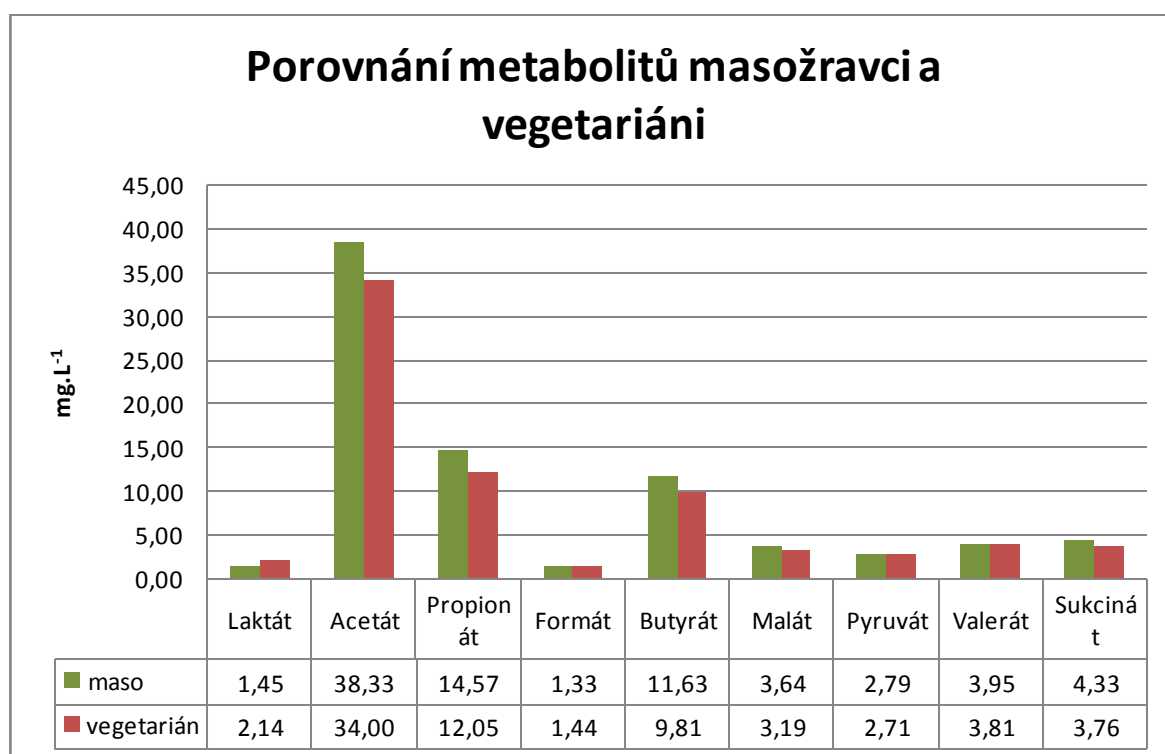
Na obrázku číslo 10 je graficky znázorněné množství jednotlivých bakteriálních skupin (log KTJ/ g stolice) sledovaných v lidské stolici masožravců, tedy lidí na konvenční dietě a vegetariánů.

Zde je viditelné, že rozdíly jsou nepatrné, nicméně stolice masožravců obsahovala více laktobacilů, gramnegativních bakterií, enterokoků, a u vegetariánů bylo detekováno více bifidobakterií.



Obrázek 10 Grafické znázornění obsahu jednotlivých bakteriálních skupin (log KTJ/ g stolice) u lidí na konvenční dietě a vegetariánů CP-celkové počty anaerobních bakterií, BIF-bifidobakterie, LBC-laktobacilů, G- -gramnegativní bakterie, ENT-enterokoky, ECOLI M-*Escherichia coli*, ECOLI B- koliformní bakterie

Při porovnání průměrných množství metabolitů u masožravců a vegetariánů, což je znázorněno grafem na obrázku číslo 11. Vidíme, že u masožravců bylo vyšší množství acetátu svědčícího o přítomnosti bifidobakterií, což nekoreluje s výsledky kultivace, kdy byly u masožravců detekovány nižší hodnoty bifidobakterií než u vegetariánů (obrázek 10). Dále byl u masožravců také vyšší obsah propionátu, butyrátu, malátu a sukcinátu. U vegetariánů bylo naměřeno větší množství laktátu, což by odpovídalo vyššímu množství laktobacilů, to se ovšem v naší práci nepotvrdilo (obrázek 10,11). V podstatě srovnatelná množství byla naměřena u formátu, pyruvátu a valerátu.



Obrázek 11 porovnání množství metabolitů masožravců a vegetariánů

Průměrné množství sledovaných celkových počtů anaerobních bakterií u masožravců, tedy lidí s konvenční dietou byl stanoven na $10,041 \pm 0,377$ log KTJ/ g stolice, u vegetariánů dosáhli průměrné hodnoty $9,91 \pm 0,355$. Přičemž největší množství měl masožravec mužského pohlaví dvacet čtyři let věku $10,75 \pm 0,377$. V rámci vegetariánů byla zkoumána i stolice dvouměsíčního kojence (není zařazen do statistik), u kojence byl naměřen obsah celkových počtů anaerobních bakterií $10,8 \pm 0,431$ log KTJ/ g stolice.

Při stanovení bifidobakterií u testovaných vzorků masožravců jsme průměrně našli $9,362 \pm 0,571$ log KTJ/ g stolice. Průměrná hodnota bifidobakterií vegetariánů byla $9,618 \pm 0,347$. Jedná se tedy o bakterie, jejichž hodnota byla vyšší u vegetariánů.

Celkově nejvyšší množství byla naměřena u třicetileté ženy vegetariánky $10,2 \pm 0,347$. A dále pak u kojence, kde bylo naměřeno $10,25 \pm 0,380$ log KTJ/ g stolice.

Průměrné naměřené množství laktobacilů bylo vyšší u masožravců, kde hodnota dosáhla $4,997 \pm 1,174$ log KTJ/ g stolice, přičemž nejvyšší hodnoty dosáhl vzorek dvaceti šestileté ženy $6,75 \pm 1,174$. U vegetariánů byla naměřena průměrná hodnota $4,659 \pm 1,145$ log KTJ/ g stolice laktobacilů. U kojence bylo stanoveno vysoké množství a to $8,11 \pm 1,504$ log KTJ/ g stolice.

U jedinců na konvenční dietě byla dále naměřena průměrná hodnota obsahu gramnegativních bakterií $9,639 \pm 0,599$ log KTJ/ g stolice. Přičemž nejvyšší množství bylo naměřeno ve stolici dvaceti čtyřletého muže všežravce $10,47 \pm 0,599$. U vegetariánů dosahovalo průměrné množství gramnegativních bakterií $9,228 \pm 0,347$. A ve stolici testovaného kojence bylo nalezeno množství $9,08 \pm 0,330$ log KTJ/ g stolice.

Průměrná hodnota enterokoků u masožravců měla hodnotu $5,824 \pm 0,655$ log KTJ/ g stolice. Ve vzorcích stolice vegetariánů bylo naměřeno průměrné množství enterokoků $5,682 \pm 1,519$. U kojence bylo nalezeno $9,40 \pm 1,826$ log KTJ/ g stolice.

V našich rozbořech byly stanovovány i koliformní bakterie a druh *Escherichia coli*. Vyšší množství *E. coli* byla naměřena u vegetariánů. U masožravců dosáhla průměrná množství hodnot $6,393 \pm 1,173$ log KTJ/ g stolice pro *E. coli* a $3,892 \pm 3,358$ log KTJ/ g stolice u koliformních bakterií. Nejnižších, v tomto případě nulových hodnot (kultivačně nedekovatelných) dosáhly čtyři testované vzorky z masožravců a čtyři vzorky vegetariánů. Při stanovování *E. coli* ve stolicích vegetariánů dosáhlo průměrné množství hodnoty $6,412 \pm 1,391$ pro *E. coli* a $3,887 \pm 3,441$ pro koliformní bakterie, tedy srovnatelné s masožravci. U kojence bylo naměřeno poměrně velké množství $9,63 \pm 1,638$ log KTJ/ g stolice *E. coli* a nulová hodnota pro koliformní bakterie.

Při statistickém zpracování naměřených dat vegetariánů a lidí na konvenční dietě pomocí t-testu, nebyl shledán u žádného ze zjištěných druhů statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami. Test se prováděl na hladině významnosti $p < 0,05$. Výsledky statistické analýzy jsou v tabulce na obrázku číslo 12.

Proměnná	t-testy; grupováno: Prom1 (hodnoty) Skup. 1: všežravci Skup. 2: vegetariáni										
	Průměr všežravci	Průměr vegetariáni	t	sv	p	Poč. plat všežravci	Poč. plat. vegetariáni	Sm.odch. všežravci	Sm.odch. vegetariáni	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
bif	9,38000	9,618000	-1,09080	18	0,289748	10	10	0,596657	0,346500	2,965129	0,121086
lbc	4,99700	4,659000	0,65163	18	0,522874	10	10	1,174366	1,145149	1,051678	0,941400
cp	10,04100	9,910000	0,79940	18	0,434481	10	10	0,377637	0,354871	1,132425	0,856066
g-	9,63900	9,227778	1,80232	17	0,089253	10	9	0,599008	0,346907	2,981525	0,138751
ent	5,82400	5,682000	0,27141	18	0,789164	10	10	0,654899	1,519348	5,382265	0,019613
ecoli m	6,39300	6,412000	-0,03302	18	0,974020	10	10	1,173088	1,390818	1,405657	0,620152
ecoli b	3,89200	3,887000	0,00329	18	0,997412	10	10	3,357584	3,441379	1,050536	0,942661
pH	6,68000	6,565000	0,43897	18	0,665907	10	10	0,515299	0,648678	1,584672	0,503597

Obrázek 12 Výsledky T-testu pro jednotlivé skupiny bakterií a pH všežravců(masožravců) a vegetariánů. CP-celkové počty anaerobních bakterií, BIF-bifidobakterie, LBC-laktobacilů, G- -gramnegativní bakterie, ENT-enterokoky, ECOLI M-*Escherichia coli*, ECOLI B- koliformní bakterie

Naměřená množství metabolitů, solí mastných kyselin s krátkým řetězcem (kyselina valerová a isovalerová-valerát, kys. máselná a isomáselná -butyrát, kyselina propionová-propionát, kys. octová-acetát a kyselina mravenčí-formát) a dalších metabolitů jako laktátu, malátu, pyruvátu a sukcinátu jsou zaznamenány v následujících tabulkách číslo pět, šest a sedm.

	Laktát	Acetát	Propionát	Formát	Butyrát	Malát	Pyruvát	Valerát	Sukcinát
masožravec	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
1	1,16	42,11	12,69	1,51	10,22	3,04	2,68	5,25	3,57
2	0,57	17,28	8,39	1,18	6,06	3,08	1,84	2,37	3,62
3	1,08	40,83	17,83	1,64	16,52	3,14	2,62	5,36	3,69
4	0,48	47,01	16,44	1,48	12,31	2,48	2,56	4,49	2,91
5	1,89	54,47	16,41	1,39	25,55	13,85	4,18	3,60	16,78
6	1,94	29,86	19,21	1,40	10,90	1,67	3,74	5,06	1,95
7	3,89	29,26	14,71	0,78	6,17	2,99	3,51	0,99	3,52
8	0,78	29,01	8,77	1,32	7,88	1,99	2,25	3,09	2,33
9	0,51	51,80	17,95	0,79	11,31	2,15	1,42	3,80	2,52
10	2,17	41,68	13,26	1,84	9,34	2,01	3,12	5,49	2,36

Tabulka 5 Množství metabolitů u masožravců

vegetarián	Laktát mg L ⁻¹	Acetát mg L ⁻¹	Propionát mg L ⁻¹	Formát mg L ⁻¹	Butyrát mg L ⁻¹	Malát mg L ⁻¹	Pyruvát mg L ⁻¹	Valerát mg L ⁻¹	Sukcinát mg L ⁻¹
1	0,73	13,90	6,14	0,93	3,99	1,31	1,30	2,08	1,54
2	1,22	11,70	4,33	1,15	2,71	0,86	0,91	1,10	1,01
3	1,89	36,44	10,75	1,25	10,59	4,20	2,56	3,51	4,95
4	2,74	31,61	13,02	1,70	9,51	3,43	3,17	4,81	4,03
5	0,88	32,70	12,84	1,48	7,81	2,56	2,39	4,56	3,01
6	7,65	54,50	17,35	2,02	9,61	3,32	4,05	4,93	3,90
7	1,79	42,15	17,03	1,47	19,55	2,25	4,94	5,76	2,64
8	2,27	20,21	7,67	1,38	3,23	1,84	1,91	2,53	2,16
9	0,60	39,78	13,86	1,66	10,61	9,07	2,09	3,46	10,83
10	1,68	57,05	17,50	1,38	20,45	3,04	3,74	5,38	3,57

Tabulka 6 Množství metabolitů vegetariáni

Po statistickém zpracování dat (STATISTICA 12) pomocí t-testu (tabulka na obrázku číslo13) opět nebyl na hladině významnosti $p < 0,05$ nalezen žádný statisticky významný rozdíl. Při porovnání jednotlivých průměrných hodnot obsahovala stolice vegetariánů větší množství laktátu, což by odpovídalo většímu množství laktobacilů ve stolici a formátu. Ostatní metabolity dosahovali vyšších průměrných množství u masožravců (všežravců) obrázek číslo 14.

Proměnná	t-testy: grupováno: Prom1 (Upravená kopie Copy of veg a maso bakteriální metabolity)										
	Průměr vegetarián	Průměr všežravci	t	sv	p	Poč.plat vegetarián	Poč.plat všežravci	Sm.odch. vegetarián	Sm.odch. všežravci	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
Lactate	2,14468	1,44621	0,95570	18	0,351886	10	10	2,05251	1,06237	3,732637	0,062873
Acetate	34,00445	38,32936	-0,70478	18	0,489968	10	10	15,47805	11,70482	1,748649	0,417777
Propionate	12,04887	14,56719	-1,31426	18	0,205260	10	10	4,74691	3,76603	1,588744	0,501242
Formate	1,44170	1,33414	0,74556	18	0,465557	10	10	0,30639	0,33801	1,217060	0,774588
Butyrate	9,80591	11,62653	-0,68178	18	0,504058	10	10	6,15582	5,78067	1,134009	0,854467
Malate	3,18791	3,64031	-0,33309	18	0,742917	10	10	2,30153	3,62632	2,482556	0,191747
Pyruvate	2,70618	2,79062	-0,17466	18	0,863295	10	10	1,26555	0,85768	2,177227	0,261980
Valerate	3,81276	3,94835	-0,20095	18	0,842990	10	10	1,53700	1,47998	1,078538	0,912175
Succinate	3,76286	4,32631	-0,34195	18	0,736348	10	10	2,75584	4,42224	2,574993	0,175039

Obrázek 13 t-test hodnot mikrobiálních metabolitů STATICTICA12

vegetariáni										
Proměnná	Popisné statistiky (Upravená kopie Copy of veg a maso bakteriální metabolity)									
	N platných	Průměr	Medián	Modus	Četnost modu	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.	Var.koef.
Lactate1	10	2,14468	1,73690	Vícenás.	1	0,59960	7,64870	4,2128	2,05251	95,70218
Acetate1	10	34,00445	34,57095	Vícenás.	1	11,70250	57,04780	239,5700	15,47805	45,51771
Propionate1	10	12,04887	12,93385	Vícenás.	1	4,32820	17,49990	22,5331	4,74691	39,39712
Formate1	10	1,44170	1,42785	Vícenás.	1	0,92740	2,01900	0,0939	0,30639	21,25213
Butyrate1	10	9,80591	9,56115	Vícenás.	1	2,71410	20,45470	37,8942	6,15582	62,77666
Malate1	10	3,18791	2,79835	Vícenás.	1	0,86290	9,06700	5,2970	2,30153	72,19559
Pyruvate1	10	2,70618	2,47775	Vícenás.	1	0,90930	4,94060	1,6016	1,26555	46,76503
Valerate1	10	3,81276	4,03440	Vícenás.	1	1,10410	5,76200	2,3624	1,53700	40,31208
Succinate1	10	3,76286	3,28675	Vícenás.	1	1,00890	10,82600	7,5947	2,75584	73,23793
všežravci										
Proměnná	Popisné statistiky (Upravená kopie Copy of veg a maso bakteriální metabolity)									
	N platných	Průměr	Medián	Modus	Četnost modu	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.	Var.koef.
Acetate2	10	38,32936	41,25495	Vícenás.	1	17,27510	54,46670	137,0029	11,70482	30,5375
Propionate2	10	14,56719	15,56065	Vícenás.	1	8,39290	19,21160	14,1830	3,76603	25,8528
Formate2	10	1,33414	1,39765	Vícenás.	1	0,78460	1,84000	0,1143	0,33801	25,3357
Butyrate2	10	11,62653	10,56055	Vícenás.	1	6,05520	25,54560	33,4161	5,78067	49,7196
Malate2	10	3,64031	2,73605	Vícenás.	1	1,66640	13,84700	13,1502	3,62632	99,6157
Pyruvate2	10	2,79062	2,64910	Vícenás.	1	1,41900	4,18000	0,7356	0,85768	30,7344
Valerate2	10	3,94835	4,14260	Vícenás.	1	0,98600	5,48590	2,1904	1,47998	37,4836
Succinate2	10	4,32631	3,21315	Vícenás.	1	1,95200	16,78200	19,5562	4,42224	102,2173
Lactate2	10	1,44621	1,12070	Vícenás.	1	0,47850	3,88730	1,1286	1,06237	73,4590

Obrázek 14 Statisticky zpracovaná data obsahu metabolitů popisné statistiky STATISTICA12

U vzorku dvouměsíčního vegetariánského kojence byla naměřena následující množství (tabulka 7).

	Laktát	Acetát	Propionát	Formát	Butyrát	Malát	Pyruvát	Valerát	Sukcinát
kojenec									
vegetarián									
mg L ⁻¹	10,85	23,92	8,88	1,36	2,47	0,61	1,51	0,12	0,71

Tabulka 7 Množství metabolitů u kojence vegetariánské matky

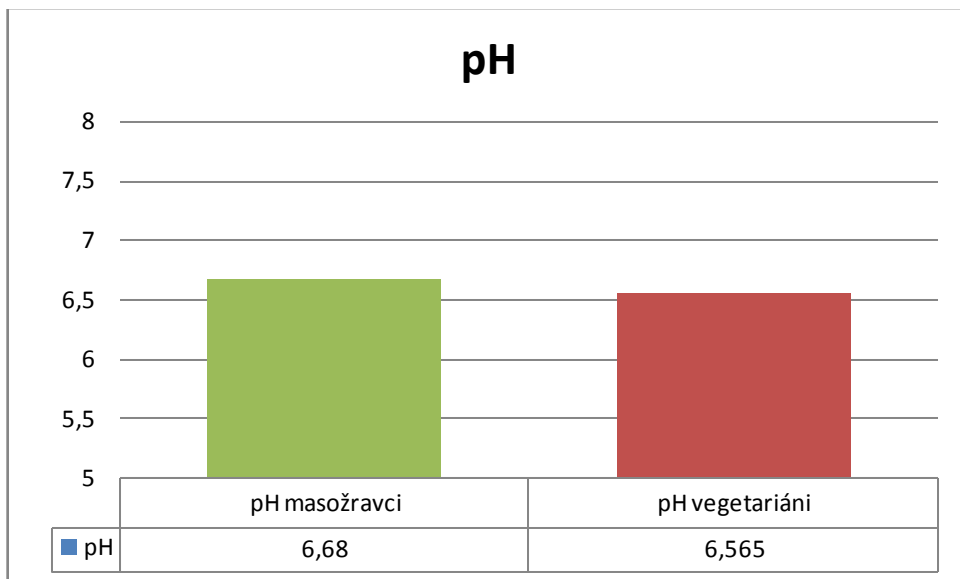
Vysoká naměřená množství laktátu a sukcinátu ve vzorku stolice kojence koresponduje s vyšším množstvím laktobacilů a bifidobakterií vyskytující se v tlustém střevě kojenců.

U hodnot pH jednotlivých vzorků stolice byl zjištěn nepatrný rozdíl, kdy hodnoty průměrného pH byly o 0,115 vyšší u masožravců. Jednotlivé výsledky jsou znázorněny v tabulce číslo 8 a grafické znázornění v obrázku číslo 15.

Pomocí statistické analýzy (programem Statistica 12) viz obrázek číslo 14, nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v hodnotách pH masožravců a vegetariánů.

osoba	pH masožravec	pH vegetarián
1	6,59	7,1
2	7,33	6,93
3	6,41	6,11
4	6,6	6,05
5	5,93	7,43
6	6,1	5,84
7	7,1	5,78
8	7,5	7,12
9	6,87	7,23
10	6,37	6,06
průměr	6,68	6,565

Tabulka 8 Hodnoty pH jednotlivých vzorků stolice



Obrázek 14 Grafické znázornění hodnot pH u vegetariánů a masožravců

7. Diskuze

Na složení střevní mikrobioty mají vliv genetické faktory a faktory okolního prostředí. Střevní mikrobiota člověka se v průběhu života mění a závisí také na složení přijímané stravy. Tato střevní mikrobiota pozitivně ovlivňuje zdraví jedince. Jedná se o jakousi symbiózu s imunitním systémem člověka a o produkci a přeměnu nutričně, životně důležitých látek. Proto tématem mé bakalářské práce byl rozdíl ve složení střevní mikrobioty lidí s konvenční dietou a vegetariánů. Kdy jsme předpokládali, na základě dosavadních vědeckých poznatků a prací, rozdíly ve střevní mikrobiotě.

Výsledky mnoha studií dokazují, že snížený příjem, či úplné vynechání masa ze stravy příznivě ovlivňují výskyt chronických onemocnění jako je cukrovka druhého typu, obezita, zánětlivá onemocnění střev, některých druhů rakoviny trávicího traktu a kardiovaskulárních onemocnění (Matijašič a kol., 2013). V mnohých studiích zabývajících se právě touto problematikou, tedy vlivem diety na složení střevní mikrobioty bylo prokázáno, že střevní mikroorganismy vyskytující se v tlustém střevě masožravců (lidí s konvenčním typem stravování) se významně kvantitativně i druhově liší od mikrobiotického osídlení střev vegetariánů. V této bakalářské práci byly ve stolici deseti vegetariánů a deseti lidí na konvenční dietě obsahující maso kultivačně kvantifikovány celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterií, lactobacilů, klostrýdií, dále G- bakterií, enterokoků, koliformních bakterií a *Escherichia coli*. Nicméně po vyhodnocení počtů těchto skupin bakterií, nebyly mezi vegetariány a masožravci shledány nijak významné rozdíly.

Je ovšem třeba zmínit fakt, že zde byla použita pouze metoda kultivace. Kdy stále častěji používané molekulárně-genetické metody jsou přesnější, jelikož v jejich výsledcích jsou zohledněny i počty špatně kultivovatelných bakteriálních skupin či druhů.

Výsledky zahraničních studií, které uvádím v této práci, byly získány pomocí nejrůznějších metod, real-time PCR (polymerázová řetězová reakce), FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), GLC (chromatografie plyn-kapalina), DGGE (denaturační gradientové elektroforéza).

Výsledky mé práce neprokazují statisticky významné rozdíly ve složení střevní mikrobioty, ovšem zaznamenala jsem v hodnotách nepatrné rozdíly, které se shodují s výsledky studie z roku 2013, která proběhla na Slovinské Univerzitě v Ljublaně (Matijašič a kol., 2013). Výsledky této studie jsou pozitivnější pro všežravce-omnivory. Tato studie

probíhala pomocí metod PCR real-time a PCR-DGGE. V mé práci se také jeví jako pozitivnější množství mikrobioty u lidí masožravců (omnivorů, všežravců), kde celkové počty dosáhli průměrné hodnoty 10,04 log KTJ/ g stolice a u vegetariánů 9,91 log KTJ/ g stolice.

Ovšem ve většině prací, jako například i ve vědecké práci na Eberhard Karls University of Tübingen v roce 2011 se setkáváme s vyšším množstvím rodu *Lactobacillum* a enterobakterií, *Enterococcus* u vegetariánů a rodu *Bifidobacterium* a *Escherichia coli* u masožravců, ovšem celkově se počty bakteriálních skupin při statistickém porovnání masožravců s vegetariány v této práci, stejně jako v naší takřka nelišily (Zimmer a kol, 2011). V této bakalářské práci, co se jednotlivých druhů týče, byl prokázán opak, vyšší množství u masožravců dosáhly skupiny bakterií laktobacilů, enterokoků, gramnegativních a koliformních bakterií. U vegetariánů byla vyšší množství stanovena u bifidobakterií a *Escherichia coli*. Tyto rozdíly mohou být způsobeny tím, že při studii byla zkoumána pouze malá skupina osob a použitá metoda není tak citlivá, je tedy třeba zařadit další metody výzkumu a hodnocení jednotlivých druhů, metody modernější a citlivější, jako byly použity i u ostatních studií.

Ve vzorku našeho kojence vegetariánské matky se vyskytovala velká množství laktobacilů, bifidobakterií a enterokoků, což je pro kojence typické a potvrdilo výsledky a znalosti z jiných studií, které poukazují na velká množství fakultativně anaerobních mikroorganismů (enterobakterií, enterokoků a laktobacilů) v prvních měsících, kde postupně přibývají i anaerobní mikroorganismy (bifidobakterie; Tojo a kol., 2014; Arboleya a kol., 2014).

Na přítomnost a množství jednotlivých druhů poukazuje i obsah metabolitů těchto mikroorganismů, mezi něž patří soli mastných kyselin s krátkým řetězcem (kyselina valerová, isovalerová, máselná, isomáselná, kyselina propionová, octová a kyselina mravenčí) acetát, laktát, malát, pyruvát a sukcinát. Stanovení metabolitů bylo provedeno iontovou chromatografií. Výsledky této analýzy nekorelují s výsledky kultivačního stanovení. Vyšší množství acetátu bylo detekováno u masožravců, což by mělo vypovídat o vyšším množství bifidobakterií, a naopak u vegetariánů bylo nalezeno vyšší množství laktátu, což by mělo korespondovat s vyšší přítomností rodu *Lactobacillus*. Tyto výsledky tedy asociují s výsledky ostatních prací.

K viditelným rozdílům dochází i při stanovení pH stolice. V některých studiích poukazují na fakt, že pH stolice se výrazně liší a vegetariáni s vegany mají pH stolice nižší,

oproti všežravcům (Zimmer a kol., 2011). Tuto hypotézu potvrzuje i naše stanovení pH u jednotlivých vzorků stolice masožravců a vegetariánů. Jedná se sice o statisticky zanedbatelný rozdíl, nicméně při grafickém znázornění a číselném porovnání průměrů je patrný. Ovšem jak již bylo řečeno, jednalo o jednorázovou analýzu, kdy mohou být výsledky ovlivněny aktuálním složením stravy i okolním prostředím jednotlivce a jeho fyzickým i psychickým stavem.

8. Závěr

Mnohé vědecké studie prokázaly, že dieta má významný vliv na složení mikrobioty jedince. V této práci se neprokázal žádný statisticky významný rozdíl mezi složením mikrobioty lidí s konvenčním typem stravování a vegetariánů. Je však třeba podotknout, že jsme pracovali s omezeným množstvím dárců a jednalo se o jednorázový odběr. Nicméně vzorky stolice těchto jedinců byly uchovány pro izolaci celkové bakteriální DNA ze stolice dárců a další výzkum. Kde se nabízí celá řada molekulárně-genetických analýz, které mohou přinést nové poznatky o vlivu diety na střevní mikrobiotu.

Citovaná literatura

1. Arboleya, S., Solís, G., Fernández, N., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Gueimonde, M. (2012). Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: A target for intervention?. *Gut microbes*, 3(6), 583-588.
2. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... & MetaHIT Consortium. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*, 473(7346), 174-180.
3. Arvanitoyannis, I. S., & Van Houwelingen-Koukaliaroglou, M. (2005). Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(5), 385-404.
4. Cecchini, D. A., Laville, E., Laguerre, S., Robe, P., Leclerc, M., Doré, J., ... & Potocki-Véronèse, G. (2013). Functional metagenomics reveals novel pathways of prebiotic breakdown by human gut bacteria. *PloS one*, 8(9), e72766.
5. Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., & O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4586-4591.
6. Clarys, P., Deliens, T., Huybrechts, I., Deriemaeker, P., Vanaelst, B., De Keyzer, W., ... & Mullie, P. (2014). Comparison of nutritional quality of the vegan, vegetarian, semi-vegetarian, pesco-vegetarian and omnivorous diet. *Nutrients*, 6(3), 1318-1332.
7. Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2013). Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, 75(1), 44-50.
8. Flint, H. J. (2011). Obesity and the gut microbiota. *Journal of clinical gastroenterology*, 45, S128-S132.
9. Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., & White, B. A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 121-131.
10. Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2015). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 74(01), 13-22.
11. Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(10), 577-589.

12. Fonty, G., (2013). Digestive microbial ecology: structure, diversity and functions of microbial communities and factors affecting their balance and activities. Annual Scientific Exchange
13. Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., & Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science & Technology Bulletin Functional Foods*, (7), 1-19.
14. Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*, 312(5778), 1355-1359.
15. Chen Gong, , Yu Wen-Hua, Zhang Qi-sheng, Song Ping, Zhang Bei-Bei, Liu Zhu, You Jing-gang and Li Heng (2013), Research of Sichuan Paocai and Lactic Acid Bacteria
16. Chiba, M., Abe, T., Tsuda, H., Sugawara, T., Tsuda, S., Tozawa, H., & Imai, H. (2010). Lifestyle-related disease in Crohn's disease: relapse prevention by a semi-vegetarian diet. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(20), 2484.
17. Jalanka-Tuovinen, J., Salonen, A., Nikkilä, J., Immonen, O., Kekkonen, R., Lahti, L., & de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PloS one*, 6(7), e23035.
18. Kabeerdoss, J., Shobana Devi, R., Regina Mary, R., & Ramakrishna, B. S. (2012). Faecal microbiota composition in vegetarians: comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *British Journal of Nutrition*, 108(06), 953-957.
19. Kim, M. S., Hwang, S. S., Park, E. J., & Bae, J. W. (2013). Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. *Environmental microbiology reports*, 5(5), 765-775.
20. Marco, M. L., Pavan, S., & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current opinion in biotechnology*, 17(2), 204-210.
21. Matijašić, B. B., Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Grabnar, I., Avguštin, G., & Rogelj, I. (2014). Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *European journal of nutrition*, 53(4), 1051-1064.
22. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5445-5451.
23. Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231-241.

24. Miquel, S., Martin, R., Rossi, O., Bermudez-Humaran, L. G., Chatel, J. M., Sokol, H., ... & Langella, P. (2013). Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Current opinion in microbiology*, 16(3), 255-261.
25. Min-Soo Kim,¹ Seong-Soo Hwang,² Eun-Jin Park and Jin-Woo Bael (2013). Strict vegetarian diet improves whit metabolit diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflamation, *Environmental Microbiology Reports*
26. Moschen, A. R., Wieser, V., & Tilg, H. (2012). Dietary factors: major regulators of the gut's microbiota. *Gut and liver*, 6(4), 411.
27. O'Connor, E. M., O'Herlihy, E. A., & O'Toole, P. W. (2014). Gut microbiota in older subjects: variation, health consequences and dietary intervention prospects. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(04), 441-451.
28. Peltonen, R., Ling, W. H., Hämmnen, O., & Eerola, E. (1992). An uncooked vegan diet shifts the profile of human fecal microflora: computerized analysis of direct stool sample gas-liquid chromatography profiles of bacterial cellular fatty acids. *Applied and environmental microbiology*, 58(11), 3660-3666.
29. Rathinam, V. A., Vanaja, S. K., Waggoner, L., Sokolovska, A., Becker, C., Stuart, L. M., & Fitzgerald, K. A. (2012). TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell*, 150(3), 606-619.
30. Reuter, G. (2001). The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. *Current issues in intestinal microbiology*, 2(2), 43-53.
31. Salazar, N., López, P., Valdés, L., Margolles, A., Suárez, A., Patterson, A. M., ... & Gueimonde, M. (2013). Microbial targets for the development of functional foods accordingly with nutritional and immune parameters altered in the elderly. *Journal of the American College of Nutrition*, 32(6), 399-406.
32. Shepard, B. D., & Gilmore, M. S. (2002). Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4(2), 215-224.
33. Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M. G., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Gueimonde, M., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(41), 15163.
34. Tonstad, S., Butler, T., Yan, R., & Fraser, G. E. (2009). Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes care*, 32(5), 791-796.

35. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-131.
36. Turrone, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A., Merusi, P., & Ventura, M. (2009). Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 75(6), 1534-1545.
37. Van Dyke, M. I., & McCarthy, A. J. (2002). Molecular biological detection and characterization of Clostridium populations in municipal landfill sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 2049-2053.
38. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3), 495-548.
39. Zhou, G. Y., Song, P., Wang, Z., Zhang, X. J., Zhang, B. B., Wang, J. Y., & Cheng, G. (2012). Collect and Performance Analysis of the Lactic Acid Bacteria Resources by SICC. *Food and Fermentation Technology*, 4, 006.
40. Zimmer, J., Lange, B., Frick, J. S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., ... & Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European journal of clinical nutrition*, 66(1), 53-60.
41. Bunešová, V. – Vlková, E. – Rada, V. – Killer, J. – Musilová, Š. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: Differences and similarities. *Beneficial Microbes*, 2014, roč. 5, č. 4, s. 377-388. ISSN: 1876-2883
42. Petr Tláškal, (2008). Dětská poliklinika FN Motol a 2. LF UK, Praha' History and present of the initial child's nutrition, *Pediatric pro Praxi*, 9(2): 86–92
43. Tomislav Švestka, (2007). IV. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha
Mikroflóra trávicího traktu a probiotika , *Pediatric pro Praxi*, 8(4): 220–221
44. Jiří Nevoral (2005). Prebiotics, Probiotics And Synbiotics, *Pediatric pro praxi*, 2(2)
45. Rokyta a kolektiv, *Fiziologie* (2000), Praha 80-85866-45-5