

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Monitoring komenzálních anaerobních bakterií
v dutině ústní a střevě člověka**

Diplomová práce

Bc. Renata Tomešová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

Konzultant práce: Eugenio Ingrubelli, MSc

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Monitoring komenzálních anaerobních bakterií v dutině ústní a střevě člověka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Nikol Modráčkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu, čas, který věnovala mé diplomové práci a zejména za její velmi vstřícný, přátelský přístup a podporu. Mé poděkování patří také pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí pracovního prostředí. Dále bych ráda poděkovala Eugeniovi Ingribellimu, MSc za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě také děkuji svému manželovi, rodině a přátelům za jejich podporu v průběhu celého studia.

Monitoring komenzálních anaerobních bakterií v dutině ústní a střevě člověka

Souhrn

V lidském gastrointestinálním traktu nalezneme velké množství mikroorganismů, které mají zásadní funkce při udržování zdraví člověka. Typickými zástupci jak v dutině ústní, tak ve střevě člověka, jsou komenzální bakterie z čeledi *Bifidobacteriaceae*. Za určitých podmínek však některé bakteriální taxony mohou být spojovány i s nežádoucími efekty. V této souvislosti jsou diskutovány bakterie rodu *Fusobacterium*, u nichž byla prokázána souvislost s řadou onemocnění.

Cílem praktické části této diplomové práce bylo kultivační stanovení počtu bakterií z čeledi *Bifidobacteriaceae* a dalších bakteriálních komenzálů přítomných ve vzorcích slin a stolice dárců bez zjevných zdravotních obtíží ($n = 30$). Dále byla cílem izolace, následná identifikace detekovaných bakterií, jejich selekce, izolace DNA a následné uložení do sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze.

U všech sledovaných skupin bakterií byly detekovány statisticky významně nižší počty ve slinách v porovnání se vzorky stolice. Průměrné celkové počty bakterií z čeledi *Bifidobacteriaceae* na selektivním médiu, s mupirocinem a kyselinou octovou, ve vzorcích slin dosahovaly hodnot $7,29 \pm 0,55 \log \text{KTJ mL}^{-1}$ a ve vzorcích stolice $8,92 \pm 0,58 \text{KTJ g}^{-1}$. Na druhém selektivním médiu, obohaceném ještě o norfloxacin, byly detekovány jejich průměrné hodnoty $7,09 \pm 0,73 \text{KTJ mL}^{-1}$ ve vzorcích slin a $8,95 \pm 0,72 \text{KTJ g}^{-1}$ ve vzorcích stolice. Bakterie rodu *Fusobacterium*, které byly stanoveny na selektivním médiu s kyselinou nalidixovou a vancomycinem, dosahovaly průměrné hodnoty $8,14 \pm 0,54 \text{KTJ mL}^{-1}$ ve vzorcích slin a $8,80 \pm 0,77 \text{KTJ g}^{-1}$ ve vzorcích stolice. Ze všech selektivních médií bylo celkem odebráno 1080 bakteriálních izolátů, které byly dále morfologicky analyzovány a identifikovány za využití metody MALDI-TOF MS.

Z cílených skupin komenzálních bakterií byly nejčastěji detekovány bakteriálními rody v dutině ústní *Prevotella*, *Alloscardovia*, *Schaalia*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Veillonella* a *Rothia*, zatímco nejvíce zastoupenými rody ve střevě byly *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a *Phocaeicola*. Na základě identifikace, jedinečnosti a morfologické variability bylo poté vyselektováno 174 izolátů ze vzorků slin a 187 izolátů ze vzorků stolice. Tyto izoláty byly uloženy do sbírky jako kontrolní skupina pro budoucí srovnání s onkologickými pacienty vedenými ve FN Královské Vinohrady v rámci vznikajícího výzkumného projektu. Součástí sbírky je také DNA uchovaných izolátů a celková DNA všech vzorků slin a stolice pro molekulárně-genetické analýzy.

Klíčová slova: mikrobiota; kultivace; *Bifidobacterium* spp.; *Alloscardovia* spp.; *Fusobacterium* spp.

Monitoring of commensal anaerobic bacteria in the human oral cavity and intestine

Summary

In the human gastrointestinal tract, we find many microorganisms that have a fundamental function in maintaining human health. Typical representatives both in the oral cavity and in the human intestine are commensal bacteria from the *Bifidobacteriaceae* family. Under certain conditions, however, some bacterial taxa may also be associated with undesirable effects. In this context, bacteria of the genus *Fusobacterium* are discussed, which have been shown to be associated with several diseases.

The aim of the practical part of this diploma thesis was the cultivation counts determination of bacteria from the *Bifidobacteriaceae* family and other bacterial commensals present in saliva and stool samples of donors without obvious health problems (n = 30). Furthermore, the goal was the isolation, subsequent identification of the detected bacteria, their selection, DNA isolation and subsequent storage in the strain collection of the Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics of the Czech University of Life Sciences Prague.

For all monitored groups of bacteria, statistically significantly lower numbers were detected in saliva compared to stool samples. The average total numbers of bacteria from the *Bifidobacteriaceae* family on selective medium, with mupirocin and acetic acid, in saliva samples reached values of $7.29 \pm 0.55 \log \text{KTJ mL}^{-1}$ and in stool samples $8.92 \pm 0.58 \text{KTJ g}^{-1}$. On the second selective medium, enriched with norfloxacin, their average values were found to be $7.09 \pm 0.73 \text{KTJ mL}^{-1}$ in saliva samples and $8.95 \pm 0.72 \text{KTJ g}^{-1}$ in stool samples. Bacteria of the genus *Fusobacterium*, which were determined on a selective medium with nalidixic acid and vancomycin, reached an average value of $8.14 \pm 0.54 \text{KTJ mL}^{-1}$ in saliva samples and $8.80 \pm 0.77 \text{KTJ g}^{-1}$ in stool samples. A total of 1080 bacterial isolates were collected from all selective media, which were further morphologically analysed and identified using the MALDI-TOF MS method.

Of the targeted groups of commensal bacteria, the most frequently detected bacterial genera in the oral cavity were *Prevotella*, *Alloscardovia*, *Schaalia*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Rothia*, while the most represented genera in the gut were *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and *Phocaeicola*. Based on identification, uniqueness, and morphological variability, 174 isolates from saliva samples and 187 isolates from stool samples were then selected. These isolates were stored in the strain collection as a control group for future comparison with oncology patients treated at the Královské Vinohrady Medical Centre as part of an emerging research project. The resulting collection also includes the DNA of preserved isolates and the total DNA of all saliva and stool samples for molecular genetic analyses.

Keywords: microbiota; cultivation; *Bifidobacterium* spp.; *Alloscardovia* spp.; *Fusobacterium* spp.

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
2.1	Hypotéza	9
2.2	Cíle	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Mikrobiom	10
3.2	Lidský mikrobiom	11
3.3	Mikrobiom gastrointestinálního traktu	12
3.3.1	Mikrobiom dutiny ústní	12
3.3.1.1	Komenzální mikrobiota v závislosti na lokalitě	13
3.3.1.2	Vývoj orálního mikrobiomu	20
3.3.1.3	Faktory ovlivňující orální mikrobiom	22
3.3.2	Mikrobiom hltanu, jícnu a žaludku	28
3.3.3	Mikrobiom tenkého střeva	29
3.3.4	Mikrobiom tlustého střeva	29
3.3.4.1	Vývoj střevního mikrobiomu	31
3.3.4.2	Faktory ovlivňující střevní mikrobiom	34
4	Metodika	38
4.1	Dárci	38
4.1.1	Odběr vzorků slin	38
4.1.2	Odběr vzorků stolice	38
4.2	Příprava médií	38
4.3	Kultivační rozbor vzorků slin a stolice	40
4.4	Extrakce DNA	41
4.4.1	Ze vzorků slin	41
4.4.2	Ze vzorků stolice	41
4.5	Kvantifikace a izolace narostlých kolonií	42
4.6	Identifikace izolátů	42
4.6.1	MALDI-TOF MS	42
4.7	Uchování izolátů a izolace jejich DNA	43
4.8	Statistika	43
5	Výsledky	44
5.1	Kvantifikace kultivovatelných komenzálních skupin bakterií	46
5.2	Identifikace pomocí MALDI-TOF MS	47
5.3	Uchování vybraných izolátů do sbírky KMVD	50

6	Diskuze.....	51
7	Závěr	54
8	Literatura	55
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Lidské tělo je domovem velkého množství mikroorganismů, které vytvářejí komplexní společenství (Dekaboruah et al. 2020). Tato koexistence je obvykle harmonická a pro hostitele prospěšná, jedná se o tzv. komenzální organismy (Tlaskalová-Hogenová et al. 2004). Vzhledem k jedinečnosti každého člověka, která je dána jeho původem, genetikou a životním stylem, se předpokládá, že je mikrobiom mezi jednotlivci unikátní podobně jako otisk prstu (Goodrich et al. 2014; López et al. 2022). Mikroorganismy běžně nalezneme na kůži, v dýchacím, močovém, reprodukčním a gastrointestinálním traktu (Sender et al. 2016; Dekaboruah et al. 2020). Mají zásadní funkci při udržování zdraví, kdy jejich potenciální přínos spočívá v řadě mechanismů, například při prevenci kolonizace patogeny, modulaci imunitního systému, využití hostitelem nestrávených živin, detoxikaci, stimulaci buněčné diferenciaci, zlepšení bariérové funkce a stimulaci osy střevo-mozek (Marco 2021; Panthee et al. 2022). Přestože mají potenciálně prospěšné funkce, za určitých podmínek jsou nicméně schopny překonat ochranné reakce hostitele, způsobit patologické účinky a vést tak ke vzniku řady onemocnění (Tlaskalová-Hogenová et al. 2004).

Významnou skupinou komenzálních mikroorganismů v dutině ústní a střevě člověka jsou bakterie z čeledi *Bifidobacteriaceae*. Bifidobakterie patří mezi první mikroby, které kolonizují střevo člověka a jsou jedním z nejhojnějších rodů přítomných ve střevě zdravého kojence. Přestože jsou v dospělosti obvykle detekovány v nižších hladinách, jejich četnost zůstává relativně stabilní (Odamaki et al. 2016). Tyto bakterie rozkládají pro hostitele nestravitelné sacharidy a zvyšují mu tak zisk energie ze stravy. Přispívají také k udržování střevní eubiózy (Louis et al. 2007; Chassard & Lacroix 2013). Naopak jejich pokles je často spojován s různými negativními zdravotními důsledky (Odamaki et al. 2016; Rivière et al. 2016). I z tohoto důvodu jsou některé z nich používány jako probiotika (O'Callaghan & Van Sinderen 2016). Přestože je řada komenzálních bakterií hostiteli přínosem, za určitých podmínek mohou být naopak spojovány i s nežádoucími efekty na jeho zdraví. V současné době jsou často diskutovány bakterie rodu *Fusobacterium*, které se mohou podílet na tvorbě zubního plaku a předcházet tak vzniku periodontálních onemocnění (Lamont et al. 2018; Alon-Maimon et al. 2022). Mimo to jsou také spojovány s rozvojem mnoha systémových onemocnění, zejména s různými extraorálními nádory (Al-Hebshi et al. 2017; Yamamura et al. 2019).

Komenzální charakter mikroorganismů je tedy značně ovlivňován samotným hostitelem (Chen et al. 2021), ale také prostředím a celou řadou faktorů, které přispívají k posunům ve změnách složení orální a střevní mikrobioty a budou dále diskutovány v rámci literární rešerše. Samotná analýza mikrobioty v souvislosti s těmito mikroorganismy je velmi důležitá pro pochopení interakcí mezi komenzálními mikroorganismy a hostitelským organismem. Tyto interakce mohou být například využity k navrhování různých terapeutických strategií, které cílí na zlepšení zdraví, a také podporu celkové obranyschopnosti hostitele (Khan et al. 2019; Brown et al. 2021).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Hypotéza

Předpokládáme, že v dutině ústní i ve střevě člověka bez zdravotních obtíží budou přítomny komenzální bakterie z čeledi *Bifidobacteriaceae*, jejichž zastoupení bude vyšší ve střevě. Zároveň předpokládáme, že pro každé prostředí budou specifické jiné rody a druhy těchto bakterií.

2.2 Cíle

Cílem této práce bylo vytvořit přehlednou literární rešerši na základě aktuálních vědeckých poznatků o komenzální mikrobiotě trávicího traktu člověka, zejména se zaměřením na dutinu ústní a střevo. Dále bylo cílem kultivační stanovení počtu bakterií z čeledi *Bifidobacteriaceae* a dalších bakteriálních komenzálů přítomných ve vzorku slin a stolice lidí bez zjevných zdravotních obtíží. Izolace a následná identifikace detekovaných bakterií, jejich selekce, izolace DNA a následné uložení do sbírky bakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky.

3 Literární rešerše

3.1 Mikrobiom

V roce 1988 byl poprvé definován termín mikrobiom jako kombinace slov mikro a biom a byl popsán jako charakteristická mikrobiální komunita obývající přiměřeně dobře definované prostředí, které má odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a netýká se pouze příslušných mikroorganismů, ale zahrnuje také jejich dějiště aktivity (Whipps et al. 1988). V následujících letech bylo publikováno mnoho dalších definic tohoto termínu, přičemž nejcitovanější do roku 2020 popisuje mikrobiom v ekologickém kontextu, jako společenství komenzálních, symbiotických a patogenních mikroorganismů v těle hostitele či v jiném prostředí (Lederberg & McCray 2001). Aktuální definice je založena na původním vysvětlení z roku 1988, rozšířeném o vysvětlení odlišnosti pojmů mikrobiom a mikrobiota (Obrázek 1). Mikrobiom lze definovat jako charakteristickou mikrobiální komunitu, která obývá přesně definované stanoviště s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Není vztažena pouze na zúčastněné mikroorganismy, ale zahrnuje také jejich dějiště aktivity neboli mikrobiální struktury, metabolity, mobilní genetické prvky fágy a viry, čímž dochází k vytvoření specifických nik. Mikrobiom tak vytváří dynamický a interaktivní mikroekosystém, náchylný ke změnám v čase a měřítku, integrovaný do makroekosystémů a má zásadní vliv na jejich funkci a zdraví. Termín mikrobiota potom zahrnuje všechny živé organismy patřící do různých říší (Prokaryota – Bacteria, Archaea, Eukaryota – např. prvoci, houby, řasy) v rámci daného stanoviště (Berg et al. 2020).



Obrázek 1: Schéma zdůrazňující složení termínu mikrobiom obsahující jak mikrobiotu (společenstvo mikroorganismů), tak jejich „divadlo aktivity“ (strukturální prvky, metabolity/signální molekuly a okolní podmínky prostředí). Upraveno dle Berg et al. (2020).

Mikroorganismy jsou všudypřítomné a vzájemně se ovlivňují. Symbiotické interakce probíhají nejen mezi mikroorganismy téhož druhu, ale také mezi odlišnými druhy, rody a doménami života a mají různé důsledky pro mikrobiální zdatnost, pro populační dynamiku a funkční kapacity v rámci mikrobiomu (Banerjee et al. 2018; Berg et al. 2020). Tyto interakce mohou být pozitivní, potom se jedná o mutualismus (+/+), synergismus nebo komensalismus (+/0).

Pokud nebyl pozorován účinek na funkční kapacity nebo zdatnosti interagujících mikroorganismů jedná se o interakce neutrální. Jestliže jsou interakce negativní, mluvíme konkrétně o amensalismu (0/-), včetně predace (+/-), parazitismu (+/-), antagonismu nebo kompetici (-/-) (Berg et al. 2020).

Důležité je také zmínit interakce na úrovni hostitel-mikrob. Předpokládá se, že hostitelé a jejich mikroby se vzájemně koevolučně vyvíjeli, ale existují dvě různé teorie koevolučního vývoje. Podle prvního, tzv. separačního přístupu lze mikroorganismy v závislosti na jejich interakci s hostitelem rozdělit na prospěšné, patogenní a neutrální. V případě, že je koevoluce hostitele a jeho mikrobioty založena na negativních interakcích, jedná se o koevoluci antagonistickou, pokud je založena na pozitivních interakcích, mluvíme o koevoluci mutualistické (Lederberg & McCray 2001; Berg et al. 2020). Pozitivní interakce se mohou vyvinout směrem k obligátním symbiózám, vertikální dědičnosti a k metabolické spolupráci (O'Brien et al. 2019). Druhý, tzv. holistický přístup nahlíží na hostitele a jeho mikrobiotu jako na jednu společně se vyvíjející jednotku, tzv. holobiont. Podle tohoto přístupu je prospěšná souhra doprovázena eubiózou, vysokou diverzitou a uniformitou příslušné mikrobioty, které jsou zodpovědné za udržení zdraví holobionta. Naopak chorobný stav holobionta často koreluje s mikrobiální dysbiózou, nízkou diverzitou a variabilitou příslušné mikrobioty (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008; Hooks & O'Malley 2017; Berg et al. 2020).

3.2 Lidský mikrobiom

Lidské tělo je kolonizováno biliony mikroorganismů, včetně eukaryot, archaea, různých druhů bakterií a virů (bakteriofágů i lidských virů). Společně tyto organismy a jejich genetická výbava vytvářejí neustále se měnící mikrobiální komunitu, sídlící v různých oblastech těla, známou pod pojmem lidský mikrobiom (Ursell et al. 2012; Sender et al. 2016). Je tvořen nejméně 20 miliony jedinečných mikrobiálních genů a představuje ohromnou genetickou složku ve srovnání s 20 000–25 000 lidskými geny v genomu člověka (Proctor 2016). Tyto mikroorganismy nalezneme na pěti hlavních oblastech těla - na kůži, v dutině ústní a celém gastrointestinálním traktu, dále v respiračním a urogenitálním traktu a představují zhruba 1–3 % celkové hmotnosti jedince (Ruan et al. 2020).

Mikrobiální diverzita v každé z těchto lokalit je jedinečná, odlišuje se svým složením a funkcí a koreluje se zdravotním stavem jedince, jeho genotypem, stravou či životním stylem (Redinbo 2014). Člověk získává významné množství mikrobioty během porodu od své matky. Toto mikrobiální společenstvo je velmi dynamické a dochází k jeho postupnému vývoji ve vysoce rozmanitý ekosystém. Během prvních tří let život se neustále mění, a poté se stává relativně stabilní, stále však dochází k četným malým změnám během dětství, dospívání, středního věku a stáří (Palmer et al. 2007; Redinbo 2014; Rogier et al. 2014; Bhatt et al. 2017).

Součástí lidské mikrobioty jsou pro člověka prospěšné mikroorganismy. Rozmanitost těchto mikroorganismů v lidském těle má důležitou roli pro udržení zdravého stavu. Jejich potenciální přínos spočívá v řadě již zmíněných mechanismů (Marco 2021; Panthee et al. 2022).

Přestože značné množství mikrobů vykonává nejrůznější funkce důležité pro hostitele, může se stát, že dojde k narušení rovnováhy složení a funkce mikrobiomu, k tzv. mikrobiální dysbióze vedoucí k řadě onemocnění (Cho & Blaser 2012; Wang et al. 2017). Mezi tato

onemocnění patří například infekční onemocnění, diabetes mellitus, nemoci dýchacích cest, duševní či psychická onemocnění, onemocnění jater, gastrointestinální karcinomy, autoimunitní onemocnění či řada dalších (Liu et al. 2004; Wang et al. 2017; Sharma & Tripathi 2019).

3.3 Mikrobiom gastrointestinálního traktu

3.3.1 Mikrobiom dutiny ústní

V dutině ústní nalezneme druhou největší a nejrozmanitější mikrobiotu v lidském těle. Teplé a vlhké prostředí v ústech vyhovuje růstu mnoha mikroorganismů, kterým jsou poskytnuty živiny ve formě proteinů či glykoproteinů slin (Van'T Hof et al. 2014). V ústní dutině je obsaženo přes 770 bakteriálních druhů spolu s houbami, viry a prvoky (Kilian et al. 2016; Kitamoto et al. 2020). Jedná se o komplexní prostředí, které zahrnuje odlišná mikrobiální stanoviště propojená tokem slin jako jsou zuby, jazyk, bukální rýha, tj. oblast, kde dáseň přechází do tváře, bukální sliznice, gingiva, tvrdé patro, patrové mandle, supragingivální a subgingivální plaky z povrchu zubů (Costalonga & Herzberg 2014; Kilian 2018).

Celkové množství bakterií lokalizovaných v dutině ústní je až 10^{11} kolonie tvořící jednotku na gram (KTJ g^{-1}) (Sender et al. 2016). Bylo pozorováno 20 bakteriálních kmenů a naprostá většina sekvencí (více než 95 %) patřila do jednoho ze sedmi kmenů: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes a Saccharibacteria. Relativní četnost každého kmene je potom variabilní v různých ústních oblastech (Xu et al. 2015).

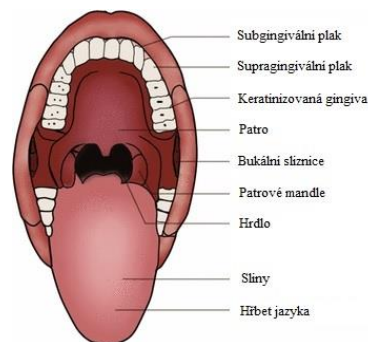
Klíčovými determinanty, které mají vliv na složení mikrobiálního společenstva v různých oblastech dutiny ústní patří teplota, vlhkost, tok slin, pH, gradienty kyslíku a živin, blízkost slinných žláz, a také ústní hygiena. Důležitá je rovněž odlišná topografie a stabilita stanovišť (Proctor & Relman 2017; Welch et al. 2020).

Mezi místa s vyšším množstvím kyslíku, která mohou být osídlena aerobními či fakultativně aerobními druhy bakterií, například streptokoky, patří vnější strany zubů. Anoxické prostředí jako například povrch zubu v gingivální štěrbině je prostředí vhodné pro obligátně anaerobní bakterie, konkrétně např. bakterie rodu *Fusobacterium* (Simón-Soro et al. 2013; Jakubovics 2015b).

V dutině ústní nalezneme současně měkké slizniční povrchy, tzv. exfoliační a pevné povrchy, které se neodlupují, tedy povrchy zubů nebo zubních protéz, které jsou kolonizovány ústními mikroorganismy souhrnně označovanými jako biofilmy (Zaura et al. 2009; Xu et al. 2015). Biofilmy zubního plaku a sliznice mají odlišné mikrobiální složení a mají přesně definovanou prostorovou strukturu a komunitní funkce. Možným vysvětlením odlišnosti může být to, že povrchy zubů a slizniční epitel poskytují různé receptory pro bakteriální adhezi, dále hrají roli antagonistické a synergické interakce druhů v rámci biofilmu, a také to, že neustále se odlupující sliznice v ústní dutině umožňuje méně času pro vytvoření komplexního biofilmu na površích měkkých tkání. Každý kompartment biofilmu zubního plaku provádí repertoár biochemických procesů, které udržují jednotlivé buňky. Ty interagují mezi sebou navzájem, ale také interagují se svým prostředím. Společně vedou tyto chemické, fyzikální a mezibuněčné interakce mezi orálními mikroby ke vzniku nových vlastností plakových biofilmů a holistickým

funkcím těchto mikrobiálních komunit (Mager et al. 2003; Diaz & Valm 2020). Za homeostatických podmínek fungují biofilmy zubního plaku tak, aby podporovaly zdraví dutiny ústní. Pokud však v dutině ústní dojde k dysbióze, tak tyto biofilmy zprostředkovávají lokalizovaná onemocnění dutiny ústní, včetně zubního kazu a periodontálního onemocnění, a dále se také mohou podílet na systémových onemocněních, konkrétně například onemocnění kardiovaskulární (El Kholy et al. 2015; Lamont et al. 2018).

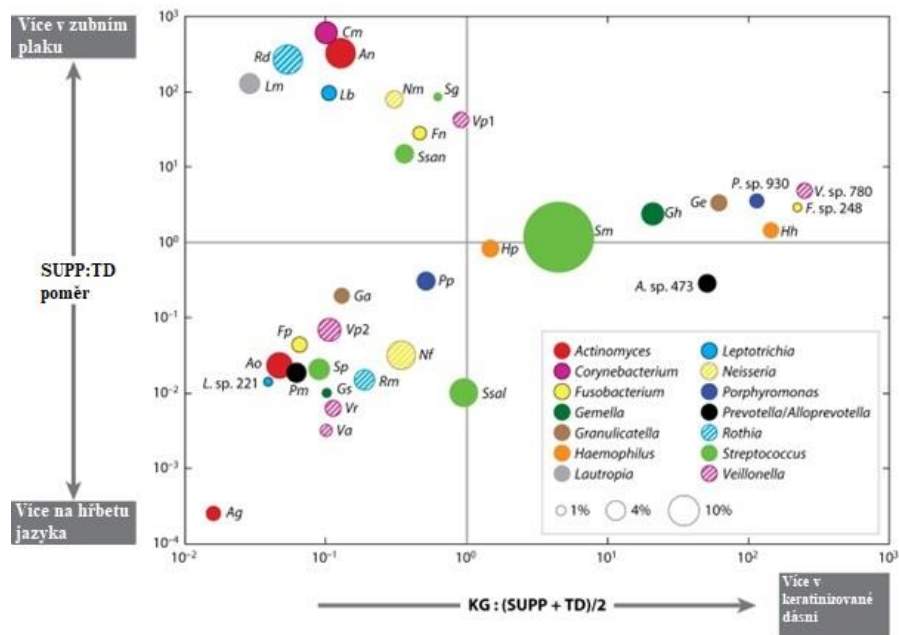
V rámci “Human Microbiome Project” (HMP) (Res et al. 2009) je právě orální mikrobiom jednou z výzkumných priorit. Z dutiny ústní a orofaryngu byly odebírány vzorky z devíti vybraných lokalit znázorněných na Obrázku 2. Konkrétně ze supragingiválního a subgingiválního plaku, keratinizované dásně, tvrdého patra, bukalní sliznice, patrových mandlí, hrdla, slin a hřbetu jazyka (Huttenhower et al. 2012; Gao et al. 2018b). Na základě výsledků analýz odebíraných vzorků z uvedených lokalit, lze charakterizovat bakteriální složení orálního mikrobiomu v závislosti na lokalitě, která je popsána v následující části.



Obrázek 2: Lokalita devíti odebraných vzorků v rámci Human Microbiome Project. Upraveno dle Gao et al. (2018b).

3.3.1.1 Komenzální mikrobiota v závislosti na lokalitě

Podrobnou charakterizaci komunit orálního mikrobiomu na odebraných vzorcích v rámci HMP umožňuje metoda oligotypizace, tedy vysoké taxonomické rozlišení podle shodných úseků primární struktury DNA. Výsledky ukazují, že mnoho mikrobiálních rodů má podtypy specializované na tři odlišné biotopové zóny reprezentované zubním plakem, keratinizovanou dásní a hřbetem jazyka. Grafické znázornění této biotopové specifičnosti je znázorněno na Obrázku 3. Vzhledem k tomu, že se bakterie ze všech oblastí dutiny ústní dostávají do slin, a ty jsou distribuovány po celé dutině ústní, tak je většina orálních mikroorganismů detekovatelných na kterémkoliv místě úst. Detekce těchto bakterií je však v až o několik řádů vyšší relativní četnosti v místě či místech, o nichž se předpokládá, že jsou jejich pravým místem výskytu (Eren et al. 2014; Welch et al. 2019).



Obrázek 3: Lokální specificita v orálním mikrobiomu. Barevné tečky představují druhy a poloha každé tečky představuje relativní množství tohoto druhu v mikrobiotě na třech odlišných orálních místech: supragingivální plak, hřbet jazyka a keratinizovaná dásně. Osa y ukazuje poměr normalizované abundance taxonu v supragingiválním plaku k jeho normalizované abundanci ve hřbetu jazyka; osa x ukazuje poměr normalizované abundance v keratinizované dásni ke střední normalizované abundanci supragingiválního plaku a hřbetu jazyka. Plocha každé tečky je úměrná průměrnému výskytu taxonu v místě jeho největšího normalizovaného výskytu. Barva označuje rod; druhy: **A. sp. 473** – *Alloprevotella* sp. HMT 473, **Ag**-*Actinomyces graevenitzii*; **An**-skupina *Actinomyces naeslundii*; **Ao**-skupina *Actinomyces odontolyticus*; **Cm**-*Corynebacterium matruchotii*; **F. sp. 248**, *Fusobacterium* sp. HMT 248; **Fn**-*Fusobacterium nucleatum*; **Fp**-*Fusobacterium periodonticum*, **Ga**-*Granulicatella adiacens*; **Ge**-*Granulicatella elegans*; **Gh**-*Gemella haemolysans*; **Gs**-*Gemella sanguinis*; **Hh**-skupina *Haemophilus haemolyticus*; **Hp**-*Haemophilus parainfluenzae*; **L. sp. 221**, *Leptotrichia* sp. HMT 221; **Lb**-skupina *Leptotrichia buccalis*; **Lm**-*Lautropia mirabilis*; **Nf**-skupina *Neisseria flavescens*; **Nm**-skupina *Neisseria mucosa*; **P. sp. 930**-*Porphyromonas* sp. HMT 930; **Pm**-*Prevotella melaninogenica*; **Pp**-*Porphyromonas pasteri*; **Rd**-*Rothia dentocariosa*; **Rm**-*Rothia mucilaginosa*; **Sg**-*Streptococcus gordonii*; **Sm**-*Streptococcus mitis*; **Sp**-skupina *Streptococcus parasanguinis*; **Ssal**-*Streptococcus salivarius*; **Ssan**-*Streptococcus sanguinis*; **V. sp. 780**-*Veillonella* sp. HMT 780; **Va**- *Veillonella atypica*; **Vp 1**-*Veillonella parvula/dispar* skupina 1; **Vp 2**, *Veillonella parvula/dispar* skupina 2; **Vr** -*Veillonella rogosae*. Data jsou z Human Microbiome Project, Zkratky: KG, keratinizovaná dásně; HMT, lidský mikrobiální taxon; SUPP, supragingivální plak; TD, hřbet jazyka. Upraveno dle Welch et al. (2019).

a) Zubní plak

Nejvýraznějším místem, které má větší počet charakteristických oligotypů, než kterékoliv jiné místo orálního mikrobiomu je zubní plak. Rozlišujeme plak nad linií dásně, tedy supragingivální a plak pod linií dásně, subgingivální, jak je znázorněno na Obrázku 4 (Eren et al. 2014; Welch et al. 2020).



Obrázek 4: Supragingivální plak, subgingivální plak, keratinizovaná dásně. Upraveno dle Welch et al. (2020).

Oba druhy plaků se u zdravých jedinců navzájem podobají. Faktorem, který je od sebe odlišuje, je již zmíněná dostupnost kyslíku. Výrazně větší zastoupení oligotypů reprezentujících striktní anaeroby nalezneme v subgingiválním prostředí ve srovnání se supragingiválním (Eren et al. 2014).

Bakteriální diverzita u zubního plaku je ovlivněna zdravotním stavem dutiny ústní. Konkrétně u supragingiválního plaku se snižuje s přítomností a stupněm závažnosti zubních kazů (Xiao et al. 2016). Naopak u subgingiválního plaku byla zjištěna menší diverzita v subgingiválním mikrobiomu u subjektů se zdravím parodontu ve srovnání s pacienty s jinými stavy parodontu. Diverzita byla rozmanitější u zánětu dásní a mírné parodontitidy. U závažnějších stupňů parodontitidy se diverzita opět snižuje (Inieta et al. 2023).

V supragingiválním plaku nalezneme bakterie zejména z kmenů Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria a Saccharibacteria. Nejčastějšími rody jsou *Capnocytophaga*, *Prevotella*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Rothia* a *Leptotrichia* (Xiao et al. 2016).

V subgingiválním plaku u zdravé dutiny ústní nalezneme zejména bakterie spadající do převládajícího kmene Firmicutes, a dále kmene Bacteroidetes, Fusobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes a Synergistetes. Nejhojnějšími rody jsou *Streptococcus*, *Fusobacterium* a *Veillonella* (Inieta et al. 2023).

b) Keratinizovaná dásně a bukální sliznice

Lokalita keratinizované dásně není tak výrazná jako zubní plak, ale přesto se odlišuje přítomností specifických oligotypů, z nichž některé jsou v menším množství sdíleny s bukální sliznicí.

V keratinizované dásni můžeme typicky nalézt bakterie rodu *Streptococcus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Terrahaemophilus* a *Fusobacterium*.

Bukální sliznice, tedy výstelka vnitřní stěny tváří obsahuje zejména bakteriální rody *Streptococcus*, *Gemella*, *Rothia*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Gemella* a *Fusobacterium* (Eren et al. 2014).

c) Hřbet jazyka, tvrdé patro, patrové mandle a hrdlo

Poslední skupinu tvoří mikrobiota charakteristická pro seskupení stanovišť hřbetu jazyka, tvrdého patra, patrových mandlí a hrdla. Vzorky z těchto stanovišť se obecně navzájem podobají, a to jak u jednotlivců, tak i celkově (Eren et al. 2014).

Patrové mandle jsou párovým lymfatickým orgánem, který má významnou roli v ochraně sliznice proti alimentárním a vzdušným patogenům (Jović et al. 2015). Je zajímavé, že na patrových mandlích byla zjištěna relativně vysoká abundance mikrobiálních společenství charakteristických pro subgingivální plak. To naznačuje, že mandle jsou taktéž stanovištěm pro anaeroby v ústní mikrobiotě. Tato kolonizace pravděpodobně není inherentně patogenní, a naopak představuje fyziologický mechanismus pro povzbuzení kontaktu potenciálně patogenních mikroorganismů s lymfoidní tkání (Eren et al. 2014).

Patro odděluje ústní a nosní dutinu. Je složeno ze dvou částí. V přední části je tvrdé kostěné patro, které je klíčové pro příjem potravy a řeč. Zadní část tvoří měkké svalové patro, které je pohyblivé a při polykání uzavírá nosní dýchací cesty (Bush & Jiang 2012).

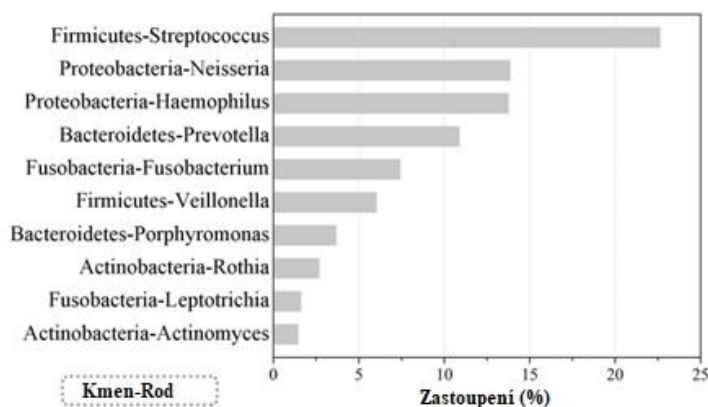
Jazyk je svalový orgán krytý sliznicí s mnohvrstevnatým dlaždicovým epitelem. Je velmi důležitý při orálním zpracování potravin, polykání a smyslovém vnímání (Wang et al. 2019).

Bakteriální rody charakteristické pro tato stanoviště jsou *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Rothia*, *Leptotrichia*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Campylobacter* a *Selenomonas* (Eren et al. 2014).

d) Sliny

Jak již bylo zmíněno, v dutině ústní nalezneme více mikroprostředí, které spolu komunikují prostřednictvím slin (Wang et al. 2022). Jsou velice důležité pro zdraví dutiny ústní a její odolnost vůči infekcím. Sliny jsou produkovány třemi páry velkých slinných žláz a množstvím vedlejších malých slinných žláz. Jedná se o komplexní biologickou tekutinu složenou přibližně z 99 % vody, dále z anorganických a organických iontů, peptidů, proteinů a glykoproteinů. Hlavními kationty jsou kationty sodíku a draslíku. Kationty vápníku a hořčíku jsou přítomny v nižších koncentracích. Nejhojnějšími anorganickými anionty jsou chloridy a fosfáty. Ve slinách byly detekovány také organické anionty včetně laktátu, acetátu, propionátu a formiátu, pravděpodobně jako důsledek metabolismu bakterií zubního plaku. Ve slinách nalezneme antibakteriální sloučeniny (například imunoglobulin A) a enzymy. Mezi tyto enzymy řadíme například α -amylázu, která štěpí polysacharidy na jednodušší sacharidy a napomáhá tak s trávením potravy, nebo lysozym, který způsobuje degradaci buněčné stěny některých bakterií a tím jejich eliminaci (Humphrey & Williamson 2001; Van't Hof et al. 2014; Chen et al. 2015; Jakobovics 2015b; Marsh et al. 2016). Množství bakterií obsažených ve slinách je až 10^9 KTI mL⁻¹ (Sender et al. 2016).

Mezi nejčastěji zastoupené kmény v rámci slinné mikrobioty řadíme Firmicutes (36,38 %), Proteobacteria (31 %), Bacteroidetes (17,97 %), Fusobacteria (9,11 %) a Actinobacteria (4,88 %). Ve slinách nalezneme 10 převládajících rodů s abundancemi přes 1 %. Konkrétně nejvíce zastoupený rod *Streptococcus* (22,62 %), dále *Neisseria* (13,86 %) a *Haemophilus* (13,76 %), z ostatních potom v sestupném pořadí dle početnosti *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Leptotrichia* a *Actinomyces* znázorněno na Obrázku 5 (Wang et al. 2022).



Obrázek 5: Deset mikrobiálních rodů s abundancemi přes 1 %. Upraveno dle Wang et al. (2022).

Vzorky pro tuto analýzu byly získány ze 3 oblastí, konkrétně z Itálie, Portorika a Spojených států. V rámci diverzity orálního mikrobiomu bylo možné kromě individuálních rozdílů pozorovat také významné regionální rozdíly, které mohou souviset s rozdíly v životním prostředí, stravovacích zvyklostech a dalších faktorech populací v různých regionech (Wang et al. 2022).

Dále v textu jsou uvedeny příklady nejtypičtějších zástupců mikrobioty dutiny ústní.

a) Čeleď *Bifidobacteriaceae*

Čeleď *Bifidobacteriaceae* je součástí kmene Actinobacteria (Zhi et al. 2009). V současnosti jsou do ní řazeny rody *Bifidobacterium*, *Gardnerella* a osm tzv. „scardoviálních“ rodů, tedy *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bombiscardovia*, *Neoscardovia*, *Parascardovia*, *Pseudoscardovia* a *Scardovia* (Pechar et al. 2017; Mekadim et al. 2019). Jedná se o bakterie grampozitivní, anaerobní nebo fakultativně anaerobní, které nejsou opouzdřené, nevytvářejí spory a jsou nepohyblivé. Výjimkou je rod *Gardnerella*, který je gram variabilní. Z hlediska tvaru se jedná o pleomorfní tyčinky, které se vyskytují jednotlivě nebo v mnohobuněčných řetězcích či shlucích (Killer et al. 2010).

• Rod *Bifidobacterium*

Bifidobacterium je rod grampozitivních bakterií, které jsou nepohyblivé, nevytvářejí spory a jsou různého tvaru. Izolované kmeny mohou být uniformní, rozdvojené (tvar písmene Y a V), lopatkovité, kyjovité či vícenásobně větvené. Ve svém přirozeném prostředí jsou obvykle tyčinkovité a za podmínek, které jsou pro bifidobakterie nepříznivé, více vykazují větvení a pleomorfismus (Leahy et al. 2005).

Mezi komenzální orální bifidobakteriální druhy patří *B. animalis*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. scardovii* a *B. subtile* (Mantzourani et al. 2010; Henne et al. 2015). Jedná se však také o acidogenní a acidurické bakterie, u kterých byla zjištěna souvislost se zubním kazem u dětí i dospělých (Mantzourani et al. 2009b; Neves et al. 2018). Množství *Bifidobacterium* spp. je významně vyšší u skupin se zubním kazem, a rovněž bylo zjištěno, že také závažnost zubního kazu pozitivně korelovala s hladinami *Bifidobacterium* spp. (Chen et al. 2023).

Nejvíce diskutovanou bifidobakterií v souvislosti s dutinou ústní a kariogenním potenciálem je *B. dentium* (Henne et al. 2015). Jeho počty na povrchu zubu bez kazu jsou velmi nízké, ale naopak byl nalezen ve vysokých počtech v hlubokých lézích. Na rozdíl od streptokoků nekolonizuje tvrdé povrchy jako takové, ale jeho připojení a proliferace je umožněna až po iniciaci léze jinými druhy včetně *S. mutans*. Přítomnost tohoto druhu může být tedy spíše výsledkem než příčinou počátečních lézí (Kaur et al. 2013). To je v souladu s pozorováním Henne et al. (2015), kteří analyzovali bakteriální komunitu zdravých mladých dospělých (kontrolní skupina) a dospělých pacientů s kavitovanými (pokročilá kategorie kazu) a nekavitovanými (počáteční kategorie kazu) kazovými lézemi. Polovina pacientů s kavitovanými kazovými lézemi měla významný počet *B. dentium*, naproti tomu v počátečních případech bylo pozitivních pouze 25 % a v kontrolní skupině nebyl žádný výskyt. *B. dentium* tedy lze považovat za velmi specifický pozdní marker progresu zubního kazu (Henne et al. 2015).

- **Rod *Alloscardovia***

V dutině ústní nalezneme druh *A. omnicoles*, který byl dále izolován také z moči a močové trubice, z krve, mandlí a plicního a aortálního abscesu (Huys et al. 2007). Jedná se o anaerobní, grampozitivní tyčinky, které nevytvářejí spory. O *A. omnicoles* je známo jen velmi málo, předpokládá se, že jde o komenzální druh dutiny ústní a gastrointestinálního traktu. Jeho klinický význam jako patogenního organismu je spojován se členy mikrobioty močových cest a s infekcemi močových cest (Mahlen & Clarridge 2009; Lainhart & Gonzalez 2018).

b) Čeleď *Actinomycetaceae*

- **Rod *Schaalia***

Schaalia je rod grampozitivních, aerobních bakterií, které typicky tvoří rovné až mírně zakřivené tyčinky, které se mohou větvit. Některé druhy mohou mít však kokoidní nebo kokobacilární buňky. Typovým druhem v rámci tohoto rodu je *Schaalia odontolytica* dříve známá jako *Actinomyces odontolytica*, která běžně obývá dutinu ústní (Nouioui et al. 2018). Mimo své role komenzálního člena orální mikrobioty může tento druh působit také jako patogen způsobující onemocnění aktinomykózu (Huang et al. 2023b). Jedná se o vzácnou endogenní infekci, která je charakterizována tvorbou bolestivých abscesů a destrukcí tkáně (Urbán & Gajdács 2021).

c) Čeleď *Micrococcaceae*

- **Rod *Rothia***

Rothia je rod grampozitivních, nepohyblivých, nepigmentovaných bakterií, které nevytvářejí spory a jsou nestálé vůči kyselinám. Jsou schopné růstu při aerobních nebo mikroaerofilních podmínkách (Georg & Brown 1967; Von Graevenitz 2004). Funkční role rodu *Rothia* v lidské mikrobiotě není známá, ale je možné, že jeho ekologickou rolí může být poskytování metabolitů jako růstových substrátů pro více specializované členy mikrobiální komunity jako například pro patogenní gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, které jsou spojené s cystickou fibrózou (Gao et al. 2018a; Uraga et al. 2020).

V dutině ústní nalezneme jako součást běžné mikrobioty tři druhy, převládající druh *R. mucilaginosa*, poté *R. dentocariosa* a *R. aeria* (Tsuzukibashi et al. 2017). Jako lidský patogen byla poprvé identifikována *R. mucilaginosa* v roce 1978 jako příčina endokarditidy po katetrizaci (Rubin et al. 1978). Bakterie tohoto rodu se podílí také na řadě dalších závažných infekcích zejména u imunokompromitovaných pacientů. Jsou spojeny i s infekcemi dolních cest dýchacích, meningitidou, peritonitidou, endoftalmitidou či osteomyelitidou (Korsholm et al. 2007; Cielo & Ullian 2013; Lee et al. 2013).

d) Čeleď *Fusobacteriaceae*

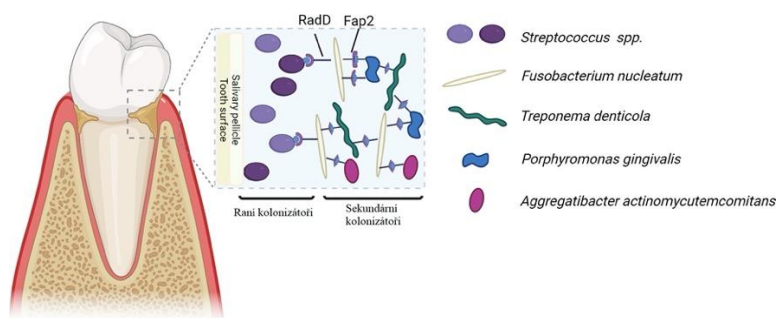
- **Rod *Fusobacterium***

Fusobacterium je rod anaerobních, gramnegativních tyčinek, které nevytvářejí spory a jsou nepohyblivé (Citron 2002). Nalezneme je jako součást běžné mikrobioty v dutině ústní,

v horních cestách dýchacích, v gastrointestinálním a urogenitálním traktu (Hischebeth et al. 2014).

Mezi členy rodu *Fusobacterium* je nejvíce sledovaným druhem *F. nucleatum* (Bi et al. 2022), který je součástí orální a střevní komenzální mikrobioty (Citron 2002). Je naznačeno, že *F. nucleatum* přispívá k udržení zdravé sliznice v dutině ústní zvýšením transkripce inhibitorů proteáz. Tyto proteázy jsou produkovány neutrofily jako odezva na přítomnost bakterií a mají silné prozánětlivé účinky s možnou destrukcí tkání. Další orální druhy jako *Porphyromonas gingivalis* nebo *Treponema denticola* produkují vlastní serinové či cysteinové proteázy považované za faktory virulence. Negativní účinek těchto proteáz a proteáz produkováných neutrofily se však snižuje právě inhibitory produkovánými *F. nucleatum* (Curtis et al. 2001; Fenno et al. 2001; Van der Reijden et al. 2006). Mimoto může produkovat významné množství butyrátu, který je preferovaným zdrojem energie pro kolonocyty ve střevě a má protizánětlivé účinky (Segain et al. 2000; Pryde et al. 2002). Také podporuje sekreci lidského β -defensinu-2 (h β D-2) a okrajově také h β D-3 (Dale & Krisanaprakornkit 2001). Defensiny omezují počet patogenních bakterií a chrání tak hostitelský organismus před infekcemi, *F. nucleatum* má tedy svou roli také v aktivaci imunitního systému (Joly et al. 2004; Stokowa-Sołtys et al. 2021).

Na druhou stranu však *F. nucleatum* napomáhá narušit hostitelsko-mikrobiální homeostázu a předchází tak vzniku periodontálních onemocnění (Hajishengallis & Lamont 2016; Lamont et al. 2018). *F. nucleatum* se podílí na tvorbě subgingiválního zubního plaku. Je důležitý ve fyzikální interakci mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi, funguje vlastně jako přemostující organismus, který spojuje prostřednictvím adhesinu RadD rané orální kolonizátory (např. rod *Streptococcus*) a převážně anaerobní sekundární kolonizátory prostřednictvím adhesinu Fap2. Mezi tyto sekundární kolonizátory jsou řazeny bakteriální druhy spojené s periodontálním onemocněním jako například *P. gingivalis* či *T. denticola* (Obrázek 6) (Kolenbrander 2000; Kaplan et al. 2009; Alon-Maimon et al. 2022).



Obrázek 6: *F. nucleatum* působí jako přemostující mikroorganismus v zubním plaku. Upraveno dle Alon-Maimon et al. (2022).

V důsledku periodontální infekce se může *F. nucleatum* dostat do krevního oběhu a migrovat ze svého primárního místa kolonizace v dutině ústní do jiných částí těla (Hwang et al. 2014), čímž může působit na rozvoj mnoha systémových onemocnění, konkrétně například na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění (Salhi et al. 2019), revmatoidní artritidy (Chen et al. 2018), Alzheimerovy choroby (Wu et al. 2022), plicních onemocnění (Zhou et al. 2020), nebo také na rozvoj různých těhotenských komplikací (Vander Haar et al. 2018). Dokonce bylo prokázáno, že úzce souvisí s různými extraorálními nádory, například s kolorektálním karcinomem (Kostic et al. 2012), karcinomem prsu (Parhi et al. 2020), orálním spinocelulárním

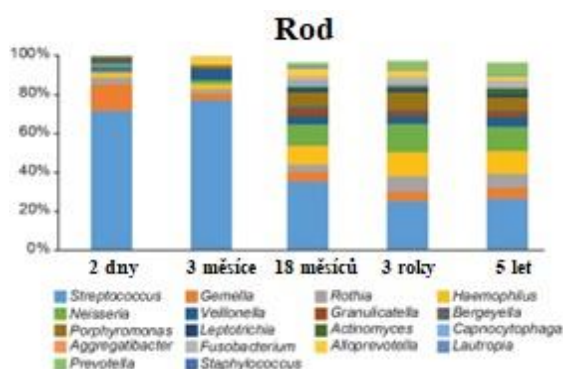
karcinomem (Al-Hebshi et al. 2017), spinocelulárním karcinomem jícnu (Yamamura et al. 2019) či karcinomem žaludku (Hsieh et al. 2018).

3.3.1.2 Vývoj orálního mikrobiomu

Po více než sto letech aktivního výzkumu bylo přijato paradigma sterilní dělohy. Jedná se o trvalý předpoklad, že lidští novorozenci se rodí sterilní, a že plod se za normálních podmínek vyvíjí ve sterilním prostředí (Funkhouser & Bordenstein 2013; Perez-Muñoz et al. 2017). Nedávné studie využívající pokročilé molekulární přístupy však detekovaly bakteriální DNA ve tkáni placenty a v plodové vodě u žen se zdravým průběhem těhotenství, a tento tradiční pohled tak zpochybňují (Aagaard et al. 2014; Collado et al. 2016). Studie, charakterizující placentární mikrobiální komunity ukazují, že placenta ukrývá unikátní mikrobiom, který vykazuje vyšší podobnost s bakteriemi nacházejícími se v mateřském orálním mikrobiomu ve srovnání s jinými místy lidského těla, jako s kožním, nosním, vaginálním a střevním mikrobiomem (Aagaard et al. 2014; Gomez-Arango et al. 2017).

Při vývoji orálního mikrobiomu hraje důležitou roli vertikální přenos, tedy přenos z matky na dítě během porodu nebo později při kojení (Dominguez-Bello et al. 2010). Na složení orálního mikrobiomu má vliv řada faktorů. Konkrétně způsob porodu (vaginální nebo císařský řez), který do značné míry určí, se kterými mikroorganismy – z pochvy nebo kůže, se novorozenec setká s jako prvními a má spíše krátkodobý účinek (Dashper et al. 2019). Je také ovlivněn způsobem výživy (kojení nebo kojenecká výživa) (Holgerson et al. 2013). Dále délkou kojení a léčbou antibiotiky, které se zdají mít dlouhodobý dopad (Dashper et al. 2019). Kromě vertikálního přenosu přispívá k diverzitě také přenos horizontální, například mezi sourozenci, či dalšími lidmi, kteří sdílejí s dítětem stejné prostředí (Stahringer et al. 2012).

Ústní dutina novorozence je velmi rychle kolonizována malým počtem bakteriálních taxonů a poté následuje rychlý nárůst diverzity (Dashper et al. 2019). Podíly taxonů podle věku jsou znázorněny na Obrázku 7.



Obrázek 7: Charakterizace mikrobiomu slin u dětí s opakovanými odběry (pomocí vatových tampónů) od narození do předškolního věku. Výsledky jsou založeny na 71 dětech se vzorky slin odebranými ve věku 2 dnů, 3 a 18 měsíců a 3 a 5 let. Na grafu jsou znázorněny podíly taxonů na rodu podle věku. Upraveno dle Holgerson et al. (2020).

Během prvních tří měsíců života obsahuje dutina ústní jednoduchý jádrový mikrobiom složený zejména z rodů *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella* a *Gemella*. U kojenců nízkého věku byly také přítomny taxony, které nejsou běžně detekované v dutině ústní a časem mizí, včetně stafylokoků, kteří jsou obvykle na lidské kůži či dalších přechodných druhů, které zahrnovaly druhy střevní a environmentální. Vzhledem k neustálému toku slin do gastrointestinálního

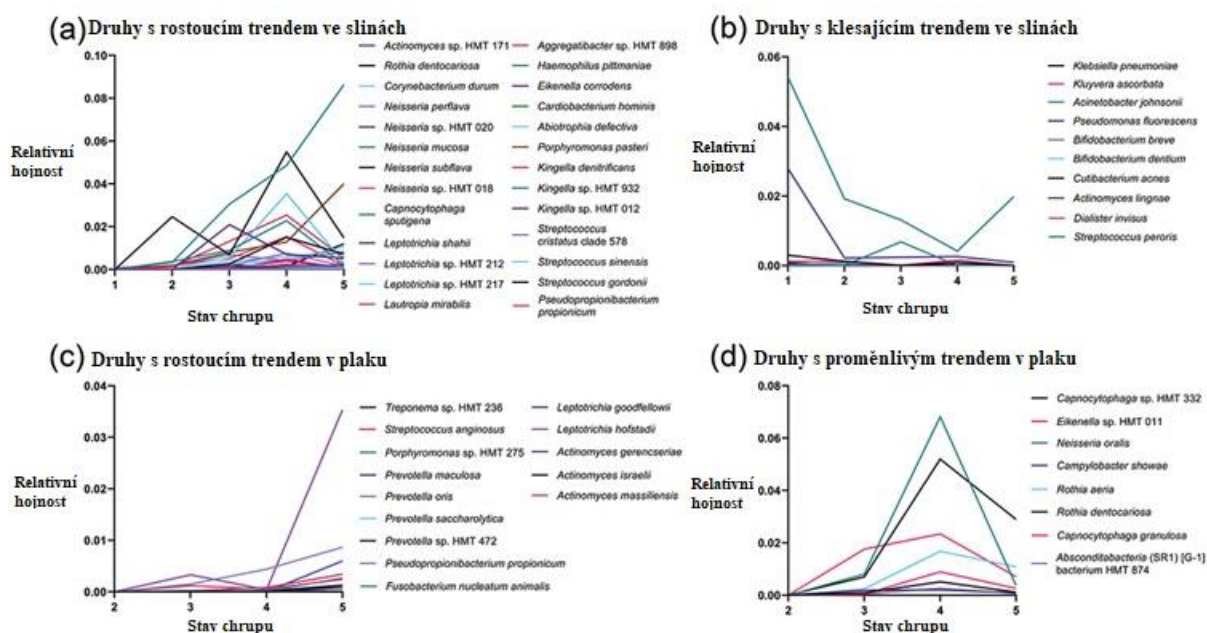
traktu je nepravděpodobné, že by bakterie přežily jako planktonní obyvatelé slin (bakteriální druhy rostoucí v tekutém médiu), takže požadavkem pro kolonizaci je schopnost adheze k povrchům. U raných kojenců mohou organismy přilnout buď na epitelální tkáň, nebo k jiným mikroorganismům v sekundární interakci. Je také možné, že ranní kolonizátoři mají vliv na další kolonizaci, protože vývoj bakteriální komunity je založen i na řadě synergických interakcí, včetně syntrofie, kdy jedna bakterie poskytuje zdroj energie pro druhou. Příkladem může být fermentace volného cukru orálními streptokoky, při které se uvolňuje jako produkt laktát, tedy hlavní živina pro bakterie rodu *Veillonella* (Jakubovics 2015a; Dashper et al. 2019; Sulyanto et al. 2019).

Mezi třetím a šestým měsícem věku vzrůstá prevalence dalších druhů, včetně členů rodu *Prevotella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Rothia* a *Neisseria*, což naznačuje závislost na dřívějších kolonizátorech (Sulyanto et al. 2019).

Trend zvýšené diverzity mikrobiomu pokračuje do raného batolecího věku než se stabilizuje v raném dětství (Dzidic et al. 2018; Dashper et al. 2019). Vznik tvrdých povrchů zubů, a také postupné zavádění pevné stravy je pro orální mikrobiom dynamickým obdobím (Dzidic et al. 2018; Arishi et al. 2023).

S konzumací pevné stravy jsou zavedeny nové substráty pro bakteriální metabolismus, ale také je s ní spojeno postupné snižování dávky mateřského mléka. Obě tyto změny pravděpodobně ovlivňují rozmanitost a složení orálního mikrobiomu. Kojenci, kteří dostávají pevnou stravu mají vyšší výskyt bakterií rodu *Gemella*, *Veillonella*, *Fusobacterium* a *Neisseria* (Dzidic et al. 2018; Oba et al. 2020).

Erupce zubů může také ovlivnit složení orálního mikrobiomu, a to zejména přítomností nových povrchů v dutině ústní pro bakteriální adhezi. Prořezávání prvních zubů často doprovází zavádění pevné stravy, a proto je obtížné rozlišit mezi účinky těchto dvou událostí (Kageyama et al. 2019). Ve studii Xu et al. 2022 byly odebrány vzorky 13 účastníků v pěti reprezentativních stavech chrupu, stádiích S1–S5 (S1 – průměrný věk účastníků 5 měsíců před prořezáním zubů, S2 – průměrně 8 měsíců s prořezanými dvěma primárními řezáky, S3 – průměrný věk 16 měsíců se všemi prořezanými horními a dolními primárními řezáky (8 zubů), S4 – průměrný věk 22 měsíců se všemi prořezanými primárními stoličkami (16 zubů) a poslední stádium S5 – v plném primárním chrupu (20 zubů). Pro S1 byly odebírány pouze vzorky slin, pro S2–S5 byly odebírány vzorky slin i plaku. Na Obrázku 8 je znázorněna relativní četnost bakteriálních druhů s významnými změnami v čase ve slinách a plaku. Z výsledků studie je patrné, že se ekosystém slin zdá být složitější a dynamičtější než ekosystém plaku, s větším množstvím bakterií a rozmanitějšími druhy v průběhu času. Mikrobiální diverzita zejména ve slinách se velmi liší od stádia bez prořezaných zubů až po úplnou erupci osmi předních zubů. Přibližně 30 % OTU (operačně taxonomická jednotka) ve slinách a 70 % OTU v plaku přetrvávalo během procesu erupce ve všech stavech chrupu. To naznačuje, že většina taxonů slin je během erupce zubů změněna, zatímco většina taxonů plaku zůstává.



Obrázek 8: Relativní početnost bakteriálních druhů s významnými změnami v čase ve slinách a plaku. Jsou uvedeny druhy s významnými změnami v čase ($P < 0,05$), které bylo možné detekovat ze všech vzorkovacích stavů chrupu. Druhy s rostoucím (a, c), klesajícím (b) a proměnlivým (d) trendem. Upraveno dle Xu et al. (2022).

Po primární erupci zubů kolonizují dutinu ústní nové taxony, včetně druhů *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Gemella*, *Treponema* a *Granulicatella* (Mason et al. 2018; Xu et al. 2022). Další změny orálního mikrobiomu mohou být dále spojeny s přechodem na trvalý chrup, kdy stálé zuby jsou obohaceny o *Actinomyces* spp. (Shi et al. 2018).

Streptococcus spp., který je velmi hojně zastoupen v raném orálním mikrobiomu během prvních sedmi let života postupně klesá. Tento pokles je doprovázen nárůstem jiných bakteriálních rodů, např. rodu *Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Porphyromonas* a *Neisseria*. Dominantní bakteriální rody ve věku 1–8 let jsou *Streptococcus*, *Gemella*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Granulicatella*, *Capnocytophaga*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Nephyromonas* a *Porphyromonas* (Dzidic et al. 2018; Dashper et al. 2019; Holgerson et al. 2020).

3.3.1.3 Faktory ovlivňující orální mikrobiom

Po kolonizaci dutiny ústní dochází vlivem ekologické sukcese k postupnému vytváření stabilních mikrobiálních společenstev. Tento proces je ovlivněn řadou endogenních a exogenních faktorů, které mají vliv na složení, strukturu a metabolické funkce orálních mikroorganismů, čímž přispívají k rozdílu v náchylnosti k různým onemocněním dutiny ústní (Li et al. 2022). Mezi tyto faktory řadíme genetiku, geografický a etnický původ, stravu, kouření, ústní hygienu či užívání antibiotik.

a) Genetika

Ve studii, která se zabývá vlivem lidské genetiky na utváření střevního mikrobiomu bylo identifikováno mnoho mikrobiálních taxonů, jejichž četnost byla ovlivněna genetikou hostitele.

Jednalo se zejména o množství střevních bakterií, které souvisejí se zdravím člověka (Goodrich et al. 2014). Jak je to ale v případě vlivu na orální mikrobiom není zcela jasné.

Dvě studie, které se zabývaly vlivem genetiky a životního prostředí na orální mikrobiom a využívaly model jednovaječných oproti dvojevaječným dvojčatům, vliv genetiky na orální mikrobiom prokazují. Konkrétně je podobnost orálního mikrobiomu vyšší u jednovaječných dvojčat v porovnání s dvojčaty dvojevaječnými. Důležitým zjištěním také je, že přítomné potenciálně kariogenní taxony pravděpodobně nejsou řízeny genetickými faktory (Demmitt et al. 2017; Gomez et al. 2017).

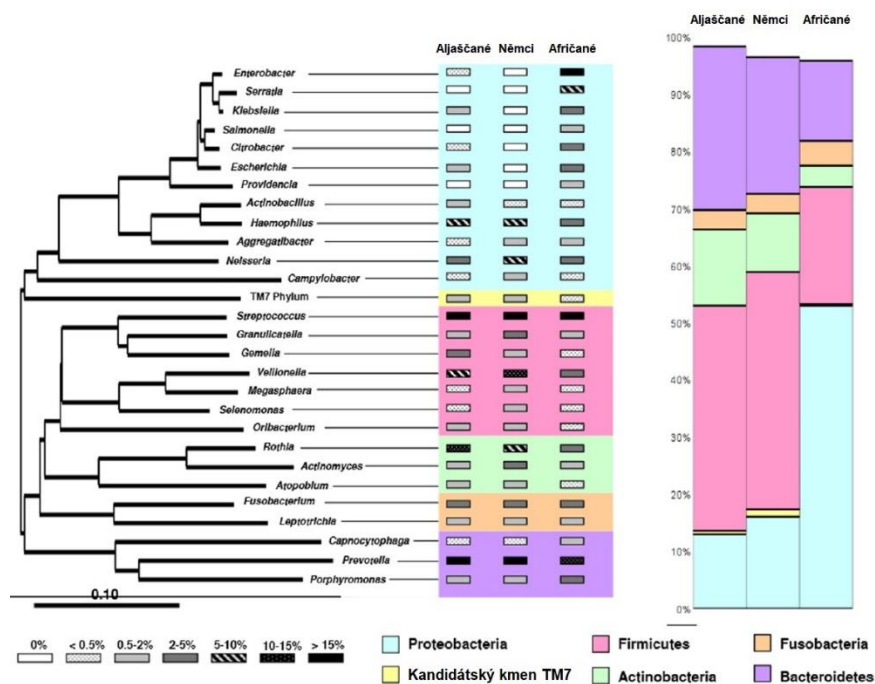
Hlavní překážkou ve zmíněných studiích ale je, že jednovaječná i dvojevaječná dvojčata sdílejí stejnou část genomu svých rodičů, a proto nejsou pro studium přímého přenosu z rodičů na potomky zcela vhodné. Novější studie přichází s odlišným přístupem. Jsou zde srovnávány geneticky příbuzné (biologické) a nepříbuzné (adoptivní) páry matka-dítě. Porovnával se zde podíl sdílených druhů a kmenů mezi dětmi a jejich biologickými matkami, kteří sdílejí polovinu genomu, s podílem dětí a jejich adoptivních matek, které byly adoptované pouze geneticky nepříbuznou rodinou. Zahrnuty byly pouze děti adoptované hned po narození z důvodu minimalizace kontaktu s mikrobiotou biologické matky. Tato studie tedy umožňuje přímo sledovat vliv hostitelské genetiky na orální mikrobiotu. Její výsledky jsou v rozporu z předchozími zmíněnými studiemi, jelikož naznačují, že hnacími faktory mikrobiálního přenosu a struktury mikrobiální komunity jsou kontakt a sdílené prostředí a nikoliv genetika. Na tyto výsledky také poukazuje skutečnost, že sourozenecké a manželské páry si byly stejně podobné i přes rozdíl v genetické příbuznosti (Mukherjee et al. 2021).

b) Geografický a etnický původ

Lidské populace pocházející z různých geografických a klimatických oblastí vykazují rozdíly ve slinném mikrobiomu, jejichž důvody stále zbývá objasnit (Li et al. 2014).

Byl analyzován slinný mikrobiom původních obyvatel Aljašky, Němců a Afričanů. Výsledky této analýzy vidíme na Obrázku 9. U Němců a obyvatel Aljašky byl nejčastějším bakteriálním kmenem kmen Firmicutes, který byl následován v sestupném pořadí kmeny Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria a Fusobacteria. U Afričanů bylo toto pořadí odlišné, nejvíce zastoupeným kmenem byl kmen Proteobacteria, dále potom kmeny Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria a nejméně častý kmen Actinobacteria. U Němců a obyvatel Aljašky byla pozorována podobnost i na úrovni rodu. Konkrétně bylo pozorováno 13 z 28 běžných rodů se stejnou četností. Afričané s obyvateli Aljašky sdílely se srovnatelnou četností pouze šest rodů (*Neisseria*, *Campylobacter*, *Granulicatella*, *Megasphaera*, *Selenomonas* a *Actinomyces*). Němci s Afričany sdílejí pouze tři bakteriální rody (*Actinobacillus*, *Aggregatibacter* a *Capnocytophaga*). U tří rodů (*Streptococcus*, *Fusobacterium* a *Leptotrichia*) byla zjištěna podobná četnost ve všech třech skupinách a u sedmi rodů (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Gemella*, *Klebsiella*, *Rothia* a *Veillonella*) byla odlišná abundance ve všech třech pozorovaných skupinách. Další rozdíly mezi slinnými mikrobiomy jsou odhaleny při pohledu na alfa a beta diverzitu. Nejvyšší alfa diverzitu (druhá diverzita v rámci jednotlivce) vykazovali Němci, střední hodnoty měly aljašské skupiny a nejnižší hodnoty diverzity alfa vykazovala africká skupina. U beta diverzity (druhá diverzita v rámci zkoumané skupiny) je

skutečnost opačná, nejvyšší byla pozorována u afrických skupin a nejnižší potom u Němců (Li et al. 2014).

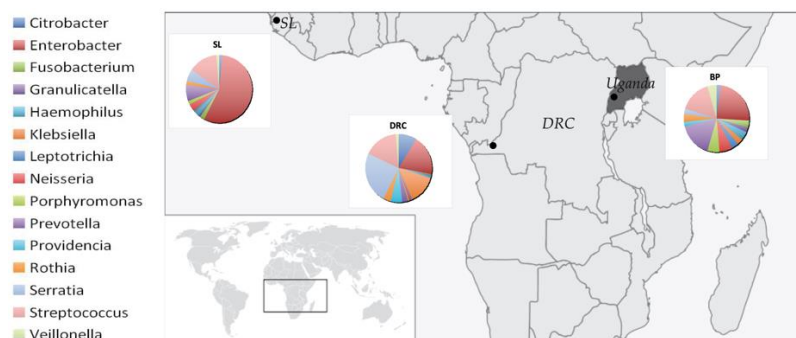


Obrázek 9: Relativní početnost převládajících rodů (>0,5 %) mezi původními Aljaščany, Němci a Afričany. Fylogenetický strom byl vypočten s reprezentativními sekvencemi v plné délce a stupnice představuje evoluční vzdálenost (10 substitucí na 100 nukleotidů). Bakteriální kmene jsou označeny různými barvami; svislé pruhy napravo od každého grafu označují relativní početnost každého kmene, jak je označeno barvami. Převzato z Li et al. (2014).

Při analýze aljašské skupiny jedinci pocházeli ze čtyř různých populací. Dvě populace původem z vnitrozemí Aljašky, zatímco zbylé dvě byly z oblastí podél pobřeží. Celkově tyto čtyři skupiny pokrývaly vzdálenost asi 350 km, nicméně ani v jedné analýze mezi sebou nevykazovaly žádné rozdíly. Zde tedy odlišná poloha nehraje zásadní roli při utváření slinného mikrobiomu (Li et al. 2014).

Při analýze africké skupiny byli do analýzy zapojeni jedinci ze tří skupin. První skupinou byli jedinci z kmene Batwa, žijící v Ugandě. Tradičně lovci a sběrači, ale v důsledku lidských aktivit nyní žijící na hranicích lesů a zemědělských oblastí. A zbylé dvě skupiny s farmářským způsobem života původem ze Sierry Leone a z Demokratické republiky Kongo. Tyto tři skupiny se od sebe výrazně lišily, přičemž skupina Batwa vykazovala výrazně vyšší diverzitu slinného mikrobiomu (127 rodů) v porovnání se skupinou ze Sierry Leone (71 rodů) a skupinou z Demokratické republiky Kongo (54 rodů). Na Obrázku 10 je na koláčových grafech znázorněna frekvence 15 nejběžnějších mikrobiálních rodů v těchto skupinách. Je velmi zajímavé, že po porovnání nalezených mikrobiálních rodů kmene Batwa s Human Oral Microbiome Database autoři zjistili, že téměř třetina rodů detekovaných u kmene Batwa nebyla dříve v lidské dutině popsána. Je tedy možné, že liská ústní dutina může mít mnohem rozmanitější mikrobiální komunitu a vyplývá z toho, že je velmi důležité analyzovat orální mikrobiom u různých populací. Zbylé dvě skupiny vykazovaly navzájem vyšší stupeň podobnosti, přestože jsou od sebe více geograficky vzdálené (Nasidze et al. 2011). Při

porovnání těchto tří skupin pravděpodobně hraje roli životní styl, geografie, a/nebo strava (Li et al. 2014).



Obrázek 10: Mapa míst odběru vzorků a koláčové grafy ukazující frekvence 15 nejběžnějších mikrobiálních rodů v těchto skupinách. SL – Sierra Leone, DRC – Demokratická republika Kongo, BP – kmen Batwa. Převzato z (Nasidze et al. 2011)

Na orální mikrobiom také vyvíjí selekční tlak etnický původ (Mason et al. 2013). Při srovnání složení orálního mikrobiomu mezi zdravou populací hlavních etnických skupin žijících ve Spojených státech, tedy Afroameričanů, bělochů, Číňanů a obyvatel Latinské Ameriky bylo zjištěno, že 33 ze 77 rodů se v četnosti významně liší mezi těmito čtyřmi populacemi. Dokonce bylo v této studii zjištěno, že subgingivální mikrobiální otisk může úspěšně rozlišovat mezi čtyřmi etniky, a že je možné na základě složení mikrobiomů vzorků subgingiválního plaku předpovědět etnický původ jedince s 62 % přesností, 58 % sensitivitou a 89 % specifíčností (Mason et al. 2013).

c) Strava

Dlouhodobé stravovací návyky jsou velmi důležitým faktorem, který má vliv na ústní mikrobiom (Hansen et al. 2018). Jak již bylo zmíněno, samotný vývoj orálního mikrobiomu u kojenců je ovlivněn způsobem výživy, kojením či kojeneckou výživou (Holgerson et al. 2013). Kojené děti mají vyšší podíl bakterií rodu *Streptococcus* a kojenci, kteří dostávají umělou výživu mají vyšší podíl bakterií rodu *Actinomyces* a *Prevotella*. Další změny potom přicházejí spolu se zavedením pevné stravy (Oba et al. 2020).

Je ale důležité, že i u dospělých lze modulovat orální mikrobiotu prostřednictvím dietních změn a zabránit tak rozvoji souvisejících onemocnění (Anderson et al. 2020). Množství konzumovaných cukrů má vliv na mikrobiální profil v zubním plaku a slinách. Bakteriální druhy spojené se zubním kazem, tedy druhy s acidogenními (produkce kyselin) a acidurickými (žijící v kyselém prostředí) vlastnostmi jsou méně časté u jedinců s nízkým příjmem volných cukrů, a naopak mají častější výskyt u jedinců s nadměrným příjmem volných cukrů (Keller et al. 2017). Denní konzumaci cukerných alkoholů využívaných jako náhražek cukru pro prevenci zubního kazu vede ke specifickému vlivu na složení slinného mikrobiomu. Konkrétně dlouhodobá konzumace erythritolu je spojena s nízkou prevalencí streptokoků souvisejících se zubním kazem (Stsepetova et al. 2019).

Ve studii Anderson et al. (2020) se zabývali vlivem zvýšeného příjmu sacharózy, mléčných výrobků a vlákniny na supragingivální mikrobiotu. Všechny tyto složky vyvolaly výkyvy mikrobioty orálního biofilmu, které bylo možné detekovat ještě tři měsíce po tom, co se účastníci navrátili k původní stravě. Zvýšená spotřeba sacharózy byla spojena se streptokoky

podporujícími tvorbu zubního kazu, což je v souladu s výše uvedenou studií. Zajímavé ale je, že častá konzumace mléka a jogurtů četnost těchto taxonů snižovala, a také došlo ke snížení drsnosti povrchu zubní skloviny. Vysoký příjem vlákniny vedl k vysokému výskytu převážně zástupců komenzální orální mikrobioty. Tyto výsledky poukazují na to, že mohou existovat různé specifické dietní faktory, které mají preventivní účinky proti zubnímu kazu (Anderson et al. 2020). Příjem vlákniny, mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem, rybích mono- a polynenasycených mastných kyselin je také spojován s bakteriální diverzitou a strukturou společenstva orální mikrobioty (Hansen et al. 2018).

Na složení orálního mikrobiomu může mít vliv také konzumace alkoholu. Zejména nadměrná konzumace alkoholu může vést k dysbióze v orálním mikrobiomu spojené se zvýšenou kolonizací potenciálně patogenních bakterií. Tyto změny mohou mít potenciální spojení s různými onemocněními dutiny ústní, rakovinou hlavy, krku a trávicího traktu (Fan et al. 2018).

d) Kouření

Cigaretový kouř je zdrojem mnoha toxických látek, které mohou narušit mikrobiální ekologii dutiny ústní (Macgregor 1989). Studium vlivu kouření na orální mikrobiom ukazuje, že má jednoznačný dopad na celkové složení orální mikrobioty u kuřáků. Dochází ke snižování množství komenzálních mikroorganismů a tato ztráta může vést ke kolonizaci patogenními mikroorganismy (Nociti et al. 2015; Al-Zyoud et al. 2020; Jia et al. 2021).

Výsledky ukazují, že kuřáci mají zvýšené hladiny rodů *Streptococcus*, *Prevotella* a *Veillonella* a snížené hladina rodů *Neisseria* a *Porphyromonas*. Přestože rod *Prevotella* je jedním z dominantních rodů slinného mikrobiomu u zdravých lidí, tak jiní zástupci tohoto rodu jsou spojováni se zánětlivými onemocněními a mohou také usnadňovat karcinogenezi (Mai et al. 2015; Larsen 2017). Například u druhu *Veillonella atypica* předchozí zprávy naznačují, že redukuje dusičnany přítomné ve slinách uživatelů tabáku na dusitany, které mohou být dále přeměněny na potenciálně toxické karcinogenní nitrosaminy a prozánětlivý oxid dusnatý a tyto sloučeniny mohou mít patofyziologické důsledky pro orální a systémové zdraví člověka (Bagaitkar et al. 2008; Stepanov et al. 2008).

Je zajímavé, že se u kuřáků významně zvýšily obligátně anaerobní či fakultativně anaerobní rody, a naopak se snížila četnost rodů aerobních (Wu et al. 2016; Jia et al. 2021). Tento jev má pravděpodobně souvislost s tím, že kouření cigaret způsobuje v dutině ústní nedostatek kyslíku, a může tedy měnit orální mikrobiální ekologii na základě vlivu na dostupnost kyslíku (Macgregor 1989; Nociti et al. 2015). U kuřáků byl ale také pozorován pokles některých anaerobních taxonů, např. *Leptotrichia* spp., *Veillonella parvula* a *Peptostreptococcus* spp. Je to ovlivněno buď tím, že jsou v cigaretovém kouři obsaženy specifické antibiotické toxické látky, a nebo je jejich snížení spojováno s poklesem z důvodu konkurence s bakteriemi, jejichž četnost se u kuřáků zvyšuje (Wu et al. 2016).

Kouření také může podporovat bakteriální komunitu, která má sníženou schopnost degradace xenobiotik. Vzhledem k tomu, že orální mikrobiota se dostává s cigaretovým kouřem do kontaktu jako první, tak může hrát důležitou roli při degradaci doprovodných toxických sloučenin. Byl pozorován pokles funkčních drah souvisejících například s degradací

toluenu, nitrotoluenu či styrenu. Změny, které způsobují, že orální komunita není schopná tyto látky degradovat mohou mít pro hostitele potenciální zdravotní důsledky (Wu et al. 2016).

U bývalých kuřáků bylo po určité době pozorováno obecně podobné množství orálních bakterií jako u nekuřáků, takže vše naznačuje tomu, že bakterie, u nichž dochází z důvodu kouření k poklesu mohou být po ukončení kouření znovu obnoveny (Wu et al. 2016).

e) Ústní hygiena

Praktiky ústní hygieny jsou velmi důležitým vnějším faktorem, který formuje ústní mikrobiom. Výsledkem správné ústní hygieny je udržování zubního plaku v nezralém stavu s vysokým podílem raných bakteriálních kolonizátorů, většinou aerobních nebo fakultativních druhů, zejména streptokoků. Důkazy o tom byly nalezeny v depozitech plaku, které jsou zachovány v archeologických exemplářích. Ty mají mnohem vyšší podíl anaerobních bakteriálních druhů oproti současnému zubnímu plaku, jelikož dozrávání plaku je přerušeno právě ústní hygienou (Adler et al. 2013; Lassalle et al. 2018; Wade 2021).

Streptococcus spp., jakožto raný kolonizátor zubního plaku při fermentaci volného cukru uvolňuje organické kyseliny, které jsou hlavními živinami pro bakterie rodu *Veillonella* (Jakubovics 2015a). Akumulace zubního plaku poskytuje anaerobní podmínky prostředí, ve kterém může být inhibován růst grampozitivních streptokoků, který je spojován s dobrou ústní hygienou (Zarco et al. 2012; Mashima & Nakazawa 2014). Toto prostředí naopak podporuje růst anaerobních gramnegativních bakterií, zejména rodu *Veillonella*, který je podle nedávné studie asociován se špatnou ústní hygienou a může potenciálně sloužit jako biologický indikátor špatné ústní hygieny často vedoucí k chronickým onemocněním jako parodontitida a zubní kaz (Zarco et al. 2012; Mashima et al. 2017).

Tyto posuny v bakteriálním složení v orálním biofilmu se odrážejí ve slinném mikrobiomu, kdy ve slinách pacientů s nízkým zubním plakem byla nalezena větší bakteriální diverzita než u pacientů, kteří mají vysoký zubní plak (Mashima et al. 2017).

f) Antibiotika

Při léčbě antibiotiky u dospělých se zdá být složení orálního mikrobiomu velmi odolné, antibiotika vyvolávají v orálním mikrobiomu spíše krátkodobé změny a jejich dopad na orální mikrobiom je menší než na mikrobiom střevní (Zaura et al. 2015).

g) Probiotika

Probiotika jsou definována podle Organizace spojených národů pro výživu a zemědělství (FAO) a Světové zdravotnické organizace (WHO) jako: „Živé mikroorganismy, které při podání v adekvátním množství přispívají k příznivým účinkům na zdraví hostitele“ (Hill et al. 2014). Účinky probiotik na zdraví dutiny ústní byly pozorovány u onemocnění dutiny ústní jako je zubní kaz (Ince et al. 2015), onemocnění parodontu (Köll-Klais et al. 2005), kandidové infekce (Kraft-Bodi et al. 2015) či nepříjemný zápach z úst označovaný jako halitóza (Lee et al. 2020). Pozitivní vliv mají probiotika také v souvislosti se zmírněním nežádoucích účinků při protinádorové radioterapii a chemoterapii, konkrétně mohou být užitečná například při léčbě orální mukozitidy (Jiang et al. 2019). Nejčastěji využívané kmeny v probiotických přípravcích,

kteřé přispívají ke zdraví dutiny ústní spadají do rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Konkrétní bakteriální druhy jsou přirozenou součástí gastrointestinálního traktu a některé z nich osidlují zejména právě dutinu ústní (Mishra et al. 2020).

Pro účinnost probiotik v dutině ústní je nezbytné, aby obsažené mikroorganismy odolávaly podmínkách ústního prostředí včetně obranných mechanismů, dále byly schopny přilnout na kluzké povrchy a tyto povrchy kolonizovat, a také inhibovat orální patogenní druhy (Nadkerny et al. 2015). Působení probiotik v dutině ústní je přímé a nepřímé. Mechanismus přímé interakce se zubním plakem zahrnuje narušení jeho tvorby soutěžením probiotických mikroorganismů o vazebná místa na hostitelských tkáních a jiných bakteriích a soutěžením o živiny. Probiotické druhy také mohou produkovat antimikrobiální sloučeniny, které mohou inhibovat jiné orální bakterie. Oproti tomu nepřímé působení probiotik je prostřednictvím modulace jak vrozené, tak adaptivní imunitní funkce. Je možné, že bakterie mléčného kvašení mohou interagovat s imunokompetentními buňkami, což vede ke změně produkce cytokinů a následným účinkům na celkovou imunitu (Meurman 2005). Mimo modulace imunitních odpovědí jsou některé probiotické druhy schopné zvýšit produkci mucinu a zlepšit bariérovou funkci, a také podporovat angiogenezi a hojení ran (Devine et al. 2015).

3.3.2 Mikrobiom hltanu, jícnu a žaludku

V hltanu nalezneme mikroorganismy sídlící na rozhraní trávicího a dýchacího traktu. Většina bakterií hltanového mikrobiomu spadá do 2 dominantních kmenů Firmicutes a Bacteroidetes, a předpokládá se, že mohou mít aktivní roli v prevenci před infekcemi dýchacích cest a invazivním onemocněním tím, že brání růstu potenciálně patogenních bakterií. Nejhojnější a nejrozšířenější rody hltanového mikrobiomu jsou *Prevotella*, *Veillonella* a *Haemophilus* (Gao et al. 2014; Assarsson et al. 2020).

První studie využívající kultivační metody naznačovaly, že jícen je sterilní nebo obsahuje jen několik málo bakterií, které se do jícnu dostávají polykáním z ústní části hltanu a jícnem pouze procházejí, nebo se naopak vrací ze žaludku gastroezofageálním refluxem (Gagliardi et al. 1998). První komplexní analýza zaměřená na mikrobiom jícnu však ukázala, že bakteriální diverzita je mnohem vyšší a jícnový mikrobiom je vždy přítomen (Pei et al. 2004). Celkový počet aerobních i anaerobních bakterií v jícnu je odhadován na 10^3 – 10^4 KTJ g^{-1} (Sender et al. 2016). Mezi 6 nejčastěji zastoupených kmenů jsou řazeny kmeny Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria a Fusobacteria. Dominantním rodem jícnového mikrobiomu je *Streptococcus*, dalšími významnými rody s vysokým zastoupením potom *Prevotella*, *Veillonella* a *Fusobacterium*. Odhaduje se, že jícnový mikrobiom může být tvořen přibližně z 200 bakteriálních druhů (Yang et al. 2009; Sender et al. 2016).

Žaludek je pro většinu mikroorganismů nepřátelským prostředím vzhledem k produkci a přítomnosti kyseliny chlorovodíkové, a tedy velmi kyselému pH. Celkový počet kultivovatelných bakterií žaludku se pohybuje mezi 10^3 – 10^4 KTJ g^{-1} . Dominantním druhem žaludečního mikrobiomu u vysokého počtu lidí zejména v rozvojových zemích je *Helicobacter pylori*, gramnegativní, mikroaerofilní bakterie, kterou řadíme do kmene Proteobacteria (Frenck & Clemens 2003; Sender et al. 2016). Infekce *H. pylori* ovlivňuje fyziologii žaludku, a má tedy také vliv na vlastnosti žaludeční sliznice jako ekologické niky pro ostatní bakterie (McCull et al. 2000). Pokud je tento bakteriální druh přítomen, tak představuje až 72 % kultivovatelných

žaludečních bakterií a je s ním také spojena nižší druhová bohatost daného mikrobiomu (Miftahussurur et al. 2020; Parsons et al. 2017). Samotný *H. pylori* je na jedné straně diskutován jako lidský bakteriální patogen, který je spojen s výskytem u pacientů s chronickou gastritidou, peptickým vředem či rakovinou žaludku. Na druhé straně ale jeho asymptomatické soužití s člověkem u většiny populace svědčí o možnosti výskytu tohoto druhu jako nepatogenního mikroorganismu (Reshetnyak et al. 2021).

Nejčastěji identifikované kmeny v žaludku bez přítomnosti *H. pylori* jsou Firmicutes, následované Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria a Fusobacteria (Parsons et al. 2017). Nejrozšířenějšími rody v žaludku jsou stejně jako v hltanu a jícnu *Streptococcus* a *Prevotella*, dále potom *Granulicatella* a *Neisseria* (Pivetta et al. 2023).

3.3.3 Mikrobiom tenkého střeva

Tenké střevo lze rozdělit na tři na sebe navazující části – dvanáctník, lačník, kyčelník a je místem, ve kterém probíhá trávení a vstřebávání živin z přijaté potravy (Kaunitz & Akiba 2006; Sundin et al. 2017). Charakterizace mikrobioty tenkého střeva je velmi obtížná, zejména kvůli nesnadnému přístupu do tenkého střeva, a také nižší mikrobiální hustotě, která komplikuje získání dostatečného množství bakteriální DNA (El Aidy et al. 2015) Celkové množství aerobních a anaerobních bakterií v prostředí tenkého střeva je odhadováno na 10^3 – 10^8 KTJ g⁻¹ (Sekirov et al. 2010). K postupnému nárůstu mikrobioty dochází ve směru od dvanáctníku ke kyčelníku. Tento nárůst je spojen s měnicími se podmínkami prostředí, tedy s nižší kyselostí, a také postupně nižší koncentrací trávicích enzymů a žaludečních a žlučových kyselin, až k dosažení neutrálně alkalického pH v kyčelníku (Kaunitz & Akiba 2006).

Nejhojnějším kmenem v tenkém střevě je Firmicutes, zejména rody *Streptococcus*, *Veillonella* a *Gemella*. Ve dvanáctníku byly zjištěny vyšší hladiny Bacteroidetes, v ostatních částech tenkého střeva potom převládaly bakterie řazené do kmenů Proteobacteria, Actinobacteria a Fusobacteria (Sundin et al. 2017; Seekatz et al. 2019).

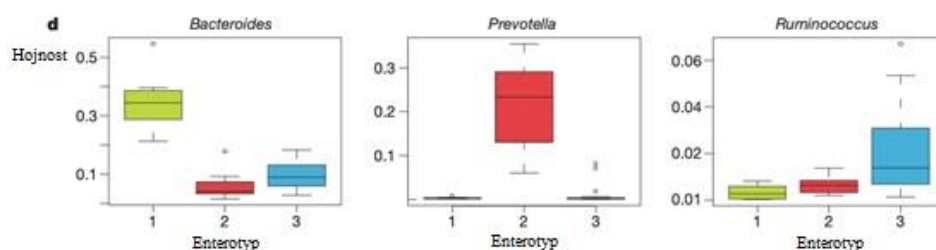
3.3.4 Mikrobiom tlustého střeva

Tlusté střevo je poslední částí trávicí trubice, kde dochází ke vstřebávání vody a minerálních látek, a také k fermentaci sacharidů. Lze ho rozdělit na několik oddílů. Konkrétně na slepé střevo, tračník, který je hlavní částí tlustého střeva a je dále členěný na tračník vzestupný, příčný, sestupný a esovitou kličku a poslední částí je konečník (Scheithauer et al. 2016; Ruan et al. 2020). Tlusté střevo je domovem nejsložitější bakteriální diverzity s hustotou bakteriálních buněk od 10^8 KTJ g⁻¹ přecházející z ilea do slepého střeva až po 10^{11} KTJ g⁻¹ měřený ve stolici (Sender et al. 2016). Vysoká bakteriální diverzita a abundance je způsobena několika faktory, například středním nebo méně kyselým pH prostředí, nízkou koncentrací žlučových solí či delším retenčním časem v důsledku relativně pomalejší peristaltiky (Walter & Ley 2011; Ramakrishna 2013; Ghosh & Pramanik 2021).

S tlustým střevem je spojeno zejména pět hlavních kmenů: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia a Proteobacteria (Eckburg et al. 2005). Ve složení zdravé střevní mikrobioty až z 90 % dominují kmeny Firmicutes a Bacteroidetes. Kmen Firmicutes zahrnuje několik rodů, ale nejčastějšími rody střevní mikrobioty jsou *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Ruminococcus* a *Clostridium*, které tvoří až 95 %. Důležité je také zmínit rod

Bifidobacterium, který je nejvíce zastoupeným rodem z kmene Actinobacteria (Arumugam et al. 2011).

Lidský mikrobiom lze rozdělit do tří enterotypů (Obrázek 11) neboli tří definovaných a často se opakujících mikrobiálních společenství. Tyto bakteriální shluky nejsou ovlivněny národností, věkem, pohlavím, ale jsou ovlivněny stravou hostitele. Patří mezi ně enterotyp 1 s typickou převahou zástupců *Bacteroides*, enterotyp 2, jehož indikátorem jsou zástupci rodu *Prevotella* a enterotyp 3 s převažujícími zástupci rodu *Ruminococcus* (Arumugam et al. 2011).



Obrázek 11: Analýza střevní mikrobioty dospělých a zdravých jedinců demonstruje existenci tří shluků neboli enterotypů zaměřených na hlavní hybnou sílu, *Bacteroides*, *Prevotella* a *Ruminococcus*, měřené na jejich relativní četnosti. Upraveno dle Arumugam et al. (2011).

Další analýza zaměřená na stratifikaci střevního mikrobiomu vedla k identifikaci pouze dvou enterotypů, konkrétně *Bacteroides*, který je fúzován s méně rozlišitelným enterotypem *Ruminococcus* a enterotyp *Prevotella*. Tyto enterotypy se vyskytují v závislosti na dlouhodobé stravě. Enterotyp *Bacteroides* je vysoce spojen s konzumací živočišných bílkovin a tuků, naopak strava s vysokým obsahem sacharidů a jednoduchých cukrů je typická pro enterotyp *Prevotella* (Wu et al. 2011).

Řada studií v nedávné době však ukazuje, že vzorky z různých enterotypů nelze jasně oddělit do odlišných shluků, a že ve většině případů je pozorován spíše souvislý gradient (Koren et al. 2013). Neboli, že distribuce enterotypů může být spíše spojitá než diskrétní (Knights et al. 2014).

Stejně jako komenzální mikrobiota v dutině ústní, také střevní mikrobiota má v lidském těle mnoho významných funkcí (Gomaa 2020). Hraje zásadní roli při trávení a metabolismu (Rothschild et al. 2018). Fermentuje sacharidové substráty, které nemohou být tráveny endogenními enzymy a absorbovány v tenkém střevě (Chassard & Lacroix 2013; Louis et al. 2007). Je také zodpovědná za biosyntézu několika základních vitamínů jako je vitamin K a ve vodě rozpustné vitamíny skupiny B, konkrétně B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (kyselina panthotenová), B6 (pyridoxin), B7 (biotin), B9 (foláty), B12 (kobalamin), čímž má příznivý vliv na zdraví hostitele (LeBlanc et al. 2013). Podílí se na rozkladu xenobiotik jako jsou léky a toxiny z prostředí. Prostřednictvím přímých nebo nepřímých mechanismů může xenobiotika aktivovat, inaktivovat nebo je dokonce transformovat na toxické metabolity (Maurice et al. 2013; Spanogiannopoulos et al. 2016).

Střevní mikrobiota chrání svého hostitele také před kolonizací povrchů sliznic exogenními patogenními bakteriemi (Lawley & Walker 2013), a dokonce jsou součástí komenzální střevní mikrobioty druhy, které produkují bakteriociny neboli látky s antimikrobiální aktivitou. Způsob účinku těchto látek se liší v závislosti na třídě bakteriocinů, ale obecně uplatňují svou antimikrobiální aktivitu tvorbou pórů v cílové buňce, degradací peptidoglykanu buněčné stěny nebo zasahováním do buněčných procesů (Walsh et al. 2015).

Komenzální interakce s hostitelem také podporuje dozrávání a fungování vrozené i adaptivní imunity (Cénit et al. 2014; Cheng et al. 2019). Mezi další důležitou funkci patří například ovlivnění komunikace mozek-střevo. Osa mozek-střevo-mikrobiota je integrovaný komunikační systém umožňující střevním mikrobům komunikovat s mozkiem a mozku se střevy (Rhee et al. 2009). Změny v této komunikaci se podílejí na různých chorobných stavech, od syndromu dráždivého tračníku po psychiatrické a neurologické poruchy (Martin et al. 2018). Dále v textu jsou uvedeny příklady nejtypičtějších zástupců mikrobioty střeva.

a) Čeleď *Bifidobacteriaceae*

- **Rod *Bifidobacterium***

Bifidobakterie jsou po vyčerpání kyslíku fakultativně anaerobními druhy, ke kterému dochází v prvních dnech života novorozence, dominantním rodem přítomným ve střevě zdravého kojence (Favier et al. 2002). V dospělosti jsou hladiny bifidobakterií ve střevě nižší, ale zůstávají relativně stabilní. Ve stáří jejich množství opět klesá (Odamaki et al. 2016), ale je zajímavé, že u lidí nad 100 let věku je prevalence rodu *Bifidobacterium* opět vyšší (Biagi et al. 2016).

Mezi typické komenzální druhy spojené se střevem člověka patří *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. dentium* a *B. pseudolongum* (Turrone et al. 2009). Obecně platí, že *B. longum* subsp. *infantis*, *B. breve* a *B. bifidum* jsou dominantními druhy u kojenců (Favier et al. 2002; Turrone et al. 2012). Druhy *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis* a *B. catenulatum* jsou nejčastěji detekovanými druhy u dospělých (Ishikawa et al. 2013).

Bifidobakterie mají velmi významný dopad na lidské tlusté střevo ve vztahu k jejich relativně nízkému počtu v dospělosti (Rivière et al. 2016). Některé kmeny bifidobakterií jsou široce používány jako probiotika a jejich bezpečnost je podpořena dlouhodobou konzumací ve fermentovaných potravinách, a také rostoucími znalostmi o jejich fyziologii a genomech (Arboleya et al. 2016; O'Callaghan & Van Sinderen 2016). Naopak snížení relativního množství druhů *Bifidobacterium* je spojeno s průjmem v důsledku užívání antibiotik, se zánětlivým onemocněním střev (IBD, zahrnující Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu), syndromem dráždivého tračníku (IBS) (Rivière et al. 2016), s obezitou (Gong et al. 2022) či regresivním autismem (Wang et al. 2011).

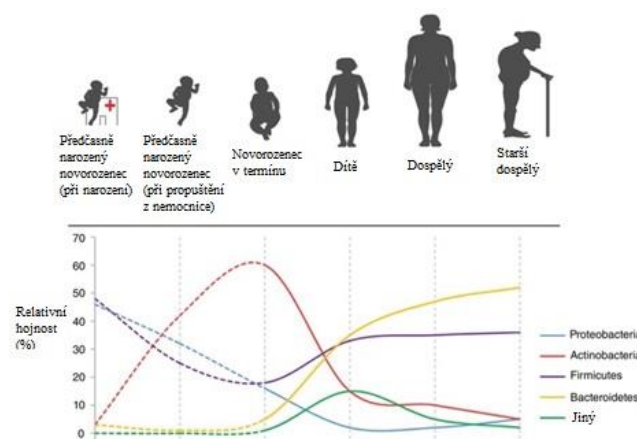
3.3.4.1 Vývoj střevního mikrobiomu

Mikrobiální kolonizace střeva po narození je ústřední událostí, která ovlivňuje zdraví kojence s celoživotními následky. Je proto důležité se zaměřit na faktory, které určují kolonizaci, a tedy vývoj střevního mikrobiomu (Lagkouvardos et al. 2023). Je ovlivněn gestačním věkem a řadou časných životních událostí jako je způsob porodu, užívání antibiotik u matky a způsob výživy.

Gestační věk, tedy odhadované stáří plodu v děloze, je při narození velmi významný faktor pro vývoj střevního mikrobiomu u kojenců (La Rosa et al. 2014). Je to zejména proto, že o předčasně narozené novorozence je většinou pečováno v prostředí neonatální jednotky intenzivní péče, tedy v odlišném prostředí z hlediska expozice mikroorganismům. Je zde zvýšené vystavení novorozence bakteriálním druhům z nemocnice a omezený přístup

k bakteriím rodičů. Zároveň také předčasně narození a hospitalizovaní novorozenci podstupují klinickou péči, která se odlišuje od péče доноšených novorozenců a zahrnuje zejména specifické postupy krmení, příjem antibiotik, ventilaci či zavádění nitrožilní hadičky (Zwittink et al. 2017; Jia et al. 2020; Yap et al. 2021). Konkrétně je například vliv podpory dýchání u novorozenců spojován s vytvořením prostředí bohatého na kyslík v gastrointestinálním traktu a s prvotním utvářením střevní mikrobioty s dominancí aerobních a fakultativně anaerobních bakteriálních druhů (Shaw et al. 2015; Zwittink et al. 2017). Vysoký výskyt těchto druhů v kombinaci s nízkým výskytem bakterií rodu *Bifidobacterium* je spojován s různými negativními zdravotními důsledky. Například s nekrotizující enterokolitidou, která je hlavní příčinou morbidit a mortality v této populaci, či sepsí s pozdním nástupem, která také z velké části přispívá k předčasným úmrtím předčasně narozených novorozenců (Groer et al. 2014; Dong & Speer 2015; Vangay et al. 2015).

Předčasně narozené děti se ve srovnání s donošenými dětmi obecně liší v mikrobiální diverzitě, rychlosti kolonizace a specifických bakterií, které osídlují prostředí tlustého střeva (La Rosa et al. 2014; Jia et al. 2020; Yap et al. 2021). Rozdíly jsou znázorněny na Obrázku 12. Je důležité ještě zmínit, že poruchy ve vývoji mikrobioty často vedou k vyšším rizikům onemocnění i v pozdějším životě (Zwittink et al. 2017).



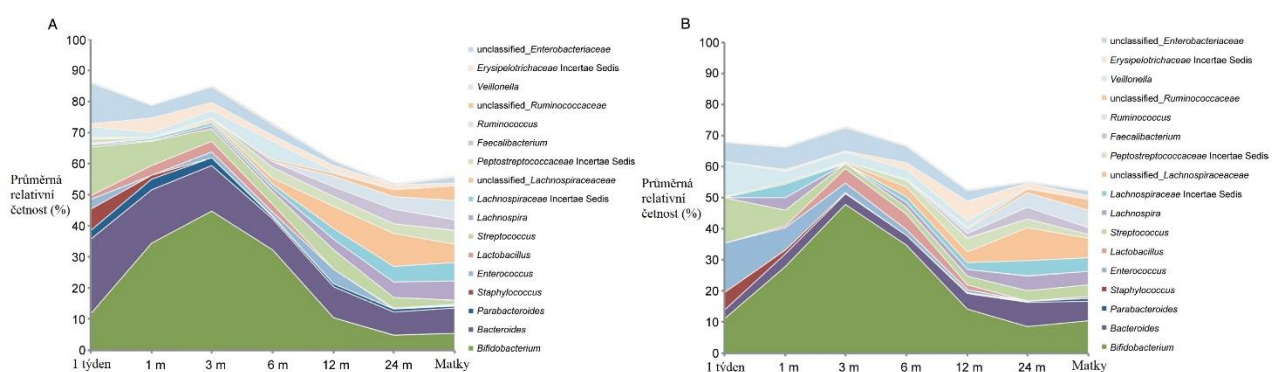
Obrázek 12: Vývoj střevní mikrobioty v průběhu života. Relativní abundance bakteriálních kmenů jsou znázorněny pro předčasně narozené novorozence (při narození a při propuštění z nemocnice), novorozence v termínu, děti, dospělé a starší dospělé. Relativní abundance kojenců byly odvozeny z prací Masi et al. (2021); Stewart et al. (2018); Vaiserman et al. (2017). Upraveno dle Ahearn-Ford et al. (2022).

Dalším faktorem, který ovlivňuje vývoj střevního mikrobiomu je způsob porodu, tedy porod vaginální nebo porod císařským řezem (CS). Kojenci narození CS mají v prvním týdnu života obecně nižší celkovou diverzitu střevní mikrobioty ve srovnání s kojenci narozenými vaginálním porodem (Rutayisire et al. 2016).

Při průchodu plodu porodním kanálem v průběhu vaginálního porodu dochází k vertikálnímu přenosu vaginální a perianální mikrobioty matky na plod. Proto mají kojenci narození tímto způsobem střevní mikrobiom velmi podobný vaginální a fekální mikrobiotě své matky (Dominguez-Bello et al. 2010). Během tohoto typu porodu kolonizují střevo novorozence fakultativně anaerobní druhy jako *Escherichia coli* a rody *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Tyto bakterie v prvních dnech života novorozence vytvářejí anaerobní prostředí pro růst obligátně anaerobních druhů *Bacteroides* a *Bifidobacterium* spp. (Pantoja-

Feliciano et al. 2013). Oproti tomu děti narozené CS nemají při narození žádné bakterie vaginálního mikrobiomu jako například *Lactobacillus* spp. či *Prevotella* spp., a místo toho jsou kolonizovány bakteriálními rody přenesenými z povrchu kůže matky jako *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium*. Kojenci narození CS tak mají sníženou kolonizaci rody *Bacteroides*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a zvýšenou kolonizaci rodem *Clostridium* (Dominguez-Bello et al. 2010; Rutayisire et al. 2016). Tyto rozdíly v počátečních komunitách novorozenců mohou mít významné zdravotní důsledky, protože rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou považovány za zdraví protektivní, zatímco některé *Staphylococcus* spp. a *Clostridium* spp. mají patogenní potenciál (Rastall 2004; Adlerberth & Wold 2009). Narušení přenosu bakterií z matky na novorozence z důvodu porodu CS může zvýšit riziko obezity (Mueller et al. 2015) a řady onemocnění, například celiakie (Mårild et al. 2012), astmatu (Roudit et al. 2009), zánětlivých onemocnění střev (Sevelsted et al. 2015) a diabetu 1. typu (Algert et al. 2009).

Od prvního týdne života do jednoho měsíce věku vykazovali kojenci narození CS stále významně nižší hladiny *Bifidobacterium* spp. a vysoký výskyt rodů *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Haemophilus* a *Veillonella*. Kojenci narození vaginálním porodem naopak vykazovali zvýšené množství *Bacteroides* spp. (Hesla et al. 2014; Dogra et al. 2015). Po 30 až 90 dnech po narození již není druhová diverzita mezi způsoby porodu tak významná, některé studie ale uvádějí, že jsou rozdíly i nadále zjištěny, konkrétně rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou stále hojnější u vaginálně narozených kojenců (Mitsou et al. 2008; Kabeerdoss et al. 2013) a u kojenců narozených CS jsou stále nižší hladiny *Bacteroides* a vyšší hladiny *Enterobacteriaceae* a *Clostridium* (Hesla et al. 2014; Jakobsson et al. 2014). Jakmile kojeneček dosáhne věku 1 roku, je již do vývoje střevního mikrobiomu zapojeno mnoho dalších faktorů. Je tedy velmi obtížné přisuzovat rozdíly způsobu porodu (Jakobsson et al. 2014). Na Obrázku 13 je znázorněno srovnání střevní mikrobioty u matek a vývoje bakteriálních druhů střevní mikrobioty u jejich kojenců narozených CS a vaginálním porodem od 1 týdne po narození do 2 let (Jakobsson et al. 2014).



Obrázek 13: Složení střevní mikrobioty na úrovni rodu u matek a jejich kojenců v 1 týdnu, v 1, 3, 6, 12 a 24 měsících. Průměrné relativní abundance (%) nejhojnějších bakteriálních rodů u vaginálně narozených kojenců (A) a kojenců narozených CS (B). Upraveno dle Jakobsson et al. (2014).

Důležitým faktorem, který má vliv na složení a funkci střevní mikrobioty kojenců, je také typ výživy, který lze rozlišit na mateřské mléko a umělou výživu (Laursen et al. 2017).

Mateřské mléko je zdrojem řady bakterií prospěšných pro kojence jako jsou rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a další bakterie mléčného kvašení (Martín et al. 2003; 2009).

Významnou složku mateřského mléka tvoří oligosacharidy lidského mléka (HMO), které jsou v tenkém střevě tráveny pouze částečně a přecházejí do tlustého střeva, kde působí jako prebiotika a podporují růst specifických mikrobiálních komunit (Barile & Rastall 2013; Cuxart et al. 2022). Jsou fermentovány převážně bifidobakteriemi, jejichž produkty jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) (Lawson et al. 2020), které inhibují růst oportunních patogenů patřících do čeledí *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* a *Staphylococcaceae* (Fukuda et al. 2011; Sakurama et al. 2013; Laursen 2021).

Kojenci krmení umělou výživou mají tendenci mít vyšší druhovou bohatost, ale snížené celkové množství střevních bakterií, ve srovnání s kojennými kojenci (Fabiano et al. 2021; Chichlowski et al. 2023). Je u nich zvýšená prevalence *Clostridium* a snížené množství bifidobakterií (Bezirtzoglou et al. 2011; Boudry et al. 2021).

Spolu se zaváděním pevné stravy dochází k důležitému posunu ve složení střevní mikrobioty (Palmer et al. 2007), který má za následek zvýšení četnosti mnohých taxonů, u kterých byla zjištěna převaha v dospělé střevní mikrobiotě jako jsou rody *Bacteroides* a *Ruminococcus*, a také k poklesu rodu *Escherichia*. Do jednoho roku věku dochází ve střevní mikrobiotě k podstatnému nárůstu mnoha rodů z kmene Firmicutes a k poklesu *Bifidobacterium* spp. pravděpodobně způsobeným ukončením kojení, a tedy ukončením příjmu mateřského mléka (Bäckhed et al. 2015). Tyto změny vedou ke společenstvu s dominancí kmenů Bacteroidetes a Firmicutes reprezentovanými především rody *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Clostridium* a *Ruminococcus*. To se již podobá složení střevní mikrobioty dospělého. Dozrávání střevní mikrobioty ale probíhá i nadále, dokud děti nedosáhnou zhruba věku tří let (Yatsunencko et al. 2012; Vallès et al. 2014). Typický vzorec střevní mikrobioty pro dospělé však nemusí být zcela ustanoven až do dospívání (Greenhalgh et al. 2016).

3.3.4.2 Faktory ovlivňující střevní mikrobiom

Podobně jako mikrobiota dutiny ústní je střevní mikrobiota také ovlivněna řadou faktorů. Mimo změny způsobené stárnutím, lze uvést například genetiku hostitele, geografickou polohu, pohlaví, sociální kontext a prostředí, životní styl, stravu a užívání antibiotik či probiotik (Huse et al. 2008; Walker et al. 2011; Yatsunencko et al. 2012). V následující části se více zaměříme na vliv vybraných faktorů na střevní mikrobiom.

a) Věk

Vývoj střevního mikrobiomu a s tím související probíhající změny byly popsány v přechodí části. V dospělosti je zdravá střevní mikrobiota relativně stabilní (Faith et al. 2013), ale může být ovlivněna již zmíněnými faktory. Na střevní mikrobiotu má významný dopad stárnutí (Mariat et al. 2009). Některé fyziologické změny a změny životního stylu spojené se stárnutím mohou být přispívajícími faktory, které vedou ke změnám stravovacích návyků a výživy jako takové, včetně ztráty chrupu, omezení trávení v důsledku gastrointestinální dysmotility, změny chuti k jídlu jako výsledek předepsaných léků či psychického stavu pacientů nebo změny životních podmínek, kam lze zařadit například rezidenční péči nebo hospitalizaci v nemocnici (Lovat 1996). Tyto změny tak mohou následně ovlivnit udržení zdraví stárnoucího hostitele. Starší střevní mikrobiota je zpravidla charakterizována poklesem mikrobiální diverzity, zvýšením množství oportunních patogenů a poklesem druhů, které jsou spojené s produkcí

mastných kyselin s krátkým řetězcem, zejména s produkcí butyrátu (Biagi et al. 2017). Pokles produkce SCFA střevní mikrobiotou může narušit imunitní systém a způsobit různá onemocnění, vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že butyrát zlepšuje protizánětlivou aktivitu imunitního systému (Arpaia et al. 2013). U starších konkrétně dochází ke zvýšení četnosti bakterií kmene Bacteroidetes a Proteobacteria a ke snížení bakteriálních rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Odamaki et al. 2016).

Je zajímavé, že u lidí ve věku 99–104 let se střevní mikrobiota významně liší nejen od mikrobioty dospělých, ale také od mikrobioty starších jedinců (Biagi et al. 2010). Dlouhověkost zvyšuje bohatost mikrobiální komunity. Studie zkoumající střevní mikrobiotu u lidí ve věku 105–109 let odhalila nárůst potenciálních oportunních bakterií, ale také vyšší prevalenci množství subdominantních, se zdravím souvisejících bakteriálních rodů a čeledí jako jsou *Oscillospira*, *Christensenellaceae*, *Akkermansia* a *Bifidobacterium* (Biagi et al. 2016).

b) Strava

Velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje střevní mikrobiotu je strava (Rinninella et al. 2023). Nezbytným substrátem pro střevní mikrobiotu je vláknina, která sestává z ligninu, z neškrobových polysacharidů, konkrétně z celulózy, hemicelulózy, beta-glukanů, pektinů, rostlinných gum a slizů a chitinu, dále z rezistentních škrobů a nestravitelných oligosacharidů jako rafinóza, stachyóza, oligofruktóza a inulin (Mudgil & Barak 2013). Sacharidové substráty, které nemohou být tráveny endogenními enzymy a absorbovány v tenkém střevě přecházejí až do tlustého střeva, kde procházejí sacharolytickou fermentací střevními bakteriemi, která tak zvyšuje hostiteli zisk energie ze stravy a jsou důležitým faktorem, který přispívá k růstu a udržování střevní mikrobioty. Hlavními produkty mikrobiální fermentace monosacharidů jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem jako acetát, propionát či butyrát a plyny (oxid uhličitý, vodík a metan) (Louis et al. 2007; Chassard & Lacroix 2013). SCFA jsou rychle absorbovány buňkami střevního epitelu a podílejí se na regulaci buněčných procesů, jako je genová exprese, chemotaxe, diferenciacce, proliferace a apoptóza (Correa et al. 2016). Nestravitelné komplexní sacharidy mohou podporovat proliferaci širšího spektra bakteriálních druhů se specifickými vlastnostmi, které mohou například uvolňovat určité mikrobiální metabolity (Maukonen & Saarela 2015).

Některé složky vlákniny mohou být klasifikovány jako prebiotika. Definice tohoto termínu byla aktualizována v roce 2017 na setkání ISAPP na „*substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy a přináší zdravotní přínos*“ (Gibson et al. 2017). Mezi prebiotika jsou dle aktuální definice řazeny pouze fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy. Označení dalších složek vlákniny (např. pektinů či celulózy) za prebiotika není možné, jelikož podporují růst širokého spektra mikroorganismů a nikoliv pouze těch které podporují zdraví v ekosystému hostitele (Gibson et al. 2017). Konkrétně fruktooligosacharidy inulinového typu podporují hojnost rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a bakteriálního druhu *Faecalibacterium prausnitzii* (Hughes et al. 2022).

Strava bohatá na živočišné bílkoviny zvyšuje množství anaerobních bakteriálních druhů tolerantních ke žluči jako jsou *Bacteroides*, *Alistipes* a *Bilophila* (Zhang & Gérard 2022). Tato strava obsahuje množství molekul, které jsou většinou obsaženy v červeném mase a v mléčných výrobcích jako karnitin, fosfatidylcholin a jeho metabolit cholin. Po požití jsou metabolizovány

střevními mikroorganismy na trimethylamin (TMA), který je absorbován do krve a enzymaticky oxidován v játrech na trimethylamin-N-oxid (TMAO), sloučeninu, která je známá pro svůj proaterogenní potenciál, a tedy zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění (Koeth et al. 2013; Stremmel et al. 2017). Na druhé straně strava bohatá na rostlinné bílkoviny, konkrétně například hrách může zvýšit množství prospěšných bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* a snížit množství *Bacteroides fragilis* a *Clostridium perfringens* (Dominika et al. 2011).

Na základě systematického přehledu, který shrnuje výsledky dostupných studií zabývajících se vlivem příjmu tuku na složení střevní mikrobioty je vysoký příjem tuků a nasycených mastných kyselin spojován s negativním ovlivněním bohatosti a rozmanitosti střevní mikrobioty (Wolters et al. 2019). Konkrétně tato strava vede k dysbióze s poklesem Bacteroidetes a zvýšením Firmicutes a Proteobacteria, což má za následek zvýšenou inzulinovou rezistenci, propustnost střeva a zánět tukové tkáně (Malesza et al. 2021). Vysoký obsah mononenasycených mastných kyselin (MUFA) ve stravě může pozitivně korelovat s rody *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Turicibacter* a čeledí *Enterobacteriaceae*. Tato strava vykazuje pozitivní zdravotní účinky se zvýšenou bakteriální diverzitou. Obecně vysoký příjem nasycených tuků, nadměrné množství omega-6 PUFA (polynenasycené mastné kyseliny) a snížený příjem omega-3 PUFA mohou vést k dysbióze, což může potenciálně vést ve změnám střevní bariéry a metabolickým poruchám (Wolters et al. 2019; Rinninella et al. 2023).

c) Antibiotika

Užívání antibiotik má významný vliv na složení střevního mikrobiomu. Může vést k dysbióze, tedy k narušení složení a funkce střevní mikrobioty. Každá třída antibiotik má odlišné vlastnosti, což má za následek také různé vzorce změn složení mikrobiomu. Obecně změny závisí na třídě antibiotik, dávce a na době expozice. Existují také rozdíly související s farmakologickým působením antibiotik nebo s cílovými bakteriemi. Širokospektrální antibiotika mohou ovlivnit významné množství bakteriální komunity, což způsobuje rychlé a významné poklesy v taxonomické bohatosti, rozmanitosti a vyrovnanosti. Jakmile je léčba antibiotiky ukončena, střevní mikrobiota je schopna se vrátit ke složení podobnému před antibiotiky, jedná se však o dlouhodobý proces a počáteční stav před užíváním antibiotik se často zcela neobnoví. Některé taxony tak mohou být ztraceny trvale (Huse et al. 2008; Dethlefsen & Relman 2011; Iizumi et al. 2017). Mezi důsledky užívání antibiotik také patří například zvyšování antibiotické rezistence, zvýšení citlivosti k infekcím, ohrožení imunitní homeostáze či deregulace metabolismu (Francino 2016).

d) Probiotika

Probiotika cílená na střevní mikrobiom obsahují živé mikrobiální kmeny, které jsou schopné přetrvávat (nebo přechodně kolonizovat) lidské střevo a mají příznivý vliv na zdravotní stav hostitele (Bagchi 2014). Tento proces je zvláště důležitý v případě narušení běžné mikrobioty, tzv. dysbiózy, která je charakteristická změnou složení střevní mikrobioty, její sníženou diverzitou a stabilitou, a také zvýšenou hladinou prozánětlivých bakterií. Tento stav vede k vývoji chronických zánětlivých onemocnění, která se mohou rozvinout pouze lokálně ve střevě, ale i na systémové úrovni (Hiipala et al. 2018; Chang et al. 2019). Za tohoto stavu

mohou exogenně doplněné probiotické druhy dočasně kolonizovat střevní trakt a napomoci tak s obnovou komenzální mikrobioty (Bagchi 2014).

Mezi tradiční probiotické bakterie patří *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. či *Streptococcus* spp. (Lin et al. 2019). Mechanismy účinku jsou různorodé, jedná se například o kompetitivní vyloučení patogenů produkcí antimikrobiálních látek jako jsou organické kyseliny nebo bakteriociny, dále probiotika interagují se žlučovými kyselinami v lumen střeva a modifikují tak metabolismus žlučových kyselin a následně ovlivňují vstřebávání cholesterolu, produkují SCFA, zvyšují adhezi střevních buněk a produkci mucinu, nebo také mohou modulovat imunitní systém (Plaza-Diaz et al. 2019). Podávání tradičních probiotik necílí na konkrétní onemocnění, a proto se začínají objevovat probiotika nové generace (NPG). NPG obsahují další kmeny obsažené v lidské mikrobiotě, mohou být zaměřena na specifická onemocnění a procházejí přísnou kontrolou (Lin et al. 2019). Mezi takové bakteriální druhy lze zatím zařadit např. *Akkermansia muciniphila*, u které se uvádí, že zlepšuje amyotrofickou laterální sklerózu (Blacher et al. 2019), *Faecalibacterium prausnitzii*, *Parabacteroides goldsteinii* a řadu dalších (Lin et al. 2019).

4 Metodika

4.1 Dárci

Vzorky slin a stolice byly poskytnuty lidskými dárci ve věkovém rozmezí 18–50 let bez zjevných zdravotních obtíží. Každý účastník mikrobiologické analýzy byl požádán o vyplnění dotazníku, jehož součástí bylo i udělení informovaného souhlasu.

4.1.1 Odběr vzorků slin

Dárci byli informováni o způsobu odběru vzorku, tedy odebrání přibližně 3 mL slin ráno, před vyčištěním zubů, do sterilní zkumavky Eppendorf o objemu 5 mL. Bezprostředně po odběru byly vzorky dopraveny do laboratoře Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD), shromážděny při pokojové teplotě, a do tří hodin po odběru podrobeny mikrobiologickému rozboru deskovou metodou a izolaci celkové DNA.

4.1.2 Odběr vzorků stolice

Dárci byli informováni také o způsobu odběru vzorku stolice. Každému z dárců byla poskytnuta plastová lžička pro odebrání přibližně 1 gramu stolice do připravené zkumavky s 9 mL připraveného ředícího média s glycerolem a perlami pro následnou homogenizaci vzorku. Stolice nesměla přijít do kontaktu s vodou a byl požadován odběr vzorku ve stejný den jako odebrání vzorku slin. Po odběru byly vzorky dopraveny na KMVD a následně zamrazeny. Mikrobiologický rozbor deskovou metodou a izolace celkové DNA probíhala v jiné dny po rozmražení vzorků.

4.2 Příprava médií

Pro odběr vzorků stolice byly připraveny zkumavky s nutričně chudým médiem (Tabulka 1) s přidaným 86% glycerolem (VWR, USA) obsahující skleněné perly pro homogenizaci podle receptury uvedené v Tabulce 2. Pro samotné zpracování obou typů odebraných vzorků byly připraveny ředící řady podle Tabulky 1 a zkumavky pro izolaci kolonií a jejich následnou kultivaci ve Wilkins-Chalgren bujónu se sójovým peptonem podle Tabulky 3 a pro uchování získaných bakteriálních izolátů Bifipufr s glycerolem (Tabulka 4). Pro zajištění anaerobního prostředí ve všech tekutých médiích byla použita roll-tube metoda (Hungate & Macy 1973).

Tabulka 1: Složení ředící řady.

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 mL
Tryptone (Oxoid, UK)	5 g
Nutrient broth No. 2 (Oxoid)	5 g
Yeast extract (Oxoid)	2,5 g

Cystein (Sigma-Aldrich, USA)	0,25 g
Tween® 80 (Sigma-Aldrich)	0,5 mL

Tabulka 2: Složení ředícího média s glycerinem a perlami.

Látka	Množství
Ředící řada	270 mL
86% glycerin	104 mL
Skleněné perly	5 ks

Tabulka 3: Složení WSP média pro izolaci a kultivaci vybraných izolátů.

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 mL
Wilkins-Chalgren anaerobe broth (Oxoid)	33 g
Sójový pepton (Oxoid)	5 g
Cystein	0,5 g
Tween® 80	1 mL

Tabulka 4: Složení bifipufu s glycerolem.

Látka	Množství
Destilovaná voda	100 mL
86% glycerin	110 mL
Hydrogenfosforečnan draselný – K_2HPO_4	0,12 g
Dihydrogenfosforečnan draselný – KH_2PO_4	0,0333 g
Cystein	0,05 g
Tween® 80	1 mL

Dále bylo připraveno neselektivní médium Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem (WSP) pro stanovení celkového počtu anaerobních mikroorganismů podle Tabulky 5 a selektivní média pro stanovení vybraných skupin mikroorganismů WSP-MUP (Rada & Petr 2000), WSP-NORF (Vlková et al. 2015) a FNA (Walker et al. 1979; Nagaoka et al. 2017) podle Tabulky 6.

Tabulka 6: Složení média Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem.

Stanovované skupiny mikroorganismů	Médium	Látka	Množství na 100 mL dH ₂ O
Celkový počet anaerobních mikroorganismů	Wilkins-Chalgren agar	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	4,3 g
		Sójový pepton	0,5 g
	WSP	Cystein	0,05 g
		Tween® 80	0,1 mL

Tabulka 6: Složení selektivních médií pro růst vybraných skupin mikroorganismů.

Stanovované skupiny mikroorganismů	Médium	Látka	Množství na 100 mL dH ₂ O
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Wilkins-Chalgren agar obohacený o mupirocin a kyselinu octovou WSP-MUP	Wilkins-Chalgren agar	4,3 g
		Sójový pepton	0,5 g
		Cystein	0,05 g
		Tween® 80	0,1 mL
		Ledová kyselina octová (Sigma-Aldrich)	100 µL
		Mupirocin (Oxoid)	10 mg
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Wilkins-Chalgren agar obohacený o mupirocin, norfloxacin a kyselinu octovou WSP-NORF	Wilkins-Chalgren agar	4,3 g
		Sójový pepton	0,5 g
		Cystein	0,05 g
		Tween® 80	0,1 mL
		Roztok norfloxacinu (1 mg NORF/1 mL dH ₂ O/10 µL kyseliny octové)	10 mL
		Mupirocin (Oxoid)	10 mg
<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Fusobacterium nucleatum</i> agar FNA	Wilkins-Chalgren agar	4,3 g
		Cystein	0,05 g
		Tween® 80	0,1 mL
		Kyselina nalidixová (Sigma-Aldrich)	1 mg
		Vancomycin (Oxoid)	249,9 µg

4.3 Kultivační rozbor vzorků slin a stolice

Nejprve byla provedena homogenizace vzorku za využití vortexu. Po promíchání byl vzorek asepticky naředěn desítkovým ředěním do koncentrace 10⁻⁸.

Ředění pro rozbor ze vzorků slin bylo prováděno tak, že byl vždy asepticky odebrán 1 mL injekční stříkačkou ze vzorku či nižšího ředění, který byl poté převeden do 9 mL ředění vyššího, zatímco ředění vzorků stolice bylo prováděno tak, že bylo nejprve vypočteno množství vzorku stolice, které bylo potřeba převést do 2. ředění, poté byl již stejným způsobem jako u vzorku slin odebrán 1 mL injekční stříkačkou z 2. či nižšího ředění, který byl poté převeden do 9 mL ředění vyššího.

Pro samotný kultivační mikrobiologický rozbor byla použita desková metoda. Z připravené ředící řady byl inokulován 0,5 mL do každé z Petriho misek o průměru 35 mm a následně bylo provedeno zalití připravenými médii. Petriho misky byly opatrně promíchány třemi krouživými pohyby na jednu a následně druhou stranu, aby došlo k rovnoměrné distribuci inokula. Takto připravené a uzavřené Petriho misky byly uloženy do anaerostatu a kultivovány za anaerobních podmínek vytvořených pomocí Oxoid AnaeroGenu (Thermo Scientific, UK) při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin, které byly totožné pro všechny kultivačně stanovované skupiny mikroorganismů.

4.4 Extrakce DNA

4.4.1 Ze vzorků slin

Pro extrakci celkové mikrobiální DNA byl použit FastDNA™ SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Francie) a byly dodrženy instrukce výrobce. Do Lysing Matrix E tube bylo přeneseno 500 µL daného homogenizovaného vzorku slin a poté bylo přidáno 978 µL pufru fosforečnanu sodného a 122 µL MT pufru. Takto připravená směs byla homogenizována v přístroji FastPrep®-24 (MP Biomedicals) při nastavené rychlosti 5.0 m s⁻¹ po dobu 40 s ve dvou opakováních. Následovalo stočení centrifugou při 14 000 otáčkách po dobu 10 minut. Supernatant byl přenesen do čisté 2mL mikrozkušavky pro centrifugaci a bylo k němu přidáno 250 µL PPS (Protein precipitation solution, tedy roztok pro srážení proteinů). Zkušavka byla 10x přetočena víčkem dolů a zpět pro pomíchání. Dalším krokem byla centrifugace při 14 000 otáčkách po dobu 5 minut a získaný supernatant byl převeden do 15mL zkušavky, do níž byl předtím napipetován 1 mL Binding Matrix (vazebná matrice) suspenze. Zkušavka byla protřepávána rukou po dobu 2 minut, aby došlo k navázání DNA na matici, a poté byla ponechána 10 minut stát pro její usazení. Po uplynutí požadované doby bylo opatrně odebráno 800 µL supernatantu. Ve zbývajícím množství supernatantu byla resuspendována usazená Binding matrix (vazebná matrice) a poté bylo přeneseno 600 µL směsi na SPIN™ filtr. Směs byla stočena centrifugou při 14 000 otáčkách po dobu 1 minuty. Následně byla vyprázdněna záchytná část SPIN™ filtru. Tento celý krok byl opakován i pro zbývajícím množství suspenze. Stočená získaná peleta ve SPIN™ filtru poté byla opatrně resuspendována v 500 µL SEWS-M. Směs byla opět stočena centrifugou při 14 000 otáčkách po dobu 1 minuty a záchytná část SPIN™ filtru byla znovu vyprázdněna. Po tomto vyprázdnění již nebyla přidána žádná další látka, naopak došlo k dalšímu stočení centrifugou při 14 000 otáčkách po dobu 2 minut. Po stočení byla vyměněna záchytná část SPIN™ filtru za novou a ponechána 5 minut sušit za pokojové teploty. Poslední přidanou látkou bylo 100 µL DES (DNase/Pyrogen-Free water), ve kterém byla resuspendovaná vytvořená peleta. Směs byla stočena při 14 000 otáčkách po dobu 1 minuty. Takto získaná DNA byla zmrazena a uchována při teplotě -20 °C pro další analýzy.

4.4.2 Ze vzorků stolice

Postup pro extrakci celkové mikrobiální DNA ze vzorků stolice se od postupu pro extrakci DNA ze vzorků slin odlišuje přidáním odlišných kroků v úvodu postupu s cílem zohlednění odlišných navážek vzorků, a tedy jejich nutné normalizace. Nejprve bylo vypočteno množství vzorku stolice odpovídající 250 mg potřebných pro extrakci DNA. Následně bylo přeneseno požadované množství vzorku za aseptických podmínek do 15mL zkušavky pro centrifugaci. Dalším krokem byla centrifugace při 10 000 otáčkách po dobu 5 minut při teplotě 10 °C. Poté byl opatrně odebrán supernatant a peleta byla resuspendována v 978 µL pufru fosforečnanu sodného a 122 µL MT pufru a přenesena do Lysing Matrix E Tube. Další kroky nutné pro extrakci DNA ze vzorku stolice již byly dodrženy dle návodu shodně s postupem pro extrakci DNA ze vzorků slin.

4.5 Kvantifikace a izolace narostlých kolonií

Po uplynutí času nutného ke kultivaci byly ze selektivních médií (MUP, NORF a FNA) odebrány kolonie narostlých bakterií. Odběr probíhal za aseptických podmínek za pomoci jednorázové sterilní bakteriologické kličky. Odebrané kolonie byly přeneseny do připravených zkumavek s neselektivním WSP bujónem a anaerobním prostředím. Z každého média bylo odebráno 6 kolonií pro každý vzorek.

Pro správný odběr bylo potřeba vybírat kolonie izolované, aby nebylo nabráno více kolonií odlišných kmenů bakterií. Také se pro izoláty téhož vzorku vybíraly kolonie různých kultivačních charakteristik pro zajištění jejich variability. Kultivace odebraných izolátů probíhala po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C.

Po odebrání izolátů bylo spočítáno množství narostlých kolonií na všech médiích pro každou počítatelnou Petriho misku. Pro vyhodnocení byl ze získaných hodnot spočítán počet kolonií tvořících jednotku na gram (KTJ g⁻¹), případně mililitr (KTJ mL⁻¹) a dekadický logaritmus počtu kolonií tvořících jednotku na gram (log KTJ g⁻¹), příp. mililitr (log KTJ mL⁻¹).

4.6 Identifikace izolátů

Po 24 hodinách byla provedena kontrola nárůstů bakterií ve zkumavkách. Čistota dobře narostlých bakteriálních kultur byla zkontrolována za využití mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse E 200LED MV RS, Japonsko). Preparáty byly vytvořeny kápnutím narostlé kultury na podložní sklíčko a jejím překrytím krycím sklíčkem. Pro každý izolát byla popsána jeho morfologie. V případě kontaminace byly popsány různé morfologické charakteristiky a izolát byl vyřazen. U čistých kultur byla následně provedena identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátelem (MALDI-TOF MS) a na základě následné selekce byly vybrány izoláty, u nichž byla navíc izolována také bakteriální DNA, které byly uchovány do sbírky KMVD pro další analýzy.

4.6.1 MALDI-TOF MS

Postupu pro přípravu čistých kultur na identifikaci pomocí MALDI-TOF MS byl dodržen dle návodu výrobce (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo) a podle Modrackova et al. (2021) extrakcí etanolem a mravenčí kyselinou. Nejprve byl injekční stříkačkou ze zkumavky odebrán 1 mL čerstvě narostlé kultury, který byl přenesen do sterilní mikrozkušavky Eppendorf o objemu 2 mL. Obsah mikrozkušavky byl dále centrifugou stočen při 14 500 otáčkách po dobu 2 minut. Supernatant byl slit a usazená peleta na dně mikrozkušavky byla resuspendována v 500 µL 70% etanolu (VWR, USA). Takto vytvořený roztok byl znovu stočen na centrifuze při 14 500 otáčkách po dobu 2 minut a opět byly ponechány pouze pelety. Zbytkový etanol byl poté opatrně odpipetován tak, aby nebyla nabrána i usazená peleta na dně. Ta se poté nechala 10 minut sušit v otevřené mikrozkušavce při laboratorní teplotě pro odpaření etanolu, který se nepodařilo odpipetovat. Po vysušení byla peleta důkladně promíchána pipetováním v přidávaných 15 µL 70% kyseliny mravenčí (Honeywell Fluca™, USA), a poté bylo ještě přidáno a důkladně promícháno pipetou 15 µL 100% acetonitrilu

(Sigma Aldrich). Obsah zkumavky byl stočen centrifugou při 14 500 otáčkách po dobu 2 minut. Posledním krokem bylo nanesení 1 μL supernatantu na předem připravenou MALDI destičku. Každý vzorek byl na MALDI destičku nanesen ve dvou kopiích. Po zaschnutí byl na nanesený vzorek aplikován 1 μL MALDI matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxybenzoátová; Bruker, Německo) a poté byl každý spot změřen v přístroji pomocí programu Biotyper (Broker). Výsledky získané MALDI-TOF MS jsou interpretovány na základě Tabulky 7.

Tabulka 7: Rozmezí pro identifikovaná skóre při interpretaci MALDI-TOF MS výsledků.

Skóre	Popis úrovně identifikace	Barva
2,300–3,000	Vysoce pravděpodobná identifikace organismu na druhovou úroveň	zelená
2,000– 2,229	Spolehlivá identifikace organismu na rodovou úroveň, možná identifikace na úroveň druhu	zelená
1,700–1,999	Možná rodová identifikace organismu	žlutá
0,000–1,699	Nespolehlivá identifikace organismu	červená

4.7 Uchování izolátů a izolace jejich DNA

Na základě mikroskopie a výsledků MALDI-TOF MS byly vybrány úspěšně identifikované kmeny bakterií. Z každého vybraného izolátu byla také extrahovaná jeho DNA dle pokynů výrobce. Pelety, získané stočením 1 mL kultury při 14 500 otáčkách po dobu 2 minut, byly resuspendovány ve 100 μL PrepMan UltraTM (Applied Biosystems, USA). Vytvořená suspenze byla vložena do termostatu a zahřáta na 99 °C po dobu 10 minut. Po zchladnutí na pokojovou teplotu byla následně opět stočena za stejných podmínek. Supernatant byl poté odebrán do nové sterilní Eppendorf zkumavky a získaná izolovaná DNA byla následně uchována při –20 °C. Pro vytvoření cryokultur bylo do každé kryozkumavky přidáno 670 μL Bifipufu s glycerinem a z každého vybraného kmene odebráno 1 000 μL kultury do kryozkumavky ve čtyřech kopiích. Takto vytvořené vzorky byly uchovány při teplotě –20 °C.

4.8 Statistika

Kultivační počty stanovených skupin komenzálních bakterií v log KTJ mL⁻¹ ze vzorků slin a v log KTJ g⁻¹ ze vzorků stolice byly zobrazeny jako box-ploty. Normalita dat byla hodnocena pomocí Shapiro-Wilk testu ($\alpha=0,05$). Rozdíly v počtech bakterií na různých kultivačních médiích byly v závislosti na výsledku normality dat hodnoceny pomocí parametrického t-testu ($\alpha=0,05$) a neparametrického Mann-Whitney U testu ($\alpha=0,05$) za použití softwaru STATISTICA (StatSoft, Praha, Česká republika) a Microsoft Office Professional Plus 2016 (Redmont, WA, USA).

5 Výsledky

V rámci této diplomové práce bylo celkem analyzováno 60 vzorků, z nichž polovinu tvořily vzorky slin a druhou polovinu vzorky stolice. Byly získány od 30 dárců, kteří jsou vedeni jako kontrolní skupina pro budoucí porovnání se vzorky od onkologických pacientů v rámci vznikajícího výzkumného projektu s FN Královské Vinohrady. Vzhledem k tomu musela být dárci splněna určitá kritéria. Nejdůležitějším kritériem pro zařazení bylo, že dárcé neprodělal nebo v době odevzdání vzorků neprodělával nádorové onemocnění a byl bez zjevných zdravotních obtíží. Dárci také nesměli projít antibiotickou léčbou v posledních dvou měsících před odběrem vzorků a museli uvést řadu důležitých informací ohledně faktorů, které mohou mít vliv na bakteriální složení jak v dutině ústní, tak i ve střevě. Konkrétně bylo nutné uvést počet zubních kazů a výskyt parodontitidy, dále ve vztahu ke stravě udat potravinové alergie či intolerance, informovat o dodržování speciální diety nebo o konzumaci probiotik v posledních dvou měsících před odběrem vzorků. Také bylo nutné uvést krevní skupinu a Rh faktor.

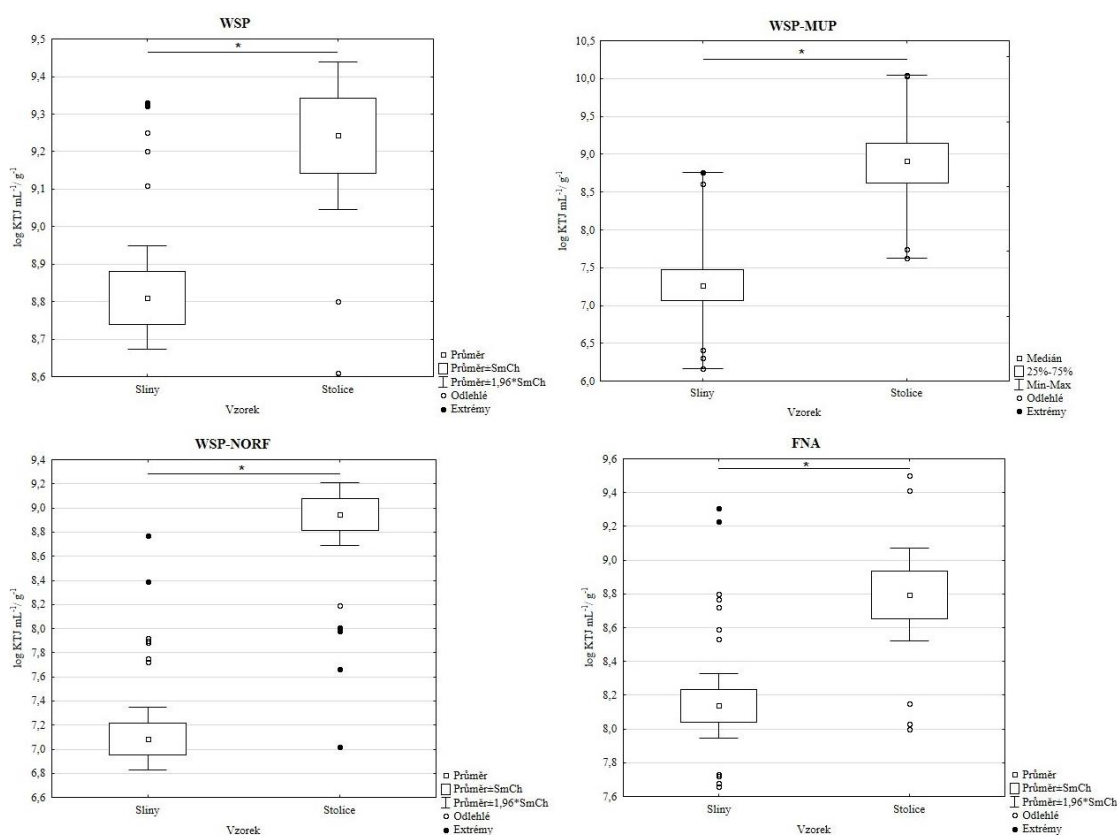
Na základě získaných dat uvedených v Tabulce 8 lze shrnout, že průměrný věk dárců byl $29,07 \pm 5,11$ let. Ženy tvořily 53,34 % dárců a byly průměrného věku $28,88 \text{ let} \pm 6,25$, zatímco muži tvořili 46,66 % dárců a byli průměrného věku $29,29 \pm 3,74$ let. 76,7 % dárců mělo maximálně 2 zubní kazy a 3 a více zubních kazů mělo zbývajících 23,3 % dárců. Z uvedeného počtu dárců mělo 26,7 % parodontitidu, 6,7 % laktózou intoleranci a 13,3 % dárců uvedlo potravinovou alergii (konkrétně byly uvedeny alergie na ořechy, dýňová semínka, mořské plody a houby). 16,7 % dárců konzumovala probiotika ve formě doplňků stravy nebo potravin s probiotickými kulturami (konkrétně byly uvedeny produkty NutraBona, Viridian Synerbio Daily nebo Actimel). V této kontrolní skupině byla nejvíce zastoupena krevní skupina A, a to u 43,33 %, dále potom v sestupném pořadí s 33,33 % krevní skupina B, 13,33 % krevní skupina 0 a 10 % krevní skupina AB. U dárců převládal pozitivní Rh faktor, který mělo 63,33 % zúčastněných a zbývajících 36,67 % mělo Rh faktor negativní.

Tabulka 8: Anonymizovaná data dárců. Pozn.: Ž – žena, M – muž, 2 m – 2 měsíce, ATB – antibiotika, 6 m – 6 měsíců, Viridian Syn. Daily – Viridian Synerbio daily.

Dárce	Věk	Pohlaví	Krevní skupina	Rh faktor	Probiotika (2 m)	ATB (6 m)	ATB (2 m)	Speciální dieta	Potr. alergie/intolerance	Zubní kazy	Parodontitida	Rakovina
1	38	Ž	0	-	NE	NE	NE	NE	Mořské plody, ořechy	0-2	ANO	NE
2	25	M	B	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	ANO	NE
3	25	Ž	A	-	NE	NE	NE	NE	Dýňová semínka	≥3	NE	NE
4	30	Ž	0	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
5	28	Ž	AB	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
6	38	Ž	B	-	Actimel	NE	NE	NE	Laktózová intolerance	≥3	ANO	NE
7	27	Ž	B	+	Actimel	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
8	30	M	0	+	NutraBona	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
9	30	M	A	-	Actimel	NE	NE	NE	Ořechy	0-2	ANO	NE
10	26	Ž	A	-	Viridian Syn. Daily	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
11	45	Ž	A	+	NE	NE	NE	NE	Zkřížená potraviny/pyl	0-2	ANO	NE
12	29	Ž	B	-	NE	ANO	NE	NE	Laktózová intolerance	0-2	NE	NE
13	31	M	A	-	NE	NE	NE	NE	NE	≥3	ANO	NE
14	28	M	AB	+	NE	NE	NE	NE	NE	≥3	ANO	NE
15	26	Ž	B	-	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
16	32	M	A	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
17	29	Ž	A	+	NE	NE	NE	NE	NE	≥3	NE	NE
18	28	M	B	-	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
19	22	Ž	A	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
20	26	Ž	A	-	NE	NE	NE	NE	NE	≥3	NE	NE
21	26	M	A	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
22	23	Ž	AB	+	NE	ANO	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
23	23	M	B	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
24	31	M	B	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
25	31	M	B	-	NE	ANO	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
26	26	Ž	A	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	ANO	NE
27	27	M	B	+	NE	NE	NE	NE	Houby	0-2	NE	NE
28	30	M	A	+	NE	NE	NE	NE	NE	≥3	NE	NE
29	38	M	0	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE
30	24	Ž	A	+	NE	NE	NE	NE	NE	0-2	NE	NE

5.1 Kvantifikace kultivovatelných komenzálních skupin bakterií

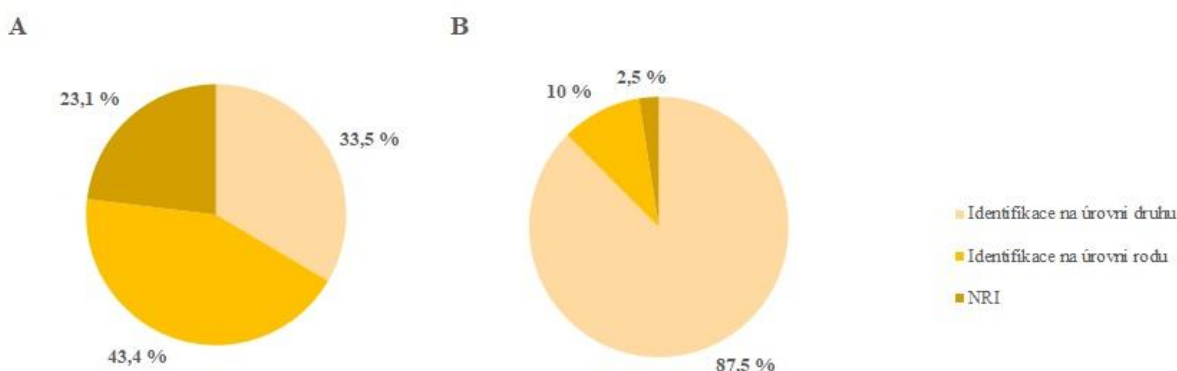
Pro kvantifikaci komenzálních skupin bakterií ve vzorcích slin a vzorcích stolice byla použita neselektivní a selektivní média. Kultivační počty se mezi vzorky slin a vzorky stolice lišily a byly prokázány statisticky významné rozdíly v jejich zastoupení s vyšší četností ve fekálních vzorcích v každé sledované skupině bakterií. Průměrné celkové počty anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií ve slinách byly $8,81 \pm 0,38 \log \text{KTJ mL}^{-1}$ a ve vzorcích stolice $9,24 \pm 0,55 \log \text{KTJ g}^{-1}$. Tyto hodnoty jsou vyšší než u ostatních stanovených skupin bakterií na selektivních médiích. Počty bakterií na médiu WSP-MUP, určeném pro stanovení *Bifidobacteriaceae*, dosáhly hodnot $7,29 \pm 0,55 \log \text{KTJ mL}^{-1}$ ve vzorcích slin oproti $8,92 \pm 0,58 \log \text{KTJ g}^{-1}$ ve vzorcích stolice. Stejně statisticky významný trend byl také detekován pro počty bakterií na médiu WSP-NORF, které taktéž slouží pro stanovení bifidobakterií. Zde byly počty ve vzorcích slin $7,09 \pm 0,73 \log \text{KTJ mL}^{-1}$ a ve vzorcích stolice $8,95 \pm 0,72 \log \text{KTJ g}^{-1}$. Na selektivním médiu FNA, které bylo použito pro detekci fusobakterií byl ve slinách stanoven průměrný počet $8,14 \pm 0,54 \log \text{KTJ mL}^{-1}$ a ve vzorcích stolice $8,80 \pm 0,77 \log \text{KTJ g}^{-1}$. Toto médium však nebylo zcela selektivní a umožňovalo nárůst i dalších bakteriálních rodů, proto jsou tyto průměrné počty vyšší a stanovené hodnoty leží mezi celkovým počtem anaerobních bakterií a stanovovanými bifidobakteriemi. Průměrné počty stanovených skupin komenzálních bakterií jsou znázorněny jako boxplots na Obrázku 14. Tabulka, ve které jsou uvedeny stanovené sledované počty pro každého dárce je uvedena v příloze 1.



Obrázek 14: Kvantifikace kultivovatelných komenzálních skupin bakterií ve vzorcích slin ($\log \text{KTJ mL}^{-1}$) a ve vzorcích stolice ($\log \text{KTJ g}^{-1}$) na neselektivním WSP médiu a na selektivních médiích WSP-MUP, WSP-NORF a FNA. Hvězdičky (*) označují statisticky významné rozdíly stanovené t-testem a Mann-Whitney U testem ($\alpha=0,05$).

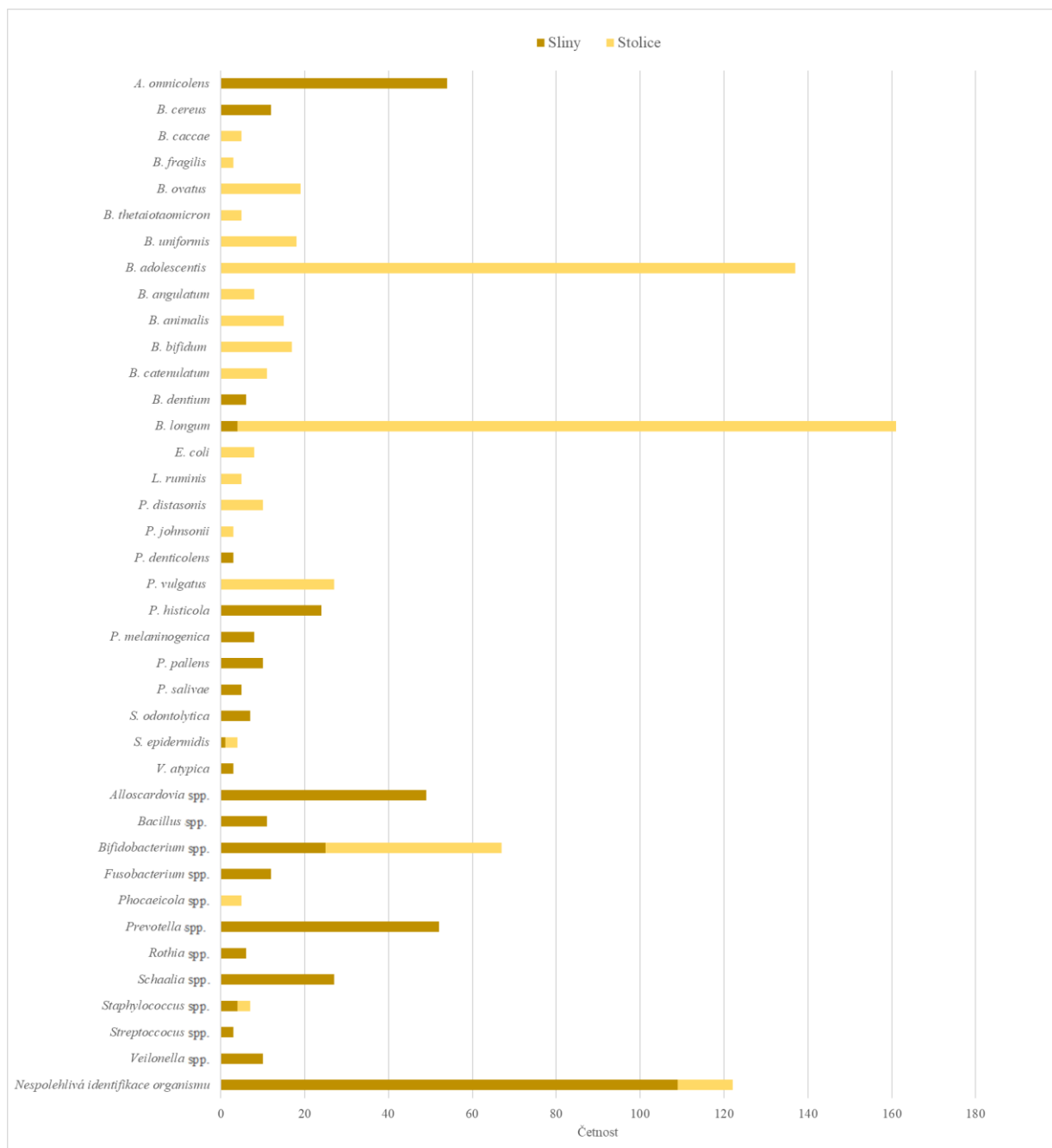
5.2 Identifikace pomocí MALDI-TOF MS

Ze selektivních médií byly na základě variability kultivačních znaků odebrány izoláty kolonií, které byly dále identifikovány za využití MALDI-TOF MS. Z každého selektivního média bylo odebráno 6 kolonií z každého vzorku, celkem tedy 18 izolátů kolonií ze vzorku slin a 18 izolátů ze vzorku stolice od každého dárce. Po započtení všech dárců bylo celkem analyzováno 540 izolátů kolonií ze vzorků slin a 540 izolátů kolonií ze vzorků stolice. Úspěšnost identifikace izolátů na základě použití MALDI-TOF MS je znázorněna na Obrázku 15. Z celkového množství izolátů ze vzorků slin bylo úspěšně zidentifikováno 363 bakteriálních kultur (76,9 %) se zaručenou identifikací rodu i druhu. Na úroveň druhu s vysokou mírou jistoty bylo zidentifikováno 158 izolátů (33,5 %) a na úroveň rodu bylo zidentifikováno 205 získaných izolátů (43,4 %). U 109 izolátů (23,1 %) nebylo možné provést identifikaci, jelikož se dle skóre jednalo o nespolehlivou identifikaci organismu. Oproti tomu z celkového množství izolátů ze vzorků stolice bylo úspěšně zidentifikováno se zaručenou identifikací rodu i druhu 515 získaných izolátů (97,5 %). Na úroveň druhu s vysokou mírou jistoty bylo zidentifikováno 462 izolátů (87,5 %) a na úroveň rodu bylo zidentifikováno 53 izolátů (10 %). Identifikaci nebylo možné provést u 13 izolátů (2,5 %) ze vzorků stolice. Úspěšnost identifikace byla tedy výrazně vyšší u izolátů odebraných ze vzorků stolice v porovnání s izoláty odebranými ze vzorků slin. Při izolaci bakteriálních kolonií pro kultivaci a následnou identifikaci byl zřetelný značný rozdíl v jejich kultivačních znacích u vzorků stolice, u kterých byly kolonie výrazně větší a izolovanější, zatímco kolonie ze vzorků slin byly velmi drobné a malé.



Obrázek 15: Podíl druhové, rodové a nespolehlivé identifikace (NRI) izolátů ze vzorků slin (A) a ze vzorků stolice (B). Brukerova kritéria (skóre) pro přiřazení: 0,000–1,699 nespolehlivá identifikace organismu, 1,700–1,999 pravděpodobná rodová identifikace organismu, 2,000–3,000 identifikace organismu na úroveň rodu a druhu.

Při srovnání zidentifikovaných bakteriálních kultur (Obrázek 16) získaných ze vzorků slin a ze vzorků stolice byly zjištěny značné rozdíly v bakteriálním složení. Na základě výsledků identifikace na úroveň rodu lze přítomné bakteriální rody rozlišit na typické pro dutinu ústní, typické pro střevo, a potom rody, které nalezneme v obou sledovaných prostředích gastrointestinálního traktu.



Obrázek 16: MALDI-TOF MS identifikace 540 izolátů ze vzorků slin a 540 izolátů ze vzorků stolice. V rámci grafu jsou vizualizované rody, které byly zastoupeny v četnosti 3 a více.

Dominantní rody detekované pouze v dutině ústní v sestupném pořadí dle procentuálního počtu rodové identifikace organismu jsou *Prevotella* (9,63 %), *Alloscardovia* (9,07 %), *Schaalia* (5 %), *Fusobacterium* (2,22 %), *Bacillus* (2,04 %), *Veillonella* (1,85 %), *Rothia* (1,11 %) a *Streptococcus* (0,56 %). Je zajímavé, že v porovnání se střevem není žádný rod zcela dominantní a relativní četnost jednotlivých rodů je značně variabilní. Lze tedy očekávat, že relativní zastoupení různých bakteriálních rodů v dutině ústní je u jednotlivců velmi proměnlivé. Dalšími detekovanými rody s velmi nízkou četností byly *Leptotrichia* (0,19 %), *Pseudoleptotrichia* (0,19 %), *Paraclostridium* (0,19 %), *Cutibacterium* (0,37 %) a *Clavispora* (0,19 %).

Nyní budou uvedeny druhy, které byly detekovány pouze ve vzorcích slin. Z rodu *Alloscardovia* byl identifikován pouze jeden druh *A. omnicoles*, který byl ve vzorcích slin zastoupen v nejvyšší četnosti (10 %). Vyšší druhová variabilita byla detekována v rámci rodu *Prevotella*. Bylo identifikováno šest druhů, konkrétně *P. histicola* (4,4 %), *P. pallens* (1,85 %), *P. melaninogenica* (1,48 %), *P. salivae* (0,93 %), *P. denticola* (0,37 %) a *P. naceinsis* (0,19 %). Z rodů *Schaalia* a *Rothia* byly detekovány pouze druhy *S. odontolytica* (1,30 %) a *R. mucilaginoso* (0,37 %). V rámci rodu *Fusobacterium* byl identifikován pouze jeden druh *F. nucleatum* (0,19 %). Z rodu *Veillonella* byly detekovány druhy *V. atypica* (0,56 %) a *V. rogosae* (0,19 %). Z rodu *Streptococcus* byly identifikovány tři druhy, *S. intermedius* (0,56 %), *S. constellatus* (0,56 %) a *S. anginosus* (0,19 %). Další bakteriální druhy, které byly detekovány ve velmi nízkých četnostech jsou *Pseudoleptotrichia goodgellowii* (0,19 %), *Parascardovia denticolens* (0,56 %), *Lactobacillus sakei* (0,19 %), *Granulicatella adiacens* (0,19 %), *Enterococcus galinarum* (0,37 %), *Cutibacterium acnes* (0,37 %), *Bacillus cereus* (2,22 %) a *Actinomyces oris* (0,19 %).

Nyní se zaměříme na rody *Bifidobacterium* spp. a *Staphylococcus* spp, které byly nalezeny v obou částech gastrointestinálního traktu. V rámci rodu *Bifidobacterium* byl nejvíce zastoupeným bakteriálním druhem ve vzorcích slin *B. dentium* (1,11 %), následovaný *B. longum* (0,74 %). Rozdíl v četnosti těchto druhů nebyl velký a je nutné uvést, že 25 bifidobakteriálních izolátů (4,63 %) bylo zidentifikováno pouze na úroveň rodu, tedy nelze jednoznačně říct, který bifidobakteriální druh ve vzorcích slin, a tedy v prostředí dutiny ústní dominuje. Naopak vyšší druhová variabilita bifidobakterií byla detekována u vzorků stolice. Nejvíce zastoupenými druhy ve fekálních vzorcích byly *B. longum* (29,07 %) a *B. adolescentis* (25,37 %). Další detekované druhy bifidobakterií byly zastoupeny v nižším množství, konkrétně *B. bifidum* (3,15 %), *B. animalis* (2,78 %), *B. catenulatum* (2,04 %), *B. angulatum* (1,48 %) a *B. pseudocatenulatum* (0,37 %). Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že rod *Bifidobacterium* je dominantním komenzálním rodem ve střevě člověka, a také, že v rámci tohoto rodu existují druhy typické pro dutinu ústní, typické pro střevo, a potom druhy, které lze nalézt v obou prostředích. Konkrétně druh *B. dentium* byl detekován pouze v dutině ústní. Naopak výskyt *B. longum* byl zjištěn v obou částech gastrointestinálního traktu, ale s významně vyšší četností ve střevě a ostatní popsané druhy byly zachyceny pouze ve střevě člověka. V rámci rodu *Staphylococcus* byly detekovány celkem dva bakteriální druhy, konkrétně *S. epidermidis*, který byl zjištěn jak ve vzorcích slin (0,19 %), tak ve vzorcích stolice (0,56 %) a *S. aureus* (0,19 %) detekovaný pouze ve vzorcích slin.

Typickými rody identifikovanými pouze ve střevě byly *Bacteroides* (0,37 %), *Parabacteroides* (0,19 %), a *Phocaeicola* (0,93 %). V rámci rodu *Bacteroides* bylo identifikováno osm bakteriálních druhů, konkrétně sestupně dle četnosti *B. ovatus* (3,5 %), *B. uniformis* (3,33 %), *B. cacae* (0,93 %), *B. thetaiotaomicron* (0,93 %), *B. fragilis* (0,56 %), *B. eggerthii* (0,37 %), *B. cellulosilyticus* (0,19 %) a *B. stercoris* (0,19 %). V rámci rodu *Phocaeicola* byly detekovány 2 druhy, *P. vulgatus* (5 %) a *P. massilliensis* (0,37 %). Z rodu *Parabacteroides* byly identifikovány 3 druhy, *P. distasonis* (1,85 %), *P. johnsonii* (0,56 %) a *P. merdae* (0,37 %). Mezi další detekované bakteriální druhy lze uvést *Ligilactobacillus ruminis* (0,93 %), *E. coli* (1,48 %) a *Enterococcus faecium* (0,19 %).

Na základě získaných dat lze shrnout, že diverzita kultivovatelných komenzálních bakterií v dutině ústní je v porovnání se střevem vyšší. Bakterie z čeledi *Bifidobacteriaceae*

byly zastoupeny v obou typech vzorků, ale jejich četnost a variabilita byla výrazně vyšší ve střevě ve srovnání s dutinou ústní. V rámci této čeledi byly v dutině ústní přítomny rody *Alloscardovia*, *Bifidobacterium* a *Parascardovia*, naopak ve střevě byl přítomen pouze rod *Bifidobacterium*. Pro každé ze sledovaných prostředí byly detekovány jiné specifické rody a druhy těchto bakterií.

5.3 Uchování vybraných izolátů do sbírky KMVD

Pro uchování vybraných bakteriálních kultur do sbírky KMVD byly vybrány izoláty na základě identifikace pomocí MALDI-TOF MS, jedinečnosti a morfologické variability viditelné při kontrole čistoty za využití mikroskopu s fázovým kontrastem. Tímto způsobem byla vytvořena kontrolní skupina bakteriálních izolátů získaných ze slin a ze vzorků stolice od dárců bez zjevných zdravotních obtíží.

Z celkového množství 540 izolátů ze vzorků slin bylo pro uložení vyselektováno 174 bakteriálních kmenů (32,22 %) od různých dárců. 39,08 % izolátů bylo identifikováno na úroveň druhu s vysokou mírou jistoty, 51,72 % bylo identifikováno na úroveň rodu a 9,20 % uchovaných izolátů je s nespolehlivou identifikací organismu. Průměrný počet uchovaných izolátů na jednoho dárce je $5,8 \pm 2,71$. Uchované izoláty identifikované na úroveň rodů jsou rody *Alloscardovia* (9,77 %), *Prevotella* (9,20 %), *Schaalia* (9,20 %), *Bifidobacterium* (8,62 %), *Fusobacterium* (6,90 %), *Rothia* (3,45 %), *Veillonella* (2,30 %), *Clavispora* (0,57 %), *Paraclostridium* (0,57 %) a *Pseudoleptotrichia* (0,57 %). Na úrovni druhu bylo uloženo 16 bakteriálních druhů, konkrétně *A. omnicoles* (17,82 %), *B. dentium* (4,02 %), *S. odontolytica* (2,87 %), *P. salivae* (2,30 %), *P. denticolens* (1,72 %), *P. histicola* (1,72 %), *P. melaninogenica* (1,72 %), *B. longum* (1,15 %), *P. denticola* (1,15 %), *R. mucilaginoso* (1,15 %), *F. nucleatum* (0,57 %), *G. adiacens* (0,57 %), *L. sakei* (0,57 %), *P. naceinsis* (0,57 %), *P. pallens* (0,57 %) a *V. atypica* (0,57 %).

Z celkového množství 540 izolátů ze vzorků stolice bylo pro uložení vyselektováno 187 bakteriálních kmenů (34,63 %) od různých dárců. 95,19 % izolátů bylo identifikováno na úroveň druhu s vysokou mírou jistoty a 4,81 % bylo indentifikováno na úroveň rodu. Celkem bylo tedy uloženo 20 bakteriálních druhů, konkrétně *B. longum* (27,81 %), *B. adolescentis* (21,93 %), *B. uniformis* (6,95 %), *B. ovatus* (5,88 %), *B. bifidum* (5,88 %), *P. vulgatus* (4,81 %), *B. animalis* (3,21 %), *B. catenulatum* (3,21 %), *B. thetaiotaomicron* (2,14 %), *B. cacae* (1,60 %), *B. angulatum* (1,60 %), *L. ruminis* (1,60 %), *P. distasonis* (1,60 %), *B. eggerthii* (1,07 %), *B. fragilis* (1,07 %), *B. pseudocatenulatum* (1,07 %), *E. coli* (1,07 %), *P. johnsonii* (1,07 %), *P. merdae* (1,07 %) a *Phocaeicola masilliensis* (0,53 %). 3,74 % vyselektovaných izolátů bylo identifikováno na úroveň rodu *Bifidobacterium* a 1,07 % na úroveň rodu *Phocaeicola*. Průměrný počet uchovaných izolátů na jednoho dárce ze vzorků stolice je $6,23 \pm 1,65$.

Tabulka, ve které jsou uvedeny uložené izoláty s dalšími doplňujícími informací je součástí přílohy 2. Ve sbírce KMVD je také DNA uchovaných izolátů a celková DNA všech vzorků slin a stolice pro budoucí molekulárně-genetické analýzy.

6 Diskuze

V této práci byla pro prevalenci bakterií z čeledi *Bifidobacteriaceae* a dalších bakteriálních komenzálů přítomných ve vzorcích slin a vzorcích stolice získaných od lidí bez zjevných zdravotních obtíží průměrného věku $29,07 \pm 5,11$ let použita kultivace s následnou identifikací odebraných bakteriálních izolátů metodou MALDI-TOF MS. Množství *Bifidobacteriaceae* ve vzorcích slin se pohybovalo mezi 10^5 a 10^8 KTJ mL⁻¹ s průměrnými počty 10^7 KTJ mL⁻¹, oproti tomu ve vzorcích stolice se množství pohybovalo mezi 10^7 a 10^9 KTJ g⁻¹ s průměrnými počty 10^8 KTJ g⁻¹ v obou sledovaných selektivních médiích. Jejich zastoupení tedy bylo ve vzorcích stolice signifikantně vyšší. Ve studii, kde byly srovnávány vzorky slin u dětí s celiakií a zdravých kontrol byl u kontrolní skupiny zjištěn průměrný počet bakterií rodu *Bifidobacterium* 10^7 KTJ mL⁻¹ (Francavilla et al. 2014). Vzhledem k tomu, že se jednalo pouze o bifidobakterie, byl počet *Bifidobacteriaceae* ve vzorcích slin oproti našim výsledkům pravděpodobně ve vyšších řádech, nicméně vzhledem k rozsahu hodnot, které byly detekovány u různých dárců se výsledky tolik neodlišovaly. Jiná studie, která srovnávala počty bifidobakterií u dětí bez zubního kazu se dvěma skupinami s různou závažností zubních kazů uvádí průměrné množství bifidobakterií u zdravých kontrol 10^6 KTJ mL⁻¹, tedy hodnoty srovnatelné s našimi výsledky. Je také zajímavé, že průměrný počet bifidobakterií u skupin se zubními kazy pozitivně koreloval se závažností zubního kazu (Nair et al. 2017). Toto zjištění je podpořeno také dalšími studii (Mantzourani et al. 2009a; Neves et al. 2018; Chen et al. 2023). Ve studii, kde byly naopak analyzovány vzorky stolice 441 dobrovolných zdravých dárců bylo zjištěno průměrně množství *B. longum* 10^8 KTJ g⁻¹ (Kato et al. 2017). Zde se jednalo o průměrné množství pro konkrétní druh v rámci rodu *Bifidobacterium* a lze tedy předpokládat, že v této studii byly celkové průměrné hodnoty pro *Bifidobacteriaceae* ve srovnání s našimi výsledky ve vyšších řádech. Jiná studie, ve které byly analyzovány vzorky stolice od lidí, kteří dodržují laktovegetariánskou stravu a od lidí s konvenční stravou, je v souladu s tímto předpokladem. Bifidobakterie byly detekovány ve vzorcích stolice v průměrném počtu 10^9 KTJ g⁻¹ v obou sledovaných skupinách (Bunešová et al. 2017), tedy lze také předpokládat vyšší zastoupení *Bifidobacteriaceae* oproti našim výsledkům. Nicméně námi detekovaný trend vyššího zastoupení bifidobakterií ve stolici ve srovnání se slinami koresponduje s ostatními uvedenými studii.

Množství bakterií rodu *Fusobacterium* bylo ve vzorcích slin i ve vzorcích stolice průměrně 10^8 KTJ mL⁻¹ a 10^8 KTJ g⁻¹, tedy v obou typech vzorků ve stejném řádu. Hodnoty fusobakterií se u vzorků slin pohybovaly mezi 10^7 a 10^9 KTJ mL⁻¹ a ve vzorcích stolice bylo rozpětí větší, byly detekovány hladiny mezi 10^6 a 10^{10} KTJ g⁻¹. Toto médium ale umožňovalo nárůst také dalších bakteriálních rodů mimo *Fusobacterium*, konkrétně např. u vzorků slin byly na tomto typu média identifikovány rody *Bacillus*, *Enterococcus*, *Granulicatella*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Pseudoleptotrichia*, *Rothia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Veillonella*, ve vzorcích stolice potom rody *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Phocaeicola*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Ligilactobacillus*, ale také *Bifidobacterium*. Proto lze předpokládat, že použité selektivní médium nebylo pro stanovení reálných počtů fusobakterií dostatečně selektivní a pravděpodobně by dosahovaly nižších hladin než získané hodnoty.

Zjištěné rozdíly v průměrné prevalenci sledovaných bakterií v dutině ústní a střevě mohou být pravděpodobně způsobeny odlišnými podmínkami pro růst bakterií v těchto dvou

prostředích gastrointestinálního traktu. Typicky dutina ústní ve srovnání se střevem nabývá odlišných hodnot oxidačně-redukčního potenciálu, který je v dutině ústní významně vyšší (Venkatesh & Ramadass 2023), a lze tedy předpokládat vyšší zastoupení anaerobních bakterií ve střevě. Naopak, jak již bylo zmíněno, v některých případech mohou být v dutině ústní zjištěny i významně vyšší hladiny *Bifidobacteriaceae*. Některé druhy bifidobakterií jsou totiž značně aerotolerantní a mohou i v podmínkách dutiny ústní prosperovat (Zomer et al. 2009; Bottacini et al. 2014). Jejich přítomnost nicméně může být spojována i s rozvojem některých infekčních onemocnění a přechodem mikrobioty do dysbiotického stavu, například v souvislosti se zubními kazy (Mantzourani et al. 2009a; Neves et al. 2018; Chen et al. 2023).

Na základě výsledků identifikace 540 izolátů ze vzorků slin a 540 izolátů ze vzorků stolice metodou MALDI-TOF MS můžeme diskutovat specifické zástupce pro sledovaná prostředí gastrointestinálního traktu. V rámci čeledi *Bifidobacteriaceae* byly v dutině ústní detekované rody *Alloscardovia*, *Bifidobacterium* a *Parascardovia*, naopak ve střevě byl přítomen pouze rod *Bifidobacterium*. Stejně rody byly v dutině ústní nalezeny také ve studii Beighton et al. (2008). Na úrovni druhu byly v rámci prvních dvou zmíněných rodů přítomny *A. omnicoles* a *P. denticolens*, které byly identifikované také ve studii (Beighton et al. 2008), naopak nebyla nalezena žádná studie, která by popisovala detekci těchto zástupců ve vzorcích stolice, a lze je tedy pravděpodobně považovat za druhy typické pro dutinu ústní. V rámci rodu *Bifidobacterium* byly v dutině ústní detekované *B. dentium* a *B. longum*. Mezi další bifidobakterie, které se běžně vyskytují v dutině ústní, ale v této diplomové práci nebyly detekovány, patří například *B. animalis*, *B. breve*, *B. scardovii* a *B. subtile* (Mantzourani et al. 2010; Henne et al. 2015). Nicméně za převládající druh bifidobakterie v dutině ústní je považován právě druh *B. dentium* (Munson et al. 2004). Je zajímavé, že detekce druhu *B. longum* v dutině ústní je také poměrně častá (Mantzourani et al. 2009b). Významně vyšší druhová variabilita bifidobakterií v rámci této diplomové práce byla nicméně detekována u vzorků stolice. V tomto typu vzorků byly identifikovány i druhy *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum* a *B. pseudocatenulatum*. Tyto druhy byly ve vzorcích stolice nalezeny také v dalších studiích (Mangin et al. 2012; Ladeira et al. 2023). Druhy *B. longum*, *B. adolescentis* a *B. catenulatum* bývají nejčastěji detekovanými druhy u dospělých (Ishikawa et al. 2013). Přestože v našich sledovaných vzorcích stolice nebyl detekován *B. dentium*, jedná se o druh, který lze nalézt jako běžnou součást střevní mikrobioty (Turroni et al. 2012; Ladeira et al. 2023). Na základě získaných výsledků a popsání zjištění dalších studií lze předpokládat, že signifikantními druhy v rámci rodu *Bifidobacterium* pro dutinu ústní jsou *B. dentium* a *B. longum*, naopak pro střevo jsou to zejména druhy *B. longum*, *B. adolescentis* a *B. catenulatum*.

Další rody detekované v rámci této práce pouze v dutině ústní byly *Prevotella*, *Schaalia*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Rothia* a *Streptococcus*. Nicméně na základě různých zdrojů lze uvést, že rody *Prevotella* (Arumugam et al. 2011), *Fusobacterium* (Suehiro et al. 2017), *Veillonella* (Scheiman et al. 2019) a *Streptococcus* (Sayols-Baixeras et al. 2023) byly nalezeny také ve vzorcích stolice zdravých lidí. Lze tedy předpokládat, že selektivita kultivačních médií je také ovlivněna typem vzorku, diverzitou přítomných bakteriálních taxonů a jejich dominancí (Pédrón et al. 2020; Wei et al. 2021). *Prevotella* spp. je běžnou součástí střevní mikrobioty a její výskyt je spojen zejména se stravou s vysokým obsahem sacharidů a jednoduchých cukrů, konkrétně se shodně pojmenovaným enterotypem (Wu et al. 2011). Je zajímavé, že v souvislosti

s rodem *Fusobacterium* ve vzorcích stolice byly detekovány významně vyšší hladiny u skupin s nádorovým onemocněním oproti zdravým kontrolám (Suehiro et al. 2017; Tunsjø et al. 2019). V souvislosti s výskytem zástupců rodu *Veillonella* ve stolici, je diskutována také hypotéza, že tento rod může zvyšovat metabolismus a výkonnost svalových buněk díky své schopnosti metabolizovat laktát vytvořený během intenzivního tréninku na SCFA (Scheiman et al. 2019). Zvýšený výskyt *Streptococcus* spp. ve vzorcích stolice byl poté popsán v možném spojení s koronární aterosklerózou a systémovým zánětem (Sayols-Baixeras et al. 2023).

V dutině ústní byla také detekována řada bakteriálních druhů, které nejsou považovány za druhy spojené s tímto prostředím a jejich přítomnost tedy byla neočekávaná. Konkrétně *L. sakei*, *E. galinarum*, *C. acnes*, *B. cereus*. Výskyt těchto druhů je možné spojit s různými důvody. Jejich zdrojem může být okolní prostředí, včetně jiných lokalit hostitele, konkrétně *B. cereus* se běžně vyskytuje v půdě a na povrchu potravin. Je to ale také jeden z hlavních bakteriálních patogenů, který může způsobit alimentární onemocnění (Chen et al. 2022). *C. acnes* je poté bakterie způsobující akné, a může být tedy přítomná jako běžná součást kožní mikrobioty (Huang et al. 2023a). Dalším důvodem výskytu některých zástupců mohlo být například probíhající onemocnění, o kterém hostitel v době odběru vzorků nevěděl. *E. galinarum* je běžnou součástí střevní mikrobioty, ale zároveň se jedná o oportunní patogen, který může vést k rozvoji řady infekcí (Younus et al. 2021).

Na základě získaných výsledků lze shrnout, že kultivace s následnou identifikací MALDI-TOF MS se ukázaly být vhodnými metodami pro monitoring komenzálních anaerobních bakterií v dutině ústní a střevě člověka. Přestože lze v současné době využít moderní mikrobiomové analýzy, má kultivační metoda stále svou nezastupitelnou roli, protože umožňuje izolaci čistého kmene, který může být poté přesně identifikován a dále charakterizován, a to moderní analýzy stále dokonale neumožňují. Mezi hlavní výhody metody MALDI-TOF MS, která byla využita pro identifikaci získaných izolátů, patří její jednoduchost, velmi vysoká citlivost, přesnost a rychlost (Akimowicz & Bucka-Kolendo 2020). V této diplomové práci bylo touto metodou z celkového množství 1080 izolátů úspěšně identifikováno 57,9 % izolátů ze vzorků slin a 97,5 % izolátů ze vzorků stolice. Vyšší neúspěšná identifikace izolátů ze vzorků slin mohla být způsobena chybějícími spektry v databázi nebo také možnostmi technických chyb (Ciešlik & Wroblewska 2019). I přes své limity se ale MALDI-TOF MS v kombinaci s mikroskopickou technikou v této práci osvědčila jako spolehlivý nástroj pro identifikaci komenzálních bakterií v dutině ústní a střevě člověka. To potvrzují i dřívější výsledky Modrackova et al. (2021). Nicméně pro přesnější identifikace by bylo vhodné dále začlenit ještě další metody, konkrétně například sekvenace genu 16S rRNA (Srinivasan et al. 2015) či celogenomové sekvenování (Kwong et al. 2015).

Posledním výstupem této práce bylo také uložení vybraných 174 bakteriálních izolátů ze vzorků slin a 187 izolátů ze vzorků stolice, včetně jejich DNA, a také celkové DNA všech vzorků slin a stolice, ve sbírce Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (ČZU v Praze).

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit literární rešerši na základě aktuálních vědeckých poznatků o komenzální mikrobiotě trávicího traktu člověka, zejména se zaměřením na dutinu ústní a střevo. Dále bylo cílem kultivační stanovení počtu bakterií z čeledi *Bifidobacteriaceae* a dalších bakteriálních komenzálů přítomných ve vzorcích slin a stolice získaných od lidí bez zjevných zdravotních obtíží. Cílem byla také izolace a následná identifikace detekovaných bakterií, jejich selekce, izolace DNA a následné uložení do sbírky bakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky. Všechny cíle diplomové práce byly splněny.

Hypotézou byl předpoklad, že v dutině ústní i ve střevě člověka bez zdravotních obtíží budou přítomny komenzální bakterie z čeledi *Bifidobacteriaceae*, jejichž zastoupení bude vyšší ve střevě. Zároveň jsme předpokládali, že pro každé prostředí budou specifické jiné rody a druhy těchto bakterií. Bakterie z čeledi *Bifidobacteriaceae* byly zastoupeny v obou typech vzorků, ale jejich četnost byla výrazně vyšší ve střevě ve srovnání s dutinou ústní. V rámci této čeledi byly v dutině ústní přítomny rody *Alloscardovia*, *Bifidobacterium* a *Parascardovia*, naopak ve střevě byl přítomen pouze rod *Bifidobacterium*. Mimo již zmíněné, byly ve slinách nalezeny také rody *Prevotella*, *Schaalia*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Rothia* a *Streptococcus*. Naopak ve střevě byly detekovány rody *Bacteroides*, *Parabacteroides* a *Phocaeicola*. V obou částech gastrointestinálního traktu byly detekovány rody *Bifidobacterium* a *Staphylococcus*. V rámci rodu *Bifidobacterium* byly identifikovány druhy typické pro dutinu ústní, typické pro střevo, a potom druhy, které lze nalézt v obou prostředích. Konkrétně druh *B. dentium* byl detekován pouze v dutině ústní, výskyt *B. longum* byl zjištěn v obou částech gastrointestinálního traktu, ale s významně vyšší četností ve střevě a všechny ostatní popsané druhy byly zachyceny pouze ve střevě člověka. Pro každé ze sledovaných prostředí byly detekovány jiné specifické rody a druhy těchto bakterií. Hypotézy tedy byly výsledky potvrzeny.

Celkem bylo identifikováno 540 izolátů ze vzorků slin a 540 izolátů ze vzorků stolice od 30 dárců bez zjevných zdravotních obtíží. Z celkového množství izolátů ze vzorků slin bylo úspěšně identifikováno 33,5 % izolátů na úroveň druhu a 33,5 % na úroveň rodu. Identifikace izolátů získaných ze vzorků stolice byla úspěšnější, 87,5 % bylo zidentifikováno na úroveň druhu a 10 % na úroveň rodu. Z tohoto množství bylo na základě identifikace, jedinečnosti a morfologické variability vyselektováno 174 izolátů (32,22 %) ze vzorků slin a 187 izolátů (34,63 %) ze vzorků stolice. Tyto izoláty byly uchovány jako kontrolní skupina bakteriálních izolátů, které budou v budoucnu použity pro srovnání s onkologickými pacienty vedenými ve FN Královské Vinohrady v rámci vznikajícího výzkumného projektu. Součástí sbírky je také DNA uchovaných izolátů a celková DNA všech vzorků slin a stolice pro plánované molekulárně-genetické analýzy.

8 Literatura

- Aagaard K, Ma J, Anthony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine* **6**:237ra65.
- Adler CJ, et al. 2013. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics*. **45**:450–455.
- Adlerberth I, Wold AE. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica* **98**:229–238.
- Ahearn-Ford S, Berrington JE, Steward CJ. 2022. Development of the gut microbiome in early life. *Experimental Physiology* **107**:415–421.
- El Aidy S, Van Den Bogert B, Kleerebezem M. 2015. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current Opinion in Biotechnology* **32**:14–20.
- Akimowicz M, Bucka-Kolendo J. 2020. MALDI-TOF MS-Application in food microbiology. *Acta Biochimica Polonica* **67**:327–332.
- Al-Hebshi NN, Nasher AT, Maryoud MY, Homeida HE, Chen T, Idris AM, Johnson NW. 2017. Inflammatory bacteriome featuring *Fusobacterium nucleatum* and *Pseudomonas aeruginosa* identified in association with oral squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* **7**:1834.
- Al-Zyoud W, Hajjo R, Abu-Siniyeh A, Hajjaj S. 2020. Salivary microbiome and cigarette smoking: A first of its kind investigation in Jordan. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**:256.
- Algert CS, McElduff A, Morris JM, Roberts CL. 2009. Perinatal risk factors for early onset of Type 1 diabetes in a 2000-2005 birth cohort. *Diabetic Medicine* **26**:1193–1197.
- Alon-Maimon, Mandelboim O, Bachrach G. 2022. *Fusobacterium nucleatum* and cancer. *Periodontology 2000* **89**:166–180.
- Anderson AC, Rothballer M, Altenburger MJ, Woelber JP, Karygianni L, Vach K, Hellwig E, Al-Ahmad A. 2020. Long-Term Fluctuation of Oral Biofilm Microbiota following Different Dietary Phases. *Applied and Environmental Microbiology* **86**:e01421-20.
- Arbolea S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. 2016. Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Frontiers in Microbiology* **7**:1204.
- Arishi RA, Lai CT, Geddes DT, Stinson LF. 2023. Impact of breastfeeding and other early-life factors on the development of the oral microbiome. *Frontiers in Microbiology*. **14**:1236601.
- Arpaia N, et al. 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**:451-455.
- Arumugam M, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174–180.
- Assarsson M, Söderman J, Dienus O, Seifert O. 2020. Significant differences in the bacterial microbiome of the pharynx and skin in patients with psoriasis compared with healthy controls. *Acta Dermato-Venereologica* **100**.

- Bäckhed et al. 2015. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe* **17**:690–703.
- Bagaitkar J, Demuth DR, Scott DA. 2008. Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. *Tobacco Induced Diseases* **4**:1–10.
- Bagchi T. 2014. Traditional food & modern lifestyle: Impact of probiotics. *Indian Journal of Medical Research* **140**:333–335.
- Banerjee S, Schlaeppi K, Van Der Heijden MGA. 2018. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology* **16**:567–576.
- Barile D, Rastall RA. 2013. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology* **24**:214–219.
- Beighton D et al. 2008. Isolation and identification of *Bifidobacteriaceae* from human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:6457–6460.
- Berg et al. 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* **8**:1–22.
- Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. 2011. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* **17**:478–482.
- Bhatt AP, Redinbo MR, Bultman SJ. 2017. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA-A Cancer Journal for Clinicians* **67**:326–344.
- Bi DX, Zhu Y, Gao YH, Li H, Zhu XC, Wei R, Xie RT, Cai CM, Wei Q, Qin HL. 2022. Profiling *Fusobacterium* infection at high taxonomic resolution reveals lineage-specific correlations in colorectal cancer. *Nature Communications* **13**:3336.
- Biagi E, et al. 2016. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Current Biology* **26**:1480–1485.
- Biagi E, et al. 2010. Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS ONE* **5**:e10667.
- Biagi E, Rampelli S, Turrone S, Quercia S, Candela M, Brigidi P. 2017. The gut microbiota of centenarians: Signatures of longevity in the gut microbiota profile. *Mechanisms of Ageing and Development* **165**:180–184.
- Blacher E, et al. 2019. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature* **572**:474–480.
- Bottacini F, Ventura M, Van Sinderen D, Motherway MO. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories* **13**:1–15.
- Boudry G, Charton E, Le Huerou-Luron I, Ferret-Bernard S, Le Gall S, Even S, Blat S. 2021. The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota. *Frontiers in Nutrition* **8**:629740.
- Brown RL, Larkinson ML, Clarke TB. 2021. Immunological design of commensal communities to treat intestinal infection and inflammation. *PloS Pathogens* **17**:e1009191.
- Bunešová V, Joch M, Musilová S, Rada V. 2017. Bifidobacteria, Lactobacilli, and Short Chain Fatty Acids of Vegetarians and Omnivores. *Scientia Agriculturae Bohemica* **48**:47–54.
- Bush JO, Jiang R. 2012. Palatogenesis: Morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development* **139**:231–243.

- Cénit MC, Matzaraki V, Tigchelaar EF, Zhernakova A. 2014. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1842**:1981–1992.
- Chang CJ, Lin TL, Tsai YL, Wu TR, Lai WF, Lu CC, Lai HC. 2019. Next generation probiotics in disease amelioration. *Journal of Food and Drug Analysis* **27**:615–622.
- Chassard C, Lacroix C. 2013. Carbohydrates and the human gut microbiota. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic* **16**:453–460.
- Chen B, et al. 2018. Variations in oral microbiome profiles in rheumatoid arthritis and osteoarthritis with potential biomarkers for arthritis screening. *Scientific Reports* **8**:1–8.
- Chen JC, Zhang JY, Zhan L, Chen HH, Zhang Z, Huang C, Yue M. 2022. Prevalence and antimicrobial-resistant characterization of *Bacillus cereus* isolated from ready-to-eat rice products in Eastern China. *Frontiers in Microbiology* **13**:964823.
- Chen L, Qin YD, Lin YH, Du MQ, Li YH, Fan MW. 2023. Salivary levels of five microorganisms of root caries in nursing home elderly: a preliminary investigation. *BMC Oral Health* **23**:355.
- Chen YY, Cui WW, Li X, Yang H. 2021. Interaction Between Commensal Bacteria, Immune Response and the Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology* **12**:761981.
- Chen ZF, Feng SQ, Pow EHN, Lam OLT, Mais S, Wang H. 2015. Organic anion composition of human whole saliva as determined by ion chromatography. *Clinica Chimica Acta* **438**:231–235.
- Cheng HY, Ning MX, Chen DK, Ma WT. 2019. Interactions between the gut microbiota and the host innate immune response against pathogens. *Frontiers in Immunology* **10**:439915.
- Chichlowski M, Van Diepen JA, Prodan A, Olga L, Ong KK, Kortman GAM, Dunger DB, Gross G. 2023. Early development of infant gut microbiota in relation to breastfeeding and human milk oligosaccharides. *Frontiers in Nutrition* **10**:1003032.
- Cho I, Blaser MJ. 2012. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* **13**:260–270.
- Cielo AB, Ullian ME. 2013. Peritonitis from *Rothia mucilaginosa* in a chronic peritoneal dialysis patient. *Clinical Kidney Journal* **6**:552–553.
- Cieślik J, Wroblewska M. 2019. MALDI TOF MS – new possibilities in routine microbiological diagnostics. *Diagnostyka Laboratoryjna* **54**:99–104.
- Citron DM. 2002. Update on the Taxonomy and Clinical Aspects of the Genus *Fusobacterium*. *Clinical Infectious Diseases* **35**:S22–S27.
- Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salmien S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports* **6**:1–13.
- Correa RO, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. 2016. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical and Translational Immunology* **5**:e73.
- Costalonga M, Herzberg MC. 2014. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters* **162**:22–38.

- Curtis MA, Aduse-Opoku J, Rangarajan M. 2001. Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **12**:192–216.
- Cuxart I, Coines J, Esquivias O, Faijes M, Planas A, Biarnés X, Rovira C. 2022. Enzymatic Hydrolysis of Human Milk Oligosaccharides. The Molecular Mechanism of *Bifidobacterium Bifidum* Lacto- *N*-biosidase. *ACS Catalysis* **12**:4737–4743.
- Dale BA, Krisanaprakornkit S. 2001. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **30**:321–327.
- Dashper SG, et al. 2019. Temporal development of the oral microbiome and prediction of early childhood caries. *Scientific Reports* **9**:19732.
- Dekaboruah E, Suryavanshi MV, Chettri D, Verma AK. 2020. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Archives of Microbiology* **202**:2147–2167.
- Demmitt BA, Corley RP, Huibregtse BM, Keller MC, Hewitt JK, McQueen MB, Knight R, McDermott I, Krauter KS. 2017. Genetic influences on the human oral microbiome. *BMC Genomics* **18**:1-15.
- Dethlefsen L, Relman DA. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:4554–4561.
- Devine DA, Marsh PD, Meade J. 2015. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *Journal of Oral Microbiology* **7**:26941.
- Diaz PI, Valm AM. 2020. Microbial Interactions in Oral Communities Mediate Emergent Biofilm Properties. *Journal of Dental Research* **99**:18–25.
- Dogra S et al. 2015. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *mBio* **6**:02419-14.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:11971–11975.
- Dominika S, Arjan N, Karyn RP, Henryk K. 2011. The study on the impact of glycated pea proteins on human intestinal bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **145**:267–272.
- Dong Y, Speer CP. 2015. Late-onset neonatal sepsis:Recent developments. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* **100**:F257–F263.
- Dzidic M, Collado MC, Abrahamsson T, Artacho A, Stensson M, Jenmalm MC, Mira A. 2018. Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *ISME Journal* **12**:2292–2306.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Grill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**:1635–1638.
- El Kholly K, Genco RJ, Van Dyke TE. 2015. Oral infections and cardiovascular disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **26**:315–321.

- Eren AM, Borisy GG, Huse SM, Welch JLM. 2014. Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:E2875-E2884.
- Fabiano V, Indrio F, Verduci E, Calcaterra V, Pop TL, Mari A, Zuccotti GV, Cokugras FC, Pettoello-Mantovani M, Goulet O. 2021. Term infant formulas influencing gut microbiota: An overview. *Nutrients* **13**:4200.
- Faith JJ, et al. 2013. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* **341**:1237439.
- Fan XZ, et al. 2018. Drinking alcohol is associated with variation in the human oral microbiome in a large study of American adults. *Microbiome* **6**:1–15.
- Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans ADL. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:219–226.
- Fenno JC, Lee SY, Bayer CH, Ning Y. 2001. The opdB locus encodes the trypsin-like peptidase activity of *Treponema denticola*. *Infection and Immunity* **69**:6193–6200.
- Francavilla R, et al. 2014. Salivary microbiota and metabolome associated with celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:3416–3425.
- Francino M, 2016. Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in Microbiology* **6**:164577.
- Frenck RW, Clemens J. 2003. Helicobacter in the developing world. *Microbes and Infection* **5**:705–713.
- Fukuda S, et al. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**:543–547.
- Funkhouser LJ, Bordenstein SR. 2013. Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLoS Biology* **11**:e1001631.
- Gagliardi D, Makihara S, Corsi PR, De Toledo Viana A, Wiczler MVFS, Nakakubo S, Mimica LMJ, 1998. Microbial flora of the normal esophagus. *Diseases of the Esophagus* **11**: 248–250.
- Gao B, Gallagher T, Zhang Y, Elbadawi-Sidhu M, Lai ZJ, Fiehn O, Whiteson KL. 2018a. Tracking Polymicrobial Metabolism in Cystic Fibrosis Airways: *Pseudomonas aeruginosa* Metabolism and Physiology Are. *mSphere* **3**:00151-18
- Gao L, Xu TS, Huang G, Jiang S, Gu y, Chen F. 2018b. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein and Cell* **9**:488–500.
- Gao Z, Kang Y, Yu J, Ren L. 2014. Human Pharyngeal Microbiome May Play A Protective Role in Respiratory Tract Infections. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* **12**:144–150.
- Georg LK, Brown JM. 1967. *Rothia*, gen. nov. an aerobic genus of the family *Actinomycetaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **17**:79–88.
- Ghosh S, Pramanik S. 2021. Structural diversity, functional aspects and future therapeutic applications of human gut microbiome. *Archives of Microbiology* **203**:5281–5308.
- Gibson GR, et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*:**14**:491–502.

- Gomaa EZ. 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **113**:2019–2040.
- Gomez-Arango LF, Barrett HL, McIntyre HD, Callaway LK, Morrison M, Nitert MD. 2017. Contributions of the maternal oral and gut microbiome to placental microbial colonization in overweight and obese pregnant women. *Scientific Reports* **7**:2860.
- Gomez A, et al. 2017. Host Genetic Control of the Oral Microbiome in Health and Disease. *Cell Host and Microbe* **22**:269-278.
- Gong HL, Gao H, Ren QY, He J. 2022. The abundance of bifidobacterium in relation to visceral obesity and serum uric acid. *Scientific Reports* **12**:13073.
- Goodrich JK et al. 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* **159**:789–799.
- Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, Wilmes P. 2016. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environmental microbiology* **18**:2103–2116.
- Groer MW, Luciano AA, Dishaw LJ, Ashmeade TL, Miller E, Gilbert JA. 2014. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome* **2**:1-8.
- Hajishengallis G, Lamont RJ. 2016. Dancing with the Stars: How Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts. *Trends in Microbiology* **24**:477–489.
- Hansen TH, Kern T, Bak EG, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Hansen T, Pedersen O. 2018. Impact of a vegan diet on the human salivary microbiota. *Scientific Reports* **8**:5847.
- Henne K, Rheinberg A, Melzer-Krick B, Conrads G. 2015. Aciduric microbial taxa including *Scardovia wiggsiae* and *Bifidobacterium* spp. in caries and caries free subjects. *Anaerobe* **35**:60–65.
- Hesla HM, Stenius F, Jäderlund L, Nelson R, Engstrand L, Alm J, Dicksved J. 2014. Impact of lifestyle on the gut microbiota of healthy infants and their mothers - the ALADDIN birth cohort. *FEMS Microbiology Ecology* **90**:791–801.
- Hiippala K, Jouhten H, Ronkainen A, Hartikainen A, Kainulainen V, Jalanka J, Satokari R. 2018. The potential of gut commensals in reinforcing intestinal barrier function and alleviating inflammation. *Nutrients* **10**:988.
- Hill C, et al. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **11**:506–514.
- Hischebeth, GT, Keil VC, Gentil K, Boström A, Kuchelmeister K, Bekeredjian-Ding I. 2014. Rapid brain death caused by a cerebellar abscess with *Fusobacterium nucleatum* in a young man with drug abuse : a case report. *BMC Research Notes* **7**:1–5.
- Holgerson PL, Esberg A, Sjödin A, West CE, Johansson I. 2020. A longitudinal study of the development of the saliva microbiome in infants 2 days to 5 years compared to the microbiome in adolescents. *Scientific reports* **10**:9629.
- Holgerson, PL, Vestman, NR, Claesson R, Öhman C, Domellöf M, Tanner AC, Hernell O, Johansson I. 2013. Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **56**:127–136.

- Hooks KB, O'Malley MA. 2017. Dysbiosis and its discontents. *mBio* **8**:01492-17.
- Hsieh YY, Tung SY, Pan HY, Yen CW, Xu HW, Lin YJ, Deng YF, Hsu WT, Wu CS, Li C. 2018. Increased Abundance of Clostridium and Fusobacterium in Gastric Microbiota of Patients with Gastric Cancer in Taiwan. *Scientific Reports* **8**:158.
- Huang C, et al. 2023a. The updates and implications of cutaneous microbiota in acne. *Cell and Bioscience* **13**:113.
- Huang J, Ahmed I, Khan D, Abu Sitta E. 2023b. Actinomycosis By *Schaalia Odontolytica* Masquerading As a Mediastinal Mass in an Immunosuppressed Patient. *Chest* **164**:A1119–A1120.
- Hughes RL, Alvarado DA, Swanson KS, Holscher HD. 2022. The Prebiotic Potential of Inulin-Type Fructans: A Systematic Review. *Advances in Nutrition* **13**:492–529.
- Humphrey SP, Williamson RT, 2001. A review of saliva Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry* **85**:162–169.
- Hungate RE, Macy J. 1973. The Roll-Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Bulletins from the Ecological Research Committee* **17**:123–126.
- Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA, Sogin ML. 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics* **4**:e1000255.
- Huttenhower C, et al. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**:207–214.
- Huys G, Vancanneyt M, D'Haene K, Falsen E, Wauters G, Vandamme P. 2007. *Alloscardovia omnicoles* gen. nov., sp nov., from human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**:1442–1446.
- Hwang IM, Sun LM, Lin CL, Lee CF, Kao CH. 2014. Periodontal disease with treatment reduces subsequent cancer risks. *QJM: An International Journal of Medicine* **107**:805–812.
- Itzumi T, Battaglia T, Ruiz V, Perez GIP. 2017. Gut Microbiome and Antibiotics. *Archives of Medical Research* **48**:727–734.
- Ince G, Gürsoy H, İpçi ŞD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yilmaz S. 2015. Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology* **86**:746–754.
- Iniesta M, Chamorro C, Ambrosio N, Marín MJ, Sanz M, Herrera D. 2023. Subgingival microbiome in periodontal health, gingivitis and different stages of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **50**:905–920.
- Ishikawa E, et al. 2013. Ethnic diversity of gut microbiota: Species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus *Bifidobacterium* in healthy Belgian adults, and comparison with data from Japanese subjects. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **116**:265–270.
- Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Björkstén B, Engstrand L, Andersson AF. 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* **63**:559–566.

- Jakubovics NS. 2015a. Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *Journal of Molecular Biology* **427**:3662–3675.
- Jakubovics NS. 2015b. Saliva as the sole nutritional source in the development of multispecies communities in dental plaque. *Microbiology spectrum* **3**:263–277.
- Jia J, et al. 2020. Impact of Postnatal Antibiotics and Parenteral Nutrition on the Gut Microbiota in Preterm Infants During Early Life. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **44**:639–654.
- Jia YJ, Liao Y, He YQ, Zheng MQ, Tong XT, Xue WQ, Zhang JB, Yuan LL, Zhang WL, Jia WH. 2021. Association Between Oral Microbiota and Cigarette Smoking in the Chinese Population. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**:658203.
- Jiang CL, et al. 2019. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics to reduce the severity of oral mucositis induced by chemoradiotherapy for patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* **125**:1081–1090.
- Joly S, Maze C, McCray PB, Guthmiller JM. 2004. Human β -Defensins 2 and 3 Demonstrate Strain-Selective Activity against Oral Microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:1024–1029.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition* **110**:1253–1262.
- Jović M, Avramovic V, Vlahovic P, Savic V, Velickov A, Petrovic V. 2015. Ultrastructure of the human palatine tonsil and its functional significance. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* **56**:371–377.
- Kabeerdoss J, Ferdous S, Balamurugan R, Mechenro J, Vidya R, Santhanam S, Jana AK, Ramakrishna BS. 2013. Development of the gut microbiota in southern indian infants from birth to 6 months: A molecular analysis. *Journal of Nutritional Science* **3**:e2
- Kageyama S, Asakawa M, Takeshita T, Ihara Y, Kanno S, Hara T, Takahashi I, Yamashita Y. 2019. Transition of Bacterial Diversity and Composition in Tongue Microbiota during the First Two Years of Life. *mSphere* **4**:00187-19.
- Kaplan CW, Lux R, Haake SK, Shi W. 2009. The *Fusobacterium nucleatum* outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. *Molecular Microbiology* **71**:35–47.
- Kato K, Odamaki T, Mitsuyama E, Sugahara H, Xiao JZ, Osawa R. 2017. Age-Related Changes in the Composition of Gut *Bifidobacterium* Species. *Current Microbiology* **74**:987–995.
- Kaunitz JD, Akiba Y. 2006. Review article: Duodenal bicarbonate - Mucosal protection, luminal chemosensing and acid-base balance. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **24**:169–176.
- Kaur R, Gilbert SC, Sheehy EC, Beighton D. 2013. Salivary levels of *Bifidobacteria* in caries-free and caries-active children. *International Journal of Paediatric Dentistry* **23**:32–38.
- Keller MK, Kressirer CA, Belstrom D, Twerman S, Tanner ACR. 2017. Oral microbial profiles of individuals with different levels of sugar intake. *Journal of Oral Microbiology* **9**: 1355207.
- Khan R, Petersen FC, Shekhar S. 2019. Commensal bacteria: An emerging player in defense against respiratory pathogens. *Frontiers in Immunology* **10**:452323

- Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. 2016. The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal* **221**:657–666.
- Kilian M. 2018. The oral microbiome – friend or foe? *European Journal of Oral Sciences* **126**:5–12.
- Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Havlík J, Koppová I, Benada O, Rada V, Kofronová O. 2010. *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of bumblebees. *Systematic and Applied Microbiology* **33**:359–366.
- Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Hein R, Schmidt TM, Kamada N. 2020. The Bacterial Connection between the Oral Cavity and the Gut Diseases. *Journal of Dental Research* **99**:1021–1029.
- Knights D, Ward TL, McKinlay CE, Miller H, Gonzalez A, McDonald D, Knight R. 2014. Rethinking enterotypes. *Cell Host and Microbe* **16**:433–437.
- Koeth RA, et al. 2013. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine* **19**:576–585.
- Kolebrander PE, 2000. Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. *Annual Review of Microbiology* **54**:413–437.
- Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M. 2005. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: Species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiology and Immunology* **20**:354–361.
- Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, Huttenhower C, Ley RE. 2013. A Guide to Enterotypes across the Human Body: Meta-Analysis of Microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS Computational Biology* **9**:e1002863.
- Korsholm TL, Haahr V, Prag J. 2007. Eight cases of lower respiratory tract infection caused by *Stomatococcus mucilaginosus*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **39**:913–917.
- Kostic AD, et al 2012. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research* **22**:292–298.
- Kraft-Bodi E, Jørgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Twetman S. 2015. Effect of Probiotic Bacteria on Oral Candida in Frail Elderly. *Journal of Dental Research* **94**:181S-186S.
- Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. 2015. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology* **47**:199–210.
- La Rosa PS, et al. 2014. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:12522–12527.
- Ladeira R, Tap J, Derrien M. 2023. Exploring *Bifidobacterium* species community and functional variations with human gut microbiome structure and health beyond infancy. *Microbiome Research Reports* **2**.
- Lagkouvardos I, Intze E, Schaubeck M, Rooney JPK, Hecht C, Piloquet H, Clavel T. 2023. Early life gut microbiota profiles linked to synbiotic formula effects: a randomized clinical trial in European infants. *American Journal of Clinical Nutrition* **117**:326–339.

- Lainhart W, Gonzalez MD. 2018. *Aerococcus urinae*, *Alloscardovia omnicoles*, and *Actinotignum schaalii*: the AAA Minor League Team of Urinary Tract Infection Pathogens. *Clinical Microbiology Newsletter* **40**:77–82.
- Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. 2018. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* **16**:745–759.
- Larsen JM. 2017. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* **151**:363–374.
- Lassalle F, Spagnoletti M, Fumagalli M, Shaw L, Dyble M, Walker C, Thomas MG, Migliano AB, Balloux, F. 2018. Oral microbiomes from hunter-gatherers and traditional farmers reveal shifts in commensal balance and pathogen load linked to diet. *Molecular ecology*. **27**:182–195.
- Laursen MF, Bahl MI, Michaelsen KF, Licht TR. 2017. First foods and gut microbes. *Frontiers in Microbiology* **8**:356.
- Laursen MF. 2021. Gut Microbiota Development: Influence of Diet from Infancy to Toddlerhood. *Annals of Nutrition and Metabolism* **77**:21–34.
- Lawley TD, Walker AW. 2013. Intestinal colonization resistance. *Immunology* **138**:1–11.
- Lawson MAE, O’Neill IJ, Kujawska M, Javavdi SG, Wijeyesekera A, Flegg Z, Chalklen L, Hall LJ. 2020. Breast milk-derived human milk oligosaccharides promote *Bifidobacterium* interactions within a single ecosystem. *ISME Journal* **14**:635–648.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **98**:1303–1315.
- LeBlanc JG, Milani C, De Giori GS, Sesma F, Van Sinderen D, Ventura M. 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology* **24**:160–168.
- Lederberg J, McCray AT. 2001. 'Ome sweet 'omics - A genealogical treasury of words. *Scientist* **15**:8–8.
- Lee AB, Harker-Murray P, Ferrieri P, Schleiss MR, Tolar J. 2013. Bacterial meningitis from *Rothia mucilaginosa* in patients with malignancy or undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric Blood & Cancer* **50**:673–676.
- Lee DS, Lee SA, Kim M, Nam SH, Kang MS. 2020. Reduction of Halitosis by a Tablet Containing *Weissella cibaria* CMU: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Journal of Medicinal Food* **23**:649–657.
- Li J, Quinque D, Horz HP, Li MK, Rzhetskaya M, Raff JA, Hayes MG, Stoneking M. 2014. Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiology* **14**:1–13.
- Li X, Liu Y, Yang X, Li C, Song Z. 2022. The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Frontiers in Microbiology* **13**:895537.
- Lin TL, Shu CC, Lai WF, Tzeng CM, Lai HC, Lu CC. 2019. Investiture of next generation probiotics on amelioration of diseases – Strains do matter. *Medicine in Microecology* **1**: 100002.

- Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM. 2004. Synbiotic Modulation of Gut Flora: Effect on Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients with Cirrhosis. *Hepatology* **39**:1441–1449.
- Louis P, Scott KP, Duncan SH, Flint HJ. 2007. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology* **102**:1197–1208.
- Lovat LB. 1996. Age related changes in gut physiology and nutritional status. *Gut* **38**: 306–309.
- López CD, Vidaki A, Kayser M. 2022. Integrating the human microbiome in the forensic toolkit: Current bottlenecks and future solutions. *Forensic Science International Genetics* **56**:102627
- Macgregor ID. 1989. Effects of Smoking on Oral Ecology. A Review of the Literature. *Clinical Preventive Dentistry* **11**:3–7.
- Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. 2003. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *Journal of Clinical Periodontology* **30**:644–654.
- Mahlen SD, Clarridge JE. 2009. Site and clinical significance of *Alloscardovia omnicolens* and *Bifidobacterium* species isolated in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **47**:3289–3293.
- Mai X, Genco RJ, LaMonte MJ, Hovey KM, Freudenheim JL, Andrews CA, Wactawski-Wende J. 2015. Periodontal Pathogens and Risk of Incident Cancer in Postmenopausal Women: The Buffalo OsteoPerio Study. *Journal of Periodontology* **87**:257–267.
- Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D, Aringazina R, Bartkowiak-Wieczorek J, Madry E. 2021. High-fat, western-style diet, systemic inflammation, and gut microbiota: A narrative review. *Cells* **10**:3164.
- Mangin, I, Lévêque C, Magne F, Suau A, Pochart P. 2012. Long-Term Changes in Human Colonic Bifidobacterium Populations Induced by a 5-Day Oral Amoxicillin-Clavulanic Acid Treatment. *PLoS ONE* **7**:e50257.
- Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D. 2009a. Association between *Bifidobacteriaceae* and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiology and Immunology* **24**:32–37.
- Mantzourani M, Gilbert SC, Fenlon M, Beighton D. 2010. Non-oral bifidobacteria and the aciduric microbiota of the denture plaque biofilm. *Molecular Oral Microbiology* **25**:190–199.
- Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HNH, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M, Beighton D. 2009b. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Research* **43**:308–313.
- Marco ML. 2021. Defining how microorganisms benefit human health. *Microbial Biotechnology* **14**:35–40.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães VD, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet J. 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology* **9**:1–6.
- Mårild, K, Stephansson O, Montgomery S, Murray JA, Ludvigsson JF. 2012. Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: A nationwide case-control study. *Gastroenterology* **142**:39–45.

- Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. 2016. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000* **70**:80–92.
- Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA. 2018. The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **6**:133–148.
- Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, Rodríguez JM. 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**:965–969.
- Martín, R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics* **143**:754–758.
- Mashima I, Nakazawa F. 2014. The influence of oral *Veillonella* species on biofilms formed by *Streptococcus* species. *Anaerobe* **28**:54–61
- Mashima I, Theodorea CF, Thaweboon B, Thaweboon S, Scannapieco FA, Nakazawa F. 2017. Exploring the salivary microbiome of children stratified by the oral hygiene index. *PLoS ONE* **12**:0185274.
- Masi AC, et al. 2021. Human milk oligosaccharide DSLNT and gut microbiome in preterm infants predicts necrotising enterocolitis. *Gut* **70**:2273–2282.
- Mason MR, Chambers S, Dabdoub SM, Thikkurissy S, Kumar PS. 2018. Characterizing oral microbial communities across dentition states and colonization niches. *Microbiome* **6**:1–10.
- Mason MR, Nagaraja HN, Camerlengo T, Joshi V, Kumar PS. 2013. Deep Sequencing Identifies Ethnicity-Specific Bacterial Signatures in the Oral Microbiome. *PLoS ONE* **8**:77287
- Maukonen J, Saarela M. 2015. Human gut microbiota: Does diet matter? *Proceedings of the Nutrition Society* **74**:23–36.
- Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. 2013. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* **152**:39–50.
- McCull KE, El-Omar E, Gillen D. 2000. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterology Clinics of North America* **29**:687–703.
- Mekadim C, Bunesová V, Vlková E, Hroncová Z, Killer J. 2019. Genetic marker-based multi-locus sequence analysis for classification, genotyping, and phylogenetics of the family Bifidobacteriaceae as an alternative approach to phylogenomics. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **112**:1785–1800.
- Meurman JH. 2005. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *European Journal of Oral Sciences* **113**:188–196.
- Miftahussurur M, et al. 2020. Gastric microbiota and *Helicobacter pylori* in Indonesian population. *Helicobacter* **25**:e12695.
- Mishra S, Rath S, Mohanty N. 2020. Probiotics—A complete oral healthcare package. *Journal of Integrative Medicine* **18**:462–469.
- Mitsou EK, Kirtzalidou E, Oikonomou I, Liosis G, Kyriacou A. 2008. Fecal microflora of Greek healthy neonates. *Anaerobe* **14**:94–101.

- Modrackova N, Stovicek A, Burtscher J, Bolechova P, Killer J, Domig KJ, Neuzil-Bunesová V. 2021. The bifidobacterial distribution in the microbiome of captive primates reflects parvorder and feed specialization of the host. *Scientific Reports* **11**: 1–13.
- Mudgil D, Barak S. 2013. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* **61**:1–6.
- Mueller NT, Whyatt R, Hoepner L, Obergheld S, Dominguez-Bello MG, Widen EM, Hassoun A, Perera F, Rundle A. 2015. Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. *International Journal of Obesity* **39**:665–670.
- Mukherjee C, Moyer CO, Steinkamp HM, Hashmi SB, Beall CJ, Guo XH, Ni A, Leyes EJ, Griffen AL. 2021. Acquisition of oral microbiota is driven by environment, not host genetics. *Microbiome* **9**:1–13.
- Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. 2004. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:3023–3029.
- Nadkerny PV, Ravishankar PL, Pramod V, Agarwal LA, Bhandari S. 2015. A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology* **19**:633–639.
- Nagaoka K, Yanagihara K, Morinaga Y, Kohno S. 2017. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in two cases of empyema and lung abscess using paromomycin-vancomycin supplemented Brucella HK agar. *Anaerobe* **43**:99–101.
- Nair S, Kumar VS, Krishnan R, Rajan P. 2017. A Comparative Evaluation of Bifidobacteria Levels in Early Childhood Caries and Severe Early Childhood Caries. *Journal of pharmacy and bioallied sciences* **9**:S82.
- Nasidze I, Li J, Schroeder R, Creasey JL, Li MK, Stoneking M. 2011. High Diversity of the Saliva Microbiome in Batwa Pygmies. *PLoS ONE* **6**:e23352.
- Neves BG, Stipp RN, Bezerra DD, Guedes SFD, Rodriguez LKA. 2018. Quantitative analysis of biofilm bacteria according to different stages of early childhood caries. *Archives of Oral Biology* **96**:155–161.
- Nociti FH, Casati MZ, Duarte PM. 2015. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontology 2000* **67**:187–210.
- Nouioui I, Carro L, García-López M, Meier-Kolthoff JP, Woyke T, Kyrpides NC, Pukall R, Klenk HP, Goodfellow M, Göker M. 2018. Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology* **9**:2007.
- O’Brien PA, Webster NS, Miller DJ, Bourne DG. 2019. Host-microbe coevolution: Applying evidence from model systems to complex marine invertebrate holobionts. *mBio* **10**:02241-18.
- O’Callaghan A, Van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7**:925.
- Oba PM, Holscher HD, Mathai RA, Kim J, Swanson KS. 2020. Diet influences the oral microbiota of infants during the first six months of life. *Nutrients* **12**:3400.

- Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, Abe F, Osawa R. 2016. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiology* **16**:1-12.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology* **5**:e177.
- Panthee B, Gyawali S, Panthee P, Techato K. 2022. Environmental and Human Microbiome for Health. *Life* **12**:456.
- Pantoja-Feliciano IG, Clemente JC, Costello EK, Perez ME, Blaser MJ, Knight R, Dominguez-Bello MG. 2013. Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. *ISME Journal* **7**:1112–1115.
- Parhi L, et al. 2020. Breast cancer colonization by *Fusobacterium nucleatum* accelerates tumor growth and metastatic progression. *Nature Communications* **11**:3259.
- Parsons BN, et al. 2017. Comparison of the human gastric microbiota in hypochlorhydric states arising as a result of *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis, autoimmune atrophic gastritis and proton pump inhibitor use. *PLoS Pathogens* **13**:e1006653.
- Pechar R, Killer J, Svejstil R, Salmonová H, Geigerová M, Bunesová V, Rada V, Benada O. 2017. *Galliscardovia ingluviei* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the crop of a laying hen (*Gallus gallus* f. *domestica*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **67**:2403–2411.
- Pédrón J, Guyon L, Lecomte A, Blottière L, Chandeysson C, Rochelle-Newall E, Raynaud X, Berge O, Barny MA. 2020. Comparison of environmental and culture-derived bacterial communities through 16S metabarcoding: A powerful tool to assess media selectivity and detect rare taxa. *Microorganisms* **8**:1129.
- Pei ZH, Bini EJ, Yang LY, Zhou MS, Francois F, Blaiser MJ. 2004. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:4250–4255.
- Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. 2017. A critical assessment of the „sterile womb" and „in utero colonization" hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* **5**:1–19.
- Pivetta G, et al. 2023. Gastric Microbiota Gender Differences in Subjects with Healthy Stomachs and Autoimmune Atrophic Gastritis. *Microorganisms* **11**:1938.
- Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gill-Campos M, Gil A. 2019. Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition* **10**:S49–S66.
- Proctor DM, Relman DA. 2017. The Landscape Ecology and Microbiota of the Human Nose, Mouth, and Throat. *Cell Host and Microbe* **21**:421–432.
- Proctor LM. 2016. The National Institutes of Health Human Microbiome Project. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **21**:368–372.
- Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. 2002. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters* **217**:133–139.
- Rada V, Petr J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods* **43**:127–132.

- Ramakrishna BS. 2013. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **28**:9–17.
- Rastall RA. 2004. Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance. *Journal of nutrition* **134**:2022S–2026S.
- Rendinbo MR. 2014. The microbiota, chemical symbiosis, and human disease. *Journal of Molecular Biology* **426**:3877–3891.
- Res G, NIH HMP Working Group. 2009. "The NIH Human Microbiome Project."
- Reshetnyak VI, Burmistrov AI, Maev IV. 2021. *Helicobacter pylori*: Commensal, symbiont or pathogen? *World Journal of Gastroenterology* **27**:545.
- Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. 2009. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **6**:306–314.
- Rinninella E, Tohumcu E, Raoul P, Fiorani M, Cintoni M, Mele MC, Cammarota G, Gasbarrini A, Ianiro G. 2023. The role of diet in shaping human gut microbiota. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* **62**:101828.
- Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. 2016. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology* **7**:979.
- Roduit C, Scholtens S, De Jongste JC, Wijga AH, Gerritsen J, Postma DS, Brunekreef B, Hoekstra MO, Aalberse R, Smit HA. 2009. Asthma at 8 years of age in children born by caesarean section. *Thorax* **64**:107–113.
- Rogier EW, Frantz AL, Bruno MEC, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, Kaetzel CS. 2014. Lessons from mother: Long-term impact of antibodies in breast milk on the gut microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring. *Gut Microbes* **5**:663–668.
- Rothschild D, et al. 2018. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* **555**:210–215.
- Ruan W, Engevik MA, Spinler JK, Versalovic J. 2020. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Digestive Diseases and Sciences* **65**:695–705.
- Rubin SJ, Lyons RW, Murcia AJ. 1978. Endocarditis associated with cardiac catheterization due to a gram-positive coccus designated *Micrococcus mucilaginosus* incertae sedis. *Journal of Clinical Microbiology* **7**:546–549.
- Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. 2016. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: A systematic review. *BMC Gastroenterology* **16**:1–12.
- Sakurama H, et al. 2013. Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of bifidobacterium longum subspecies longum shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. *Journal of Biological Chemistry* **288**:25194–25206.
- Salhi L, Rompen E, Sakalihasan N, Laleman I, Teughels W, Michel JB, Lambert F. 2019. Can Periodontitis Influence the Progression of Abdominal Aortic Aneurysm? A Systematic Review. *Angiology* **70**:479–491.

- Sayols-Baixeras S, et al. 2023. *Streptococcus* Species Abundance in the Gut Is Linked to Subclinical Coronary Atherosclerosis in 8973 Participants From the SCAPIS Cohort. *Circulation* **148**:459–472.
- Scheiman J, et al. 2019. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nature Medicine* **25**:1104–1109.
- Scheithauer TP, Dallinga-Thie GM, De Vos WM, Nieuwdorp M, Van Raalte DH. 2016. Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Molecular Metabolism* **5**:759–770.
- Seekatz AM, Schnizlein MK, Koenigsknecht MJ, Baker JR, Hasler WL, Bleske BE, Young VB, Sun DX. 2019. Spatial and Temporal Analysis of the Stomach and Small-Intestinal Microbiota in Fasted Healthy Humans. *mSphere* **4**:00126-19.
- Segain JP, De La Bletiere DR, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**:397–403.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews* **90**:859–904.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology* **14**:e1002533.
- Sevelsted A, Stokholm J, Bønnelykke K, Bisgaard H. 2015. Cesarean section chronic immune disorders. *Pediatrics* **135**:e92–e98.
- Sharma S, Tripathi P. 2019. Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go? *Journal of Nutritional Biochemistry* **63**:101–108.
- Shaw AG, et al. 2015. Late-Onset bloodstream infection and perturbed maturation of the gastrointestinal microbiota in premature infants. *PLoS ONE* **10**:e0132923.
- Shi W, Tian J, Xu H, Zhou Q, Qin M. 2018. Distinctions and associations between the microbiota of saliva and supragingival plaque of permanent and deciduous teeth. *PLoS ONE* **13**:e0200337.
- Simón-Soro A, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. 2013. Microbial geography of the oral cavity. *Journal of Dental Research* **92**:616–621.
- Spanogiannopoulos P, Bess EN, Carmody RN, Turnbaugh PJ. 2016. The microbial pharmacists within us: A metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nature Reviews Microbiology* **14**:273–287.
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodie EL, Lynch SV. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE* **10**:e0117617.
- Stahringer SS, Clemente JC, Corley RP, Hewitt J, Knights D, Walter WA, Knight R, Krauter KS. 2012. Nurture trumps nature in a longitudinal survey of salivary bacterial communities in twins from early adolescence to early adulthood. *Genome Research* **22**:2146–2152.
- Stepanov I, Jensen J, Hatsukami D, Hecht SS. 2008. New and traditional smokeless tobacco : Comparison of toxicant and carcinogen levels. *Nicotine and tobacco research* **10**:1773–1782.

- Steward CJ, et al. 2018. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* **562**:583–588.
- Stokowa-Sołtys K, Wojtkowiak K, Jagiełło K. 2021. *Fusobacterium nucleatum* – Friend or foe? *Journal of Anorganic Biochemistry* **224**:111586.
- Stremmel W, Schmidt KV, Schuhmann V, Kratzer F, Garbade SF, Langhans CD, Fricker G, Okun JG. 2017. Blood trimethylamine-n-oxide originates from microbiota mediated breakdown of phosphatidylcholine and absorption from small intestine. *PLoS ONE* **12**:e0170742.
- Stsepetova J, et al. 2019. Impact of polyols on Oral microbiome of Estonian schoolchildren. *BMC Oral Health* **19**:1–10.
- Suehiro Y, et al. 2017. Highly sensitive stool DNA testing of *Fusobacterium nucleatum* as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. *Annals of Clinical Biochemistry* **54**:86–91.
- Sulyanto RM, Thompson ZA, Beall CJ, Leys EJ, Griffen AL. 2019. The Predominant Oral Microbiota Is Acquired Early in an Organized Pattern. *Scientific Reports* **9**:10550.
- Sundin OH, Mendoza-Ladd A, Zeng MT, Diaz-Arévalo D, Morales E, Fagan BM, Ordoñez J, Velez P, Antony N, McCallum RW. 2017. The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiology* **17**:1–17.
- Tlaskalová-Hogenová H, et al. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters* **93**: 97–108.
- Tsuzukibashi O, Uchibori S, Kobayashi T, Umezawa K, Mashimo C, Nambu T, Saito M, Hashizume-Takizawa T, Ochiai T. 2017. Isolation and identification methods of *Rothia* species in oral cavities. *Journal of Microbiological Methods* **134**:21–26.
- Tunnsjø HS, Gundersen G, Rangnes F, Noone JC, Endres A, Bemanian V. 2019. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **38**:1367–1376.
- Turrone F, Marchesi JR, Foroni E, Gueimonde M, Shanahan F, Margolles A, Van Sinderen D, Ventura M. 2009. Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut. *ISME Journal* **3**:745–751.
- Turrone F, et al. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS ONE* **7**:e36957.
- Uranga CC, Arroyo P, Duggan BM, Gerwick WH, Edlunda A. 2020. Commensal Oral *Rothia mucilaginosa* Produces Enterobactin, a Metal-Chelating Siderophore. *Msystems* **5**:00161-20.
- Urbán E, Gajdács M. 2021. Microbiological and clinical aspects of actinomyces infections: What have we learned? *Antibiotics* **10**:151.
- Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. 2012. Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews* **70**:S38-S44.
- Vaiserman AM, Koliada AK, Marotta F. 2017. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Research Reviews* **35**:36–45.

- Vallès Y, Artacho A, Pascual-García A, Ferrús ML, Gosalbes MJ, Abellán JJ, Francino, MP. 2014. Microbial Succession in the Gut: Directional Trends of Taxonomic and Functional Change in a Birth Cohort of Spanish Infants. *PLoS Genetics* **10**:e1004406.
- Van't Hof W, Veerman EC, Amerongen AVN, Ligtenberg AJ. 2014. Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs in Oral Science* **24**:40–51.
- Van Der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, Strooker H, Van Winkelhoff AJ. 2006. prtH in *Tannerella forsythensis* is Not Associated With Periodontitis. *Journal of Periodontology* **77**:586–590.
- Vander Haar EL, So J, Gyamfi-Bannerman C, Han YPW. 2018. *Fusobacterium nucleatum* and adverse pregnancy outcomes: Epidemiological and mechanistic evidence. *Anaerobe* **50**:55–59.
- Vangay P, Ward T, Gerber JS, Knights D. 2015. Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. *Cell Host and Microbe* **17**:553–564.
- Venkatesh K, Ramadass B. 2023. A perspective on gut health: The redox potential and pH. *Gastroenterology, Hepatology and Endoscopy Practice* **3**:12-16.
- Ventura M, Turrone F, Lugli GA, Van Sinderen D. 2014. Bifidobacteria and humans: Our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**:163–168.
- Vlková E, Salmonová H, Bunesová V, Geigerová M, Rada V, Musilová S. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* **34**:27–33.
- Von Graevenitz A, 2004. *Rothia dentocariosa*: Taxonomy and differential diagnosis. *Clinical Microbiology and Infection* **10**:399–402.
- Wade WG. 2021. Resilience of the oral microbiome. *Periodontology 2000* **86**:113–122.
- Walker AW, et al. 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME Journal* **5**:220–230.
- Walker CB, Ratliff D, Muller D, Mandell R, Socransky SS. 1979. Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets. *Journal of Clinical Microbiology* **10**:844–849.
- Walsh CJ, Guinane CM, Hill C, Ross RP, O'Toole PW, Cotter PD. 2015. In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database. *BMC Microbiology* **15**:1–11.
- Walter J, Ley R. 2011. The human gut microbiome: Ecology and recent evolutionary changes. *Annual Review of Microbiology* **65**:411–429.
- Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. 2017. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* **3**:71–82.
- Wang J, Feng J, Zhu Y, Li D, Wang J, Chi W. 2022. Diversity and Biogeography of Human Oral Saliva Microbial Communities Revealed by the Earth Microbiome Project. *Frontiers in Microbiology* **13**:931065.

- Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. 2011. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Applied and Environmental Microbiology* **77**:6718–6721.
- Wang X, Wang X, Upadhyay R, Chen J. 2019. Topographic study of human tongue in relation to oral tribology. *Food Hydrocolloids* **95**:116–121.
- Wei Y, Wang F, Gao J, Huang Y, Ren W, Sheng H. 2021. Culture-dependent and culture-independent characterization of bacterial community diversity in different types of sandy lands: the case of Minqin County, China. *BMC Microbiology* **21**:1–15.
- Welch JLM, Dewhirst FE, Borisy GG. 2019. Biogeography of the oral microbiome: The site-specialist hypothesis. *Annual Review of Microbiology* **73**:335–358.
- Welch JLM, Ramírez-Puebla ST, Borisy GG. 2020. Oral Microbiome Geography: Micron-Scale Habitat and Niche. *Cell Host and Microbe* **28**:160–168.
- Wolters M, Ahrens J, Romaní-Pérez M, Watkins C, Sanz Y, Benítez-Páez A, Stanton C, Günther K. 2019. Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health – A systematic review conducted within the MyNewGut project. *Clinical Nutrition* **38**:2504–2520.
- Wu GD, et al. 2011. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **334**:105–108.
- Wu H, et al. 2022. The Periodontal Pathogen *Fusobacterium nucleatum* Exacerbates Alzheimer's Pathogenesis via Specific Pathways. *Frontiers in Aging Neuroscience* **14**:912709.
- Wu J, et al. 2016. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. *ISME Journal* **10**:2435–2446.
- Xiao C, Ran S, Huanag Z, Liang J. 2016. Bacterial diversity and community structure of supragingival plaques in adults with dental health or caries revealed by 16S pyrosequencing. *Frontiers in Microbiology* **7**:208767.
- Xu H, Tian B, Shi W, Tian J, Wang W, Qin M. 2022. Maturation of the oral microbiota during primary teeth eruption: a longitudinal, preliminary study. *Journal of Oral Microbiology* **14**:2051352.
- Xu X, et al. 2015. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environmental Microbiology* **17**:699–710.
- Yamamura K, Izumi D, Kandimalla R, Sonohara F, Baba Y, Yoshida N, Kodera Y, Baba H, Goel A. 2019. Intratumoral *Fusobacterium nucleatum* levels predict therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* **25**:6170–6179.
- Yang L, Lu X, Nossa CW, Francois F, Peek RM, Pei Z. 2009. Inflammation and Intestinal Metaplasia of the Distal Esophagus Are Associated With Alterations in the Microbiome. *Gastroenterology* **137**:588–597.
- Yap PSX, Chong CW, Kamar AA, Yap IKS, Choo YM, Lai NM, Teh CSJ. 2021. Neonatal intensive care unit (NICU) exposures exert a sustained influence on the progression of gut microbiota and metabolome in the first year of life. *Scientific Reports* **11**:1353.
- Yatsunenko T, et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**:222–227.

- Younus Z, Goyal SM, Singh V, Ikram A, Imran M. 2021. Genomic-based characterization of *Enterococcus* spp.: an emerging pathogen isolated from human gut. *Molecular Biology Reports* **48**:5371–5376.
- Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. 2012. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases* **18**:109–120.
- Zaura E, et al. 2015. Same Exposure but two radically different responses to antibiotics: Resilience of the salivary microbiome versus long-term microbial shifts in feces. *mBio* **6**:01693-15.
- Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. 2009. Defining the healthy „core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiology* **9**:1–12.
- Zhang X, Gérard P. 2022. Diet-gut microbiota interactions on cardiovascular disease. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **20**:1528–1540.
- Zhi XY, Li WJ, Stackebrandt E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:589–608.
- Zhou X, Wang J, Liu W, Huang X, Song Y, Wang Z, Jia X. 2020. Periodontal status and microbiologic pathogens in patients with chronic obstructive pulmonary disease and periodontitis: A case–Control study. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **15**:2071–2079.
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 723–735.
- Zomer A, Fernandez M, Kearney B, Fitzgerald GF, Ventura M, Van Sinderen D. 2009. An interactive regulatory network controls stress response in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Journal of Bacteriology* **191**:7039–7049.
- Zwittink RD, Van Zoeren-Grobbe D, Martin R, Van Lingen RA, Jebbink LJG, Boeren S, Renes IB, Van Elburg RM, Belzer C, Knol J. 2017. Metaproteomics reveals functional differences in intestinal microbiota development of preterm infants. *Molecular and Cellular Proteomics* **16**:1610–1620.

9 Samostatné přílohy

Příloha 1: Tabulka s dekadickými logaritmy počtu kolonií tvořících jednotku na mililitr (log KTJ mL⁻¹) pro vzorky slin a s dekadickými logaritmy počtu kolonií tvořících jednotku na gram pro vzorky stolice (log KTJ g⁻¹).

Dárce	Vzorek	Kultivační média (log CFU mL ⁻¹)			
		WSP	WSP-MUP	WSP-NORF	FNA
1	Sliny	8,80	6,74	5,70	7,28
2	Sliny	9,00	7,32	7,92	8,42
3	Sliny	9,33	7,03	7,00	8,77
4	Sliny	8,83	7,24	7,09	7,89
5	Sliny	8,94	7,16	6,88	7,93
6	Sliny	9,32	7,34	7,75	8,42
7	Sliny	8,56	6,75	6,64	7,73
8	Sliny	8,81	7,26	6,89	7,83
9	Sliny	9,20	7,18	7,11	8,38
10	Sliny	8,56	7,07	6,97	8,01
11	Sliny	8,85	7,81	7,28	8,35
12	Sliny	8,21	7,40	6,16	7,33
13	Sliny	8,46	7,81	6,60	7,66
14	Sliny	8,90	7,54	6,53	8,17
15	Sliny	8,46	7,45	5,72	7,72
16	Sliny	8,91	8,61	7,51	8,72
17	Sliny	8,28	7,26	6,09	7,34
18	Sliny	8,97	6,88	7,42	8,38
19	Sliny	8,69	7,27	6,68	8,38
20	Sliny	8,73	6,31	6,42	7,35
21	Sliny	8,78	7,48	7,51	8,53
22	Sliny	9,11	8,76	7,90	8,59
23	Sliny	8,86	7,79	7,35	8,28
24	Sliny	8,79	7,46	7,72	7,94
25	Sliny	8,98	7,22	8,39	9,31
26	Sliny	9,25	7,23	7,88	8,8
27	Sliny	8,15	6,16	6,67	7,76
28	Sliny	9,80	7,39	8,77	9,23
29	Sliny	8,83	7,47	7,18	7,94
30	Sliny	7,95	6,41	6,83	7,68
Průměr ± SD	Sliny	8,81 ± 0,38	7,29 ± 0,55	7,09 ± 0,73	8,14 ± 0,54

Dárce	Vzorek	Kultivační média (log CFU g ⁻¹)			
		WSP	WSP-MUP	WSP-NORF	FNA
1	Stolice	8,56	7,63	7,02	8,03
2	Stolice	9,13	8,85	8,84	8,49
3	Stolice	8,8	8,38	8,01	8,34
4	Stolice	8,92	9,06	8,75	8,15
5	Stolice	9,06	8,54	8,58	9,5
6	Stolice	9,05	8,62	8,85	9,27
7	Stolice	10,08	10,05	10,04	8,94
8	Stolice	9,53	9,56	9,54	8,71
9	Stolice	9,01	8,84	8,67	8,93
10	Stolice	9,04	8,82	8,69	9,34
11	Stolice	9,08	8,98	8,85	9,01
12	Stolice	9,88	9,75	9,84	8,6
13	Stolice	9,54	8,65	8,44	9,29
14	Stolice	9,74	9,79	9,55	8,67
15	Stolice	8,61	8,32	9,3	8,36
16	Stolice	9,68	9,28	9,19	9,31
17	Stolice	8,94	9,15	9,11	9,1
18	Stolice	9,62	8,91	8,95	8,86
19	Stolice	9,89	8,99	9,65	9,14
20	Stolice	9,56	8,67	9	8,89
21	Stolice	9,06	8,98	8,89	9,41
22	Stolice	9,98	9,57	9,77	9,88
23	Stolice	10,21	8,82	10,19	10,12
24	Stolice	9,63	9,14	9,14	8,6
25	Stolice	8,42	9,01	8,9	8
26	Stolice	9,60	10,03	9,97	9,71
27	Stolice	8,14	8,27	8,19	6,56
28	Stolice	8,14	7,74	7,66	6,82
29	Stolice	9,21	8,91	8,91	9,11
30	Stolice	9,18	8,35	7,98	8,71
Průměr ± SD	Stolice	9,24 ± 0,55	8,92 ± 0,58	8,95 ± 0,72	8,80 ± 0,77

Pozn: WSP-MUP – počet kultivovatelných bakterií narostlých na Wilkins-Chalgren agaru obohaceném o mupirocin a kyselinu octovou, WSP-NORF – počet kultivovatelných bakterií narostlých na Wilkins-Chalgren agaru obohaceném o mupirocin, norfloxacin a kyselinu

octovou, FNA – počet kultivovatelných bakterií narostlých na *Fusobacterium nucleatum* agaru, SD – směrodatná odchylka

Příloha 2: Tabulka s ponechanými izoláty na KMVD

Vzorek	n	Izolát	ID	Médium	Dárce	MALDI-TOF MS identifikace	Skóre	Izolace	Zamražení+DNA
Sliny	122	668	23/6b	MUP	23	008_003_GM_null	1.82	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	1	1	1/5a	MUP	1	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.05	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	4	38	ad38	MUP	2	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.08	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	7	42	3/5f	MUP	3	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.03	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	8	46	3/5d	NORF	3	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.10	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	11	69	ad69	MUP	4	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.13	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	12	110	ad110	MUP	4	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.15	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	21	96	6/4f	MUP	6	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.14	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	25	119	7/3e	NORF	7	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.00	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	28	132	8/4f	MUP	8	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.13	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	29	138	8/4f	NORF	8	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.07	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	32	147	9/6c	MUP	9	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.23	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	34	151	9/6a	NORF	9	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.23	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	40	186	11/5f	MUP	11	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.03	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	41	187	11/6a	NORF	11	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.25	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	46	39.B3/5c	ad39_B3/5c	MUP	13	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.01	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	51	223	13/5a	NORF	13	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.02	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	52	227	13/5e	NORF	13	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.17	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	54	235	14/6a	MUP	14	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.23	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	55	244	14/4d	NORF	14	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.24	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	64	549	16/5c	NORF	16	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.12	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	66	552	16/4f	NORF	16	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.10	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	79	577	18/7a	MUP	18	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.09	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	82	586	18/5d	NORF	18	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.09	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	89	600	19/4f	MUP	19	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.05	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	97	96.C6/4a	ad96_C6/4a	NORF	20	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.03	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	98	97.C6/3b	ad97_C6/3b	NORF	20	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.15	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	102	622	20/5d	NORF	20	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.13	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	113	651	22/7c	MUP	22	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.18	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	116	658	22/6d	NORF	22	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.03	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	138	713	25/6e	NORF	25	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.06	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	161	768	28/6f	NORF	28	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	2.07	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	2	10	1/3d	NORF	1	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.80	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	17	82	5/4d	NORF	5	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.95	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	18	84	5/3f	NORF	5	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.95	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	22	99	6/5c	NORF	6	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.89	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	24	114	7/3f	MUP	7	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.90	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	47	41.B3/5e	ad41_B3/5e	MUP	13	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.79	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	73	566	17/4b	NORF	17	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.94	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	74	567	17/4c	NORF	17	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.73	07.08.2023	08.08.2023

Sliny	90	606	19/4f	NORF	19	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.87	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	99	614	20/5b	MUP	20	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.74	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	100	615	20/5c	MUP	20	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.80	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	101	617	20/4e	MUP	20	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.95	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	107	631	21/7a	MUP	21	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.73	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	115	656	22/6b	NORF	22	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.98	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	125	678	23/5f	NORF	23	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.89	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	130	693	24/6c	NORF	24	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.90	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	136	708	25/5f	MUP	25	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	1.96	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	10	22	ad22	MUP	4	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.06	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	15	77	5/3e	MUP	5	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.21	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	16	78	5/3f	MUP	5	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.31	09.03.2023	11.03.2023
Sliny	81	579	18/5c	MUP	18	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.03	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	95	91.B6/5a	ad91_B6/5a	MUP	20	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.04	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	156	759	28/6c	MUP	28	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.16	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	159	762	28/6f	MUP	28	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2.07	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	80	578	18/6b	MUP	18	<i>Bifidobacterium dentium</i>	1.84	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	96	94.B6/5d	ad94_B6/5d	MUP	20	<i>Bifidobacterium dentium</i>	1.9	23.03.2023	24.03.2023
Sliny	108	632	21/7b	MUP	21	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.05	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	109	640	21/6d	NORF	21	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.16	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	5	19	2/6a	MUP	2	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.95	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	6	29	2/5e	NORF	2	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.73	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	39	185	11/6e	MUP	11	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.91	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	129	686	24/6b	MUP	24	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.85	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	131	695	24/6e	NORF	24	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.72	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	135	706	25/5d	MUP	25	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.86	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	137	709	25/7a	NORF	25	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.92	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	144	723	26/6c	MUP	26	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.76	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	146	730	26/6d	NORF	26	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.77	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	157	760	28/6d	MUP	28	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.70	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	158	761	28/6e	MUP	28	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.87	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	50	222	13/6f	MUP	13	<i>Bifidobacterium oedipus</i>	1.85	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	62	544	16/7d	MUP	16	<i>Bifidobacterium oedipus</i>	1.70	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	72	565	17/5a	NORF	17	<i>Clavispora lusitaniae</i>	1.71	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	45	213	12/6c	FNA	12	<i>Fusobacterium canifelinum</i>	1.87	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	94	612	19/5f	FNA	19	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2.12	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	30	144	8/5f	FNA	8	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.83	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	42	193	11/8a	FNA	11	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.89	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	53	233	13/5e	FNA	13	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.83	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	59	266	15/7b	FNA	15	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.77	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	60	269	15/6e	FNA	15	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.80	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	78	576	17/5f	FNA	17	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.82	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	92	609	19/5c	FNA	19	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.74	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	93	610	19/5d	FNA	19	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.95	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	120	666	22/6f	FNA	22	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.80	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	153	755	27/5e	FNA	27	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.77	14.08.2023	15.08.2023

Sliny	172	805	30/7a	FNA	30	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	1.92	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	26	124	7/6d	FNA	7	<i>Granulicatella adiacens</i>	2.06	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	43	199	12/6a	MUP	12	<i>Lactobacillus sakei</i>	2.46	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	105	628	20/5d	FNA	20	<i>NRI</i>	1.68	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	118	663	22/6c	FNA	22	<i>NRI</i>	1.66	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	154	757	28/7a	MUP	28	<i>NRI</i>	1.51	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	139	715	25/7a	FNA	25	<i>NRI (Agrobacterium radiobacter)</i>	1.43	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	143	722	26/6b	MUP	26	<i>NRI (Alloscardovia omnicoles)</i>	1.67	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	145	727	26/8a	NORF	26	<i>NRI (Bifidobacterium breve)</i>	1.49	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	149	736	26/7d	FNA	26	<i>NRI (Bifidobacterium oedipus)</i>	1.54	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	71	564	17/5f	MUP	17	<i>NRI (Bifidobacterium olomucium)</i>	1.61	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	173	806	30/6b	FNA	30	<i>NRI (Fusobacterium canifelinum)</i>	1.64	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	3	16	1/5d	FNA	1	<i>NRI (Fusobacterium nucleatum)</i>	1.50	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	151	751	27/7a	FNA	27	<i>NRI (Prevotella dentalis)</i>	1.50	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	67	553	16/8a	FNA	16	<i>NRI (Prevotella histicola)</i>	1.65	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	174	809	30/5e	FNA	30	<i>NRI (Prevotella melaninogenica)</i>	1.64	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	148	735	26/7c	FNA	26	<i>NRI (Prevotella salivae)</i>	1.65	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	84	591	18/7c	FNA	18	<i>NRI (Staphylococcus epidermidis)</i>	1.63	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	140	716	25/7b	FNA	25	<i>NRI (Veillonella atypica)</i>	1.64	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	123	669	23/6c	MUP	23	<i>Paraclostridium bifementas</i>	1.73	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	65	550	16/5d	NORF	16	<i>Parascardovia denticolens</i>	2.01	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	150	739	27/6a	MUP	27	<i>Parascardovia denticolens</i>	2.22	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	155	758	28/7b	MUP	28	<i>Parascardovia denticolens</i>	2.07	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	77	573	17/5c	FNA	17	<i>Prevotella denticola</i>	1.97	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	86	593	18/7e	FNA	18	<i>Prevotella denticola</i>	2.22	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	91	607	19/7a	FNA	19	<i>Prevotella denticola</i>	2.15	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	110	643	21/8a	FNA	21	<i>Prevotella histicola</i>	2.14	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	128	684	23/6f	FNA	23	<i>Prevotella histicola</i>	2.14	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	147	733	26/7a	FNA	26	<i>Prevotella histicola</i>	2.04	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	133	699	24/7c	FNA	24	<i>Prevotella histicola</i>	1.98	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	132	697	24/7a	FNA	24	<i>Prevotella jejuni</i>	1.87	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	134	701	24/6e	FNA	24	<i>Prevotella jejuni</i>	1.92	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	162	769	28/7a	FNA	28	<i>Prevotella jejuni</i>	1.89	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	85	592	18/7d	FNA	18	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.26	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	106	630	20/5f	FNA	20	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.30	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	126	681	23/7c	FNA	23	<i>Prevotella melaninogenica</i>	2.07	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	69	557	16/7e	FNA	16	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.70	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	111	648	21/6f	FNA	21	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.86	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	119	664	22/6d	FNA	22	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.89	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	141	717	25/7c	FNA	25	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.96	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	152	752	27/7b	FNA	27	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.97	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	163	773	28/7e	FNA	28	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.78	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	168	788	29/7b	FNA	29	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1.74	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	75	571	17/7a	FNA	17	<i>Prevotella naceinsis</i>	2.05	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	61	541	16/7a	MUP	16	<i>Prevotella pallens</i>	1.72	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	68	556	16/7d	FNA	16	<i>Prevotella pallens</i>	1.97	07.08.2023	08.08.2023

Sliny	142	719	25/7e	FNA	25	<i>Prevotella pallens</i>	1.94	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	169	789	29/6c	FNA	29	<i>Prevotella pallens</i>	2.06	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	76	572	17/6b	FNA	17	<i>Prevotella salivae</i>	2.31	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	87	594	18/7f	FNA	18	<i>Prevotella salivae</i>	2.09	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	127	683	23/6e	FNA	23	<i>Prevotella salivae</i>	2.24	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	164	774	28/7f	FNA	28	<i>Prevotella salivae</i>	2.08	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	165	775	29/7a	MUP	29	<i>Prevotella salivae</i>	1.82	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	170	791	29/6e	FNA	29	<i>Pseudoleptotrichia goodfellowii</i>	1.88	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	70	561	17/5c	MUP	17	<i>Rothia dentocariosa</i>	1.84	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	104	626	20/6b	FNA	20	<i>Rothia dentocariosa</i>	1.95	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	63	545	16/6e	MUP	16	<i>Rothia mucilaginoso</i>	2.21	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	117	659	22/6e	NORF	22	<i>Rothia mucilaginoso</i>	2.31	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	35	152	9/6b	NORF	9	<i>Rothia mucilaginoso</i>	1.70	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	57	260	15/4b	NORF	15	<i>Rothia mucilaginoso</i>	1.87	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	58	264	15/4f	NORF	15	<i>Rothia mucilaginoso</i>	1.87	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	160	764	28/8b	NORF	28	<i>Rothia mucilaginoso</i>	1.73	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	121	667	23/7a	MUP	23	<i>Schaalia meyeri</i>	1.87	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	27	131	8/5e	MUP	8	<i>Schaalia odontolytica</i>	2.05	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	37	170	10/6b	NORF	10	<i>Schaalia odontolytica</i>	2.01	09.03.2023	14.03.2023
Sliny	56	258	15/5f	MUP	15	<i>Schaalia odontolytica</i>	2.04	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	124	671	23/6e	MUP	23	<i>Schaalia odontolytica</i>	2.06	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	166	778	29/6d	MUP	29	<i>Schaalia odontolytica</i>	2.00	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	9	55	4/6a	MUP	4	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.79	09.03.2023	14.03.2023
Sliny	13	60	4/6f	MUP	4	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.95	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	14	66	4/5f	NORF	4	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.78	09.03.2023	14.03.2023
Sliny	19	92	6/6v	MUP	6	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.87	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	20	94	6/5d	MUP	6	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.76	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	23	112	7/4d	MUP	7	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.84	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	31	146	9/6b	MUP	9	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.90	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	33	149	9/6e	MUP	9	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.96	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	36	164	10/6b	MUP	10	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.79	09.03.2023	10.03.2023
Sliny	38	181	11/7a	MUP	11	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.84	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	44	204	12/5f	MUP	12	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.91	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	48	218	13/7b	MUP	13	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.79	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	49	220	13/6d	MUP	13	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.94	30.03.2023	31.03.2023
Sliny	112	650	22/7b	MUP	22	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.88	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	114	652	22/6d	MUP	22	<i>Schaalia odontolytica</i>	1.86	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	167	787	29/7a	FNA	29	<i>Veillonella atypica</i>	2.06	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	171	793	30/6a	MUP	30	<i>Veillonella atypica</i>	1.86	14.08.2023	15.08.2023
Sliny	83	590	18/8b	FNA	18	<i>Veillonella dispar</i>	1.85	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	88	596	19/7b	MUP	19	<i>Veillonella dispar</i>	1.93	07.08.2023	08.08.2023
Sliny	103	625	20/6a	FNA	20	<i>Veillonella dispar</i>	1.98	07.08.2023	08.08.2023
Stolice	63	428	9/8b	FNA	9	<i>Bacteroides caccae</i>	2.24	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	106	540	15/7f	FNA	15	<i>Bacteroides caccae</i>	2.28	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	133	897	20/8c	FNA	20	<i>Bacteroides caccae</i>	2.00	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	7	285	1/7c	FNA	1	<i>Bacteroides eggerthii</i>	2.10	03.07.2023	04.07.2023

Stolice	175	1041	28/5c	FNA	28	<i>Bacteroides eggerthii</i>	2.13	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	158	989	25/6e	FNA	25	<i>Bacteroides fragilis</i>	2.44	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	165	1007	26/8e	FNA	26	<i>Bacteroides fragilis</i>	2.42	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	20	321	3/8c	FNA	3	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.31	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	31	340	4/6d	FNA	4	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.40	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	43	377	6/6e	FNA	6	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.28	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	48	392	7/8b	FNA	7	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.31	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	58	413	8/7e	FNA	8	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.21	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	77	467	11/7e	FNA	11	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.06	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	90	499	13/8a	FNA	13	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.16	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	98	518	14/8b	FNA	14	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.29	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	105	538	15/7d	FNA	15	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.19	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	159	990	25/6f	FNA	25	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.14	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	164	1003	26/8a	FNA	26	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.23	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	16	305	2/7e	FNA	2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2.37	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	21	323	3/7e	FNA	3	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2.44	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	32	342	4/6f	FNA	4	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2.27	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	186	1076	30/7b	FNA	30	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2.45	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	6	283	1/8a	FNA	1	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.12	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	14	302	2/8b	FNA	2	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.24	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	19	320	3/8b	FNA	3	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.22	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	29	337	4/7a	FNA	4	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.41	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	55	409	8/8a	FNA	8	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.34	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	68	446	10/8b	FNA	10	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.25	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	76	463	11/8a	FNA	11	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.23	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	91	500	13/8b	FNA	13	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.31	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	99	519	14/8c	FNA	14	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.35	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	123	862	18/8d	FNA	18	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.39	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	166	1008	26/7f	FNA	26	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.24	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	176	1044	28/5f	FNA	28	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.33	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	182	1058	29/8b	FNA	29	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.42	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	2	272	1/7b	MUP	1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.18	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	5	281	1/5e	NORF	1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.11	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	9	291	2/8c	MUP	2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.16	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	11	296	2/8b	NORF	2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.15	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	22	325	4/8a	NORF	4	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.11	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	25	332	4/8b	MUP	4	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.22	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	33	344	5/8b	MUP	5	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.22	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	35	351	5/7c	NORF	5	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.28	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	37	353	5/6e	NORF	5	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.20	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	39	363	6/8c	MUP	6	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.12	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	40	367	6/8a	NORF	6	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.16	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	44	379	7/8a	MUP	7	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.21	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	51	399	8/8c	MUP	8	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.15	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	54	406	8/8d	NORF	8	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.18	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	59	415	9/8a	MUP	9	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.23	10.07.2023	11.07.2023

Stolice	60	416	9/8b	MUP	9	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.10	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	73	456	11/7f	MUP	11	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.96	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	79	469	12/8a	MUP	12	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.14	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	83	477	12/8c	NORF	12	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.18	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	87	492	13/6f	MUP	13	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.20	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	89	494	13/7b	NORF	13	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.17	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	110	821	16/7e	NORF	16	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.38	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	114	836	17/8b	NORF	17	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.13	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	117	845	17/7e	FNA	17	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.35	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	119	848	18/8b	MUP	18	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.26	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	121	855	18/8c	NORF	18	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.26	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	129	886	20/7d	NORF	20	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.30	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	131	891	20/8c	MUP	20	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.34	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	137	911	21/7e	MUP	21	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.29	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	139	915	21/7c	FNA	21	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.25	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	141	929	22/7e	MUP	22	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.24	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	142	931	22/8a	FNA	22	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.31	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	144	939	23/8c	NORF	23	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.40	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	146	949	23/8a	FNA	23	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.23	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	154	973	25/8a	MUP	25	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.31	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	157	984	25/7f	NORF	25	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.24	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	160	995	26/8e	MUP	26	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.28	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	163	1000	26/8d	NORF	26	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.28	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	172	1029	28/6c	MUP	28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.33	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	173	1035	28/6c	NORF	28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.22	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	177	1045	29/8a	MUP	29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.32	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	181	1054	29/7d	NORF	29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.21	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	3	274	1/6d	MUP	1	<i>Bifidobacterium aerophilum</i>	1.71	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	124	871	19/8a	NORF	19	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	2.09	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	126	875	19/7e	NORF	19	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	2.10	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	152	966	24/7f	NORF	24	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	2.11	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	66	438	10/6f	MUP	10	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.07	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	94	506	14/8b	MUP	14	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.34	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	95	515	14/7e	NORF	14	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.30	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	100	524	15/8b	MUP	15	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.12	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	102	531	15/8c	NORF	15	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.41	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	115	837	17/8c	NORF	17	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.06	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	74	460	11/7d	NORF	11	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.13	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	80	470	12/8b	MUP	12	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.04	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	81	473	12/7e	MUP	12	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.17	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	107	813	16/8c	MUP	16	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.18	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	109	817	16/8a	NORF	16	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.09	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	112	829	17/8a	MUP	17	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.01	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	149	958	24/8d	MUP	24	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1.84	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	23	326	4/8b	NORF	4	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.15	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	26	333	4/7c	MUP	4	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.05	03.07.2023	04.07.2023

Stolice	46	386	7/8b	NORF	7	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.15	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	53	405	8/8c	NORF	8	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.12	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	71	452	11/8b	MUP	11	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.07	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	65	433	10/8a	MUP	10	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.03	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	70	451	11/8a	MUP	11	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.13	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	134	901	21/7a	NORF	21	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.12	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	135	904	21/7d	NORF	21	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.29	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	167	1013	27/7e	MUP	27	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.10	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	168	1017	27/7c	NORF	27	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	2.16	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	1	271	1/8a	MUP	1	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.11	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	4	278	1/6b	NORF	1	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.05	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	10	295	2/8a	NORF	2	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.10	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	12	298	2/7d	NORF	2	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.22	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	17	312	3/6f	MUP	3	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.19	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	18	317	3/6e	NORF	3	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.09	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	24	329	4/6e	NORF	4	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.73	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	34	350	5/7b	NORF	5	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.21	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	36	352	5/7d	NORF	5	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.12	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	41	369	6/8c	NORF	6	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.10	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	42	372	6/7f	NORF	6	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.12	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	45	385	7/8a	NORF	7	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.11	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	47	388	7/7d	NORF	7	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.18	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	50	398	8/8b	MUP	8	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.20	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	52	404	8/8b	NORF	8	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.06	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	61	419	9/7e	MUP	9	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.89	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	62	426	9/6f	NORF	9	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.12	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	67	443	10/7e	NORF	10	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.12	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	72	454	11/7d	MUP	11	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.01	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	75	462	11/6f	NORF	11	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.04	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	82	475	12/8a	NORF	12	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.23	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	84	478	12/7d	NORF	12	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.19	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	86	491	13/6e	MUP	13	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.10	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	88	493	13/8a	NORF	13	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.16	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	93	505	14/8a	MUP	14	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.10	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	96	516	14/7f	NORF	14	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.10	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	101	525	15/8c	MUP	15	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.14	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	103	534	15/7f	NORF	15	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.14	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	108	816	16/7f	MUP	16	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.28	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	111	826	16/7d	FNA	16	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.25	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	113	830	17/7b	MUP	17	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.15	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	118	846	17/7f	FNA	17	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.16	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	120	850	18/8d	MUP	18	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.02	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	122	856	18/8d	NORF	18	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.10	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	125	872	19/8b	NORF	19	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.10	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	127	880	19/8d	FNA	19	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.17	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	128	883	20/8a	NORF	20	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.24	25.09.2023	26.09.2023

Stolice	130	889	20/8a	MUP	20	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.22	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	136	906	21/6f	NORF	21	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.20	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	138	913	21/8a	FNA	21	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.21	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	140	921	22/8c	NORF	22	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.08	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	143	932	22/8b	FNA	22	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.00	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	145	946	23/7d	MUP	23	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.21	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	147	950	23/8b	FNA	23	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.07	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	148	956	24/8b	MUP	24	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.21	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	150	961	24/8a	NORF	24	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.15	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	155	977	25/7e	MUP	25	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.17	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	156	980	25/8b	NORF	25	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.17	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	161	996	26/7f	MUP	26	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.15	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	162	999	26/8c	NORF	26	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.20	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	179	1049	29/6e	MUP	29	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.17	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	180	1052	29/8b	NORF	29	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.26	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	184	1063	30/8a	MUP	30	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.22	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	185	1071	30/6c	NORF	30	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.21	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	27	335	4/6e	MUP	4	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1.81	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	28	336	4/6f	MUP	4	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1.98	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	151	962	24/8b	NORF	24	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.02	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	178	1047	29/7c	MUP	29	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2.29	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	169	1022	27/6b	FNA	27	<i>Escherichia coli</i>	2.15	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	187	1080	30/6f	FNA	30	<i>Escherichia coli</i>	2.30	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	170	1023	27/5c	FNA	27	<i>Ligilactobacillus ruminis</i>	2.21	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	171	1025	27/5e	FNA	27	<i>Ligilactobacillus ruminis</i>	2.22	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	183	1061	29/7e	FNA	29	<i>Ligilactobacillus ruminis</i>	2.16	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	30	338	4/7b	FNA	4	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2.29	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	92	504	13/7f	FNA	13	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2.16	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	97	517	14/8a	FNA	14	<i>Parabacteroides distasonis</i>	2.25	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	8	288	1/6f	FNA	1	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	2.16	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	153	967	24/8a	FNA	24	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	2.12	02.10.2023	03.10.2023
Stolice	13	301	2/8a	FNA	2	<i>Parabacteroides merdae</i>	2.16	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	57	412	8/7d	FNA	8	<i>Parabacteroides merdae</i>	2.24	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	104	535	15/8a	FNA	15	<i>Phocaeicola coprocola</i>	1.79	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	49	393	7/8c	FNA	7	<i>Phocaeicola massiliensis</i>	2.04	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	15	303	2/7c	FNA	2	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.16	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	38	356	5/8b	FNA	5	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.19	03.07.2023	04.07.2023
Stolice	56	410	8/8b	FNA	8	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.32	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	64	430	9/7d	FNA	9	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.28	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	69	448	10/7d	FNA	10	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.21	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	78	468	11/7f	FNA	11	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.15	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	85	483	12/7c	FNA	12	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.29	10.07.2023	11.07.2023
Stolice	116	842	17/8b	FNA	17	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.30	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	132	896	20/8b	FNA	20	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	2.21	25.09.2023	26.09.2023
Stolice	174	1040	28/5b	FNA	28	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	1.84	02.10.2023	03.10.2023

Pozn.: MUP – Wilkins-Chalgren agar obohacený o mupirocin a kyselinu octovou, NORF – Wilkins-Chalgren agar obohacený o mupirocin, norfloxacin a kyselinu octovou, FNA – *Fusobacterium nucleatum* agar, NRI – nespolehlivá identifikace organismu, zelená barva (skóre 2.00 – 3.00) – identifikace organismu na úroveň rodu a druhu, žlutá barva (skóre 1.70–1.99) – pravděpodobná rodová identifikace organismu, červená barva (skóre 0.00 - 1.69) – nespolehlivá identifikace organismu