

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Bifidobakterie ve střevní mikrobiotě kojenců

Bakalářská práce

Jana Hašková

Výživa a potraviny (NUTRIB)

Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Bifidobakterie ve střevní mikrobiotě kojenců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 25.4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Nikol Modráčkové, Ph.D. za její rady, odborné vedení, neocenitelnou podporu, trpělivost a ochotu pomoci mi při každé nesnazi během mého zaučení v laboratoři či při psaní mé práce. Mé upřímné díky patří zároveň všem členům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí prostoru a vstřícných rad při práci v laboratoři. Nesmím zapomenout také poděkovat Mgr. Tomášovi Krejčímu za psychickou podporu, motivaci a věcné připomínky při korekci této bakalářské práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mému příteli za jeho nekonečnou podporu.

Bifidobakterie ve střevní mikrobiotě kojenců

Souhrn

Kojenecká střevní mikrobiota vzniká od narození a utváří se během prvních let života. Bakteriální kolonizace závisí na mnoha faktorech, včetně způsobu porodu a typu výživy dítěte. Bifidobakterie jsou součástí střevní mikrobioty, jejichž množství se mění v závislosti na věku a zdravotním stavu. Hrají také důležitou roli při udržování a podpoře lidského zdraví a mohou využívat rozmanitou škálu sacharidů. Schopnost bifidobakterií metabolizovat konkrétní sacharidy je většinou druhově a kmenově závislá. Typicky kojenecké druhy, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum* nebo *B. breve*, rozkládají oligosacharidy lidského mléka (HMO) a využívají je jako zdroj energie. Schopnost metabolizovat HMO přispívá k jejich dominantní roli ve střevní mikrobiotě kojenců.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo kultivační stanovení počtu bifidobakterií, laktobacilů a *Escherichia coli* přítomných ve fekálních vzorcích kojeneckých dárců, kojeneckým mateřským mlékem, kteří byli bez zjevných zdravotních obtíží, pomocí selektivních kultivačních medií. Dalším cílem bylo provést identifikaci jednotlivých detekovaných kmenů bifidobakterií a dalších bakteriálních kmenů izolovaných z uvedených medií pomocí metody MALDI-TOF hmotnostní spektrofotometrie a na základě získaných výsledků vybrat kmeny pro jejich následné uložení do sbírky mikroorganismů Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD) ČZU v Praze.

Bifidobakterie dosahovaly vysokých kultivačních počtů u všech testovaných kojeneckých fekálních vzorků. Průměrný počet bifidobakterií v médiu WSP-MUP byl $8,72 \pm 1,75$ log KTJ/g a u média WSP-NORF $8,78 \pm 1,55$ log KTJ/g. Kultivační počty laktobacilů dosahovaly hodnot $7,14 \pm 1,73$ log KTJ/g. Počty *E. coli* byly určeny na médiu TBX, na kterém byly detekovány kolonie třech různých kultivačních znaků. Počty zelených kolonií, tedy β -glukuronidáza pozitivních *E. coli*, byly v průměrné hodnotě $6,89 \pm 0,79$ log KTJ/g a počty bílých kolonií se zeleným středem $6,72 \pm 1,06$ log KTJ/g. Počty bílých kolonií, umožňující detekci β -glukuronidáza negativních *E. coli* a dalších koliformních bakterií, byly v průměru $6,83 \pm 0,79$ log KTJ/g. Celkové počty kultivovatelných anaerobních bakterií dosahovaly množství v průměru $9,93 \pm 0,97$ log KTJ/g.

Z celkových 255 jednotlivých izolovaných bakteriálních kolonií bylo 203 izolátů charakterizováno na úroveň druhu pomocí MALDI-TOF MS. Nejčastějšími detekovanými bifidobakteriálními druhy byly *B. breve*, *B. longum* a *B. dentium*. Jako nejčastěji detekované druhy laktobacilů byly detekovány *Lactobacillus fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*. Dále byly velmi často identifikovány i koliformní bakterie, konkrétně *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*. Ze všech izolovaných kmenů bylo vybráno 98, které byly následně uloženy do sbírky mikroorganismů KMVD ČZU v Praze.

Klíčová slova: Mikrobiom, kultivace, *Bifidobacterium*, MALDI-TOF MS, kojenecký

Bifidobacteria in the gut microbiota of infants

Summary

The infant gut microbiota is established from birth and is shaped during the first years of life. Bacterial colonization depends on many factors, including the type of delivery and the type of nutrition the baby receives. Bifidobacteria are part of the gut microbiota, the amount of which varies depending on age and health condition. They also play an important role in maintaining and supporting human health and can use a diverse range of carbohydrates. The ability of bifidobacteria to metabolise specific carbohydrates is mostly species and strain dependent. Typically, the infant species, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum* or *B. breve*, break down human milk oligosaccharides (HMO) and use them as a source of energy. The ability to metabolize HMO contributes to their dominant role in the gut microbiota of infants.

The aim of the practical part of the bachelor thesis was the culture determination of the number of bifidobacteria, lactobacilli and *Escherichia coli* present in faecal samples of breast-fed infant donors without obvious health problems, using selective cultivation media. Another goal was to identify the individual detected strains of bifidobacteria and other bacterial commensals isolated from these media using the MALDI-TOF mass spectrophotometry and, based on the results obtained, to select the strains for their subsequent storage in the bacterial strain collection of the Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics (KMVD) CZU Prague.

Bifidobacteria reached high cultivation counts in all infant faecal samples tested. The average count of bifidobacteria in WSP-MUP medium was 8.72 ± 1.75 log CFU/g and in WSP-NORF medium 8.78 ± 1.55 log CFU/g. The cultivation counts of lactobacilli were 7.14 ± 1.73 log CFU/g. *E. coli* counts were determined on TBX medium, on which colonies of three different culture characters were detected. The counts of green colonies, i.e. β -glucuronidase positive *E. coli*, averaged 6.89 ± 0.79 log CFU/g and the counts of white colonies with a green centre averaged 6.72 ± 1.06 log KTJ/g. The numbers of white colonies allowing detection of β -glucuronidase negative *E. coli* and other coliforms averaged 6.83 ± 0.79 log CFU/g. Total counts of culturable anaerobic bacteria averaged 9.93 ± 0.97 log CFU/g.

From a total of 255 individual bacterial colonies isolated, 203 isolates were characterized to species level by MALDI-TOF MS. The most common bifidobacterial species detected were *B. breve*, *B. longum* and *B. dentium*. The most frequently detected lactobacillio species were *Lactobacillus fermentum*, *L. rhamnosus*, and *L. gasseri*. Furthermore, coliform bacteria were also very frequently identified, namely *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*. From all isolated strains, 98 were selected and subsequently deposited in the strain collection of microorganisms of KMVD CZU Prague.

Keywords: Microbiome, cultivation, *Bifidobacterium*, MALDI-TOF MS, infant

Obsah

1 Úvod	8
2 Hypotéza a cíl práce.....	9
2.1 Hypotéza	9
2.2 Cíl práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Střevní mikrobiota kojence.....	10
3.1.1 Složení střevní mikrobioty.....	11
3.1.2 Funkce střevní mikrobioty.....	12
3.1.3 Eubióza a dysbióza střevní mikrobioty u kojenců	13
3.2 Bifidobakterie	13
3.2.1 Taxonomie bifidobakterií	14
3.2.1.1 Typicky kojenecké druhy	15
3.2.2 Metabolismus sacharidů	16
3.2.3 Bifidobakterie při podpoře zdraví hostitele	17
3.3 Faktory ovlivňující výskyt bifidobakterií.....	18
3.3.1 Prenatální vývoj jedince	18
3.3.2 Vliv mateřské mikrobioty	18
3.3.3 Způsob porodu	19
3.3.4 Způsoby výživy kojence.....	20
3.3.4.1 Mateřské mléko.....	20
3.3.4.2 Náhradní kojenecká výživa	20
3.3.5 Vlivy vnitřního a vnějšího prostředí	21
4 Metodika	23
4.1 Odběr vzorku	23
4.2 Kultivační média	23
4.3 Mikrobiologický rozbor fekálních vzorků kojenců.....	24
4.4 Kvantifikace a izolace narostlých kolonií.....	26
4.5 Selekce izolátů bifidobakterií, laktobacilů a <i>E. coli</i>	26
4.6 MALDI-TOF MS analýza	27
4.7 Rozšíření sbírky izolátů bifidobakterií, laktobacilů a <i>E. coli</i>.....	28
5 Výsledky	29
5.1 Stanovené kultivační počty bakterií	29
5.2 MALDI-TOF MS identifikace bakteriálních izolátů	30
5.3 Rozšíření bakteriální sbírky komezálů.....	31
6 Diskuze	32
7 Závěr	35

8 Literatura.....	36
9 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Současná vědecká literatura identifikuje dětskou střevní mikrobiotu jako mnohostranný orgán ovlivňující řadu aspektů zdraví a vývoje hostitele. Jedním z nejrozšířenějších, nejhojnějších a nejzkoumanějších mikrobiálních taxonů v lidském kojeneckém střevě je rod *Bifidobacterium*, a to díky prospěšným aktivitám, které přináší svému hostiteli (Turrone et al. 2022). *Bifidobacterium* spp. tvoří 60–70 % střevních mikrobů kojenců a přibližně 10–15 % střevních mikrobů dospělých (Li et al. 2024). Určité kmeny bifidobakterií jsou využívány při podpoře léčby různých onemocnění jako probiotikum a jsou zařazovány jako látky podporující zdraví do velkého množství doplňků stravy a funkčních potravin (Marcos-Fernández et al. 2023).

Kojení je spojeno s významnými zdravotními přínosy pro kojence. Kromě základních živin a bioaktivních složek obsahuje mateřské mléko také rozmanitou škálu mikrobů, které jsou důležité pro udržení zdraví mléčné žlázy a kojence. Mikrobiální kolonizace kojenců se po narození rychle zvyšuje a mateřská mikrobiota je hlavním zdrojem pro mikrobiotu kojenců. Význam mateřské mikrobioty podtrhují rozdíly ve střevní mikrobiotě mezi kojenými dětmi a dětmi krmenými umělou výživou (Zimmermann & Curtis 2020). Střevní mikrobiota kojených dětí je méně rozmanitá, ale obsahuje vyšší množství druhů bifidobakterií, včetně *B. breve*, *B. bifidum* a zejména *B. longum*, přičemž tyto druhy bývají v kojeneckém střevě nejhojnější a jsou schopny prospívat na HMO (Derrien et al. 2019).

V této bakalářské práci jsou shrnuty informace o střevní mikrobiotě kojenců se zaměřením na bifidobakterie a faktory ovlivňující jejich výskyt. Dále je zde popsáno kultivační stanovení bifidobakterií ze stolice kojeneckých dárců a identifikace jednotlivých získaných izolátů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

2 Hypotéza a cíl práce

2.1 Hypotéza

Bifidobakterie jsou zdraví prospěšné mikroorganismy, které kolonizují nejen lidský gastrointestinální trakt a jsou spojovány s příznivými účinky při podpoře zdraví svého hostitele. Ve střevní mikrobiotě kojenců jsou bifidobakterie dominantní složkou. Předpokládáme, že v testovaných vzorcích stolic kojenců budou hojně detekovány typicky kojenecké druhy bifidobakterií.

2.2 Cíl práce

Cílem této práce bylo vytvoření přehledné literární rešerše na základě aktuálních vědeckých poznatků o dynamicky se rozvíjejícím rodu *Bifidobacterium*. Dalším cílem bylo stanovit kultivační počty bifidobakterií ve střevní mikrobiotě kojenců, izolace a identifikace jednotlivých detekovaných kmenů bifidobakterií, jejich selekce, následné uložení a rozšíření do sbírky bifidobakterií Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky České zemědělské univerzity v Praze pro jejich další testování.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota kojence

Lidský gastrointestinální trakt (GIT) představuje jedno z největších rozhraní (250–400 m²) mezi hostitelem, faktory prostředí a antigeny v lidském těle. Soubor bakterií, archeí a eukaryí osídlujících trávicí trakt se označuje jako střevní mikrobiota, která se po tisíce let společně s hostitelem vyvíjela a vytvořila složitý a vzájemně prospěšný vztah. Počet mikroorganismů obývajících trávicí trakt se odhaduje na více než 10¹⁴ buněk (Gill et al. 2006). Mikrobiota představuje celou populaci mikroorganismů, která osídluje určité místo a zahrnuje nejen bakterie, ale také další mikroby. Často vyskytující se pojem mikrobiom poté znamená genomický obsah mikroorganismů obývajících GIT. V lidském gastrointestinálním traktu se nachází složitá a dynamická populace těchto mikroorganismů, která má výrazný vliv na hostitele během jeho života, podílí se na udržení homeostáze a ovlivňuje propuknutí a průběh nemoci (Fanaro et al. 2003).

Střevní mikrobiota se skládá z autochtonních (původních) mikroorganismů a alochtonních (přechodných) mikroorganismů, které jsou získány z prostředí. V tomto ohledu jsou za členy střevní mikrobioty považovány pouze relativně malé počty oportunních patogenů, které nerušeně přebývají v rámci střevní mikrobioty hostitele a představují zdravotní riziko pouze v případě narušení střevního ekosystému a homeostázy střevní mikrobioty (Ventura et al., 2009). Utváření střevní mikrobiální populace je komplexním procesem, který je ovlivňován interakcemi mezi mikroby, hostitelem, vnějšími a vnitřními faktory (Fanaro et al. 2003). Složení gastrointestinální mikrobioty může být ovlivněno řadou parametrů prostředí, jako je pH, hladina kyslíku/redoxní stav, dostupnost živin, aktivita vody a teplota, což umožňuje různým populacím prosperovat a vyvíjet různé aktivity při interakci s prostředím, včetně prostředí lidského hostitele. Důležití a rozmanití členové lidské střevní mikrobioty hrají klíčovou úlohu v udržování lidského zdraví (Relman 2012).

Střevní mikrobiota dospělých osob se stratifikuje do skupin označovaných jako enterotypy, konkrétně *Bacteroides*, *Prevotella* a *Ruminococcus* (Arumugam et al., 2011) a vyvíjí se ve třech odlišných fázích na základě dynamiky čtyř nejpočetnějších základních kmenů osídlujících gastrointestinální trakt (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Verrucomicrobia*) a změn v alfa-diverzitě. Kmeny *Bacteroidetes*, *Firmicutes* představují více než 90 % relativního zastoupení střevního mikrobiomu a hrají klíčovou roli při udržování vnitřního prostředí v rovnováze. Zbýlých 10 % tvoří *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. Vývojová fáze (měsíce 3–14), ve které se postupně dynamicky mění zmíněné bakteriální kmeny a jejich alfa-diverzita, přechodná fáze (měsíce 15–30), ve které se dále vyvíjejí zejména *Bacteroidetes* a *Proteobacteria* a jejich alfa-diverzita se dále mění a stabilní fáze, ve které se přítomné fyly a alfa-diverzita již nemění. Ve vývojové fázi dominují *Bifidobacterium* spp. a stabilní fáze se vyznačuje vyšší bakteriální diverzitou a převahou kmene *Firmicutes* (Segata et al. 2012).

Na utváření lidské mikrobiální mikrobioty v dětství se podílí více faktorů. Strava je nicméně považována za jeden z hlavních faktorů nejen při utváření střevní mikrobioty, ale také za významný faktor mikrobiotu ovlivňující v průběhu celého života (Thursby & Juge 2017). Lidská střevní mikrobiota v raném věku moduluje rizikové faktory související s určitými

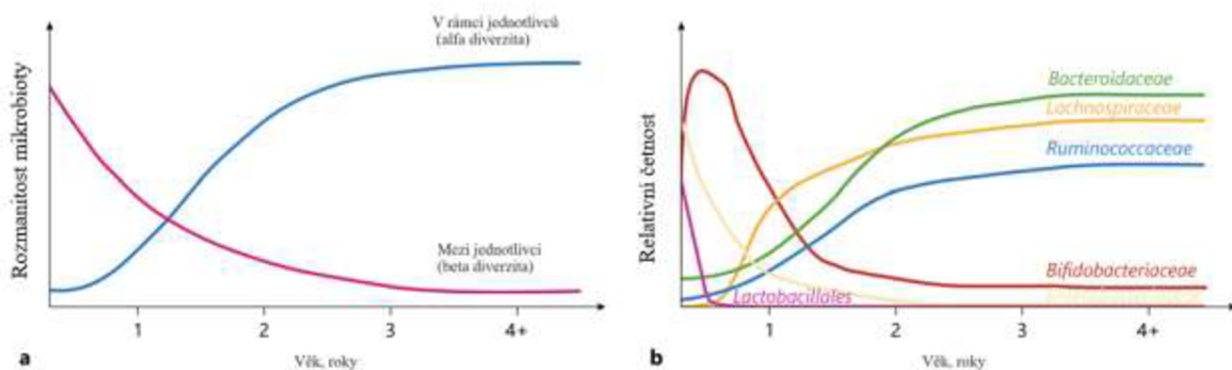
zdravotními stavy v dospělosti (Milani et al. 2017). Změny a odchylky ve složení střevní mikrobioty během novorozeneckého a kojeneckého období jsou spojovány s dětskými poruchami a vznikem onemocnění v pozdějším věku. Základ stabilní střevní mikrobioty dospělého člověka je vytvořen již v kojeneckém věku (Rautava et al. 2012).

3.1.1 Složení střevní mikrobioty

Zdravý plod je bez mikrobiálních organismů, ale během porodu a po něm se vnější povrch těla novorozence a jeho gastrointestinální trakt rychle kolonizuje značným množstvím mikroorganismů, které během několika hodin až dnů dosahují $>10^8$ mikroorganismů na gram stolice a v průběhu týdnů až měsíců se poté zvyšuje na 10^{11} – 10^{12} mikroorganismů na gram stolice, což je srovnatelné s mikrobiální hustotou zjištěnou ve střevě dospělého člověka (Blaser et al. 2021). Vývoj mikrobioty až po narození zpochybňuje pouze omezený počet studií, v nichž byly molekulárně-genetickými metodami mikroby zjištěny v děložních tkáních, jako je placenta (Thursby & Juge 2017).

V průběhu prvního roku života se gastrointestinální trakt člověka postupně vyvíjí v komplexní mikrobiální společenství. Mikrobiální diverzita se zvyšuje a složení mikrobioty konverguje k výraznému mikrobiálnímu profilu podobnému dospělému člověku. Toto společenství označované jako střevní mikrobiota interaguje s naším střevním epitelem, imunitním a nervovým systémem a ovlivňuje náš metabolismus (Laursen 2021). Kolem 2,5 roku věku se složení, rozmanitost a funkční schopnosti kojenecké mikrobioty podobají mikrobiotě dospělých (Thursby & Juge 2017).

Hlavní počáteční mikroorganismy izolované ze stolice novorozenců jsou obvykle fakultativně anaerobní bakterie, jako jsou bakterie mléčného kvašení (například rody *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Lactobacillus*), *E. coli* a další enterobakterie, stafylokoky a streptokoky (Ouwehand et al. 2002). Jejich podíl se během několika dnů až týdnů rychle snižuje a ve střevní mikrobiotě kojených dětí poté začínají převládat anaerobní bakterie, zejména z čeledi *Bifidobacteriaceae* podporované mateřským mlékem (Fanaro et al. 2003). Tyto mikroorganismy mění původně aerobní trávicí trakt na striktně anaerobní prostředí, které je vhodné pro pozdější kolonizaci dalšími obligátně anaerobními mikroorganismy. Ve stolici se poté kromě bifidobakterií objevují i klostridie a *Bacteroides* spp. (Del Chierico et al., 2015). Během vývoje střevní mikrobioty v kojeneckém a raném dětském věku do ní přibývají další aerobní bakteriální čeledi, jako jsou *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* (Obrázek 1). V raném věku je střevní mikrobiota nestabilní a méně odolná vůči změnám ve srovnání se střevní mikrobiotou dospělých. Alfa diverzita střevní mikrobioty se v závislosti na věku jedince zvyšuje až do věku kolem 3–5 let, kdy se ustálí stabilní mikrobiota podobná té dospělé. Tento jev je výsledkem individuální expozice různým environmentálním zdrojům mikroorganismů. Avšak tyto rozdíly se postupně zmenšují, když selektivní faktory, jako je strava, začínají sjednocovat složení mikrobioty (Vallès et al. 2014).



Obrázek 1: Vývoj střevní mikrobioty v raném věku
 a- Vývoj diverzity střevní mikrobioty s věkem
 b- Vývoj střevní mikrobioty v raném věku

Průměrné složení střevní mikrobioty s věkem, které ukazuje relativní četnost hlavních mikrobiálních rodů (Laursen 2021)

V určitém období kojeneckého věku již mléčná výživa nestačí pokrýt nutriční potřeby dítěte. Proto je nutné vedle mléčné výživy přikrmovat dalšími potravinami. Období přechodu od výlučné mléčné výživy k příkrmům se označuje jako komplementární výživa a obvykle zahrnuje věk 6–24 měsíců (Milani et al. 2017). Postupné ukončování mléčné výživy a progresse v příkrmování, charakterizované zvýšeným příjmem vlákniny a nových zdrojů bílkovin, vede k další diverzifikaci a vyzrávání mikrobiálního společenstva ve střevě, stejně jako k rozšíření bakteriálních produktů sacharolytického a proteolytického metabolismu. Tímto procesem dojde k posunu střevní mikrobioty a metabolismu k rozmanitějšímu společenstvu podobnému dospělému se zvýšeným výskytem bakteriálních taxonů, jako jsou *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* a *Enterobacteriaceae*. Tyto bakterie produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), a to konkrétně zejména butyrát, propionát a acetát, které jsou bohatým zdrojem energie pro hostitele (Macfarlane & Macfarlane, 2003).

Kojení udržuje střevní mikrobiotu ve stavu nízké diverzity. Vzhledem k obsahu oligosacharidů mateřského mléka, dochází k podpoře růstu specifických druhů bifidobakterií, kterou jsou proto dominantně zastoupeným rodem bakterií ve střevní mikrobiotě kojenců. Mají totiž sacharolytický typ metabolismu, který některým kmenům umožňuje právě jejich utilizaci, čímž jim zajišťuje konkurenční výhodu ve střevní mikrobiotě. Vyprodukované metabolity poté mají významné fyziologické účinky, které mohou přispívat k ochraně před řadou infekčních a imunitních onemocnění (Lozupone et al., 2012).

3.1.2 Funkce střevní mikrobioty

Jak již bylo uvedeno, střevní mikrobiota nese významnou funkční roli při udržování střevního zdraví a lidského zdraví jako celku (Jandhyala et al. 2015). Udržuje symbiotický vztah se střevní sliznicí a u zdravého jedince vykonává důležité metabolické, imunologické a střevní ochranné funkce, které ovlivňují fyziologii střeva i celého systému. Dále také využívá živiny ze složek nestrávené diety hostitele a z buněk střevního epitelu, což jí umožňuje plnit rozsáhlé metabolické úkoly a vykazuje vysokou schopnost adaptace a plasticity ve své funkci (Ouwehand et al. 2002). Mikrobiota trávicího traktu má také zásadní význam pro syntézu základních vitaminů, které si hostitel nedokáže sám vyrobit a jsou tedy pro něho esenciální.

Například bakterie mléčného kvašení jsou klíčovými mikroorganismy pro produkci vitamínu B12. Mezi další vitamíny, které střevní mikrobiota prokazatelně syntetizuje patří vitamin K, riboflavin, biotin, kyselina nikotinová, kyselina panthotenová, pyridoxin a thiamin (LeBlanc et al. 2013). Střevní mikrobiota také může metabolizovat žlučové kyseliny, které nejsou reabsorbovány pro biotransformaci na sekundární žlučové kyseliny (Staley et al. 2017).

Bifidobakterie obývající střevo kojenců se podílejí na produkci některých metabolitů, které zprostředkovávají komunikaci mezi střevem a mozkem a jsou důležité pro neurologický vývoj. Mezi ně patří tryptofan (esenciální aminokyselina, přítomná v bílkovinách) a odvozené metabolity, které jsou důležité pro střevní a systémovou homeostázu a mají pozitivní vliv na neurologické funkce (Saturio et al. 2021b). Převažující druhy bifidobakterií v dětském střevě jsou schopny produkovat kyselinu indol-3-mléčnou (ILA), metabolit odvozený od tryptofanu a zejména bifidobakterie z dětského střeva produkují více ILA než bifidobakterie přítomné ve střevě dospělého člověka (Ehrlich et al., 2020).

3.1.3 Eubióza a dysbióza střevní mikrobioty u kojenců

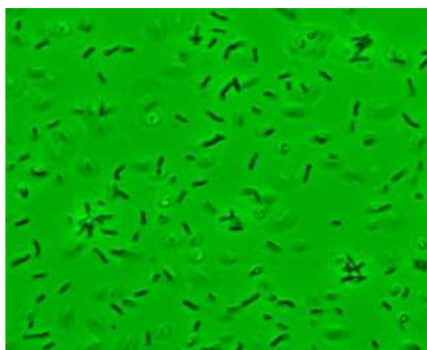
Vývoj mikrobioty trávicího traktu v prvním roce života je úzce spojen s případnou pozdější náchylností k řadě onemocnění (Thursby & Juge, 2017). Eubióza představuje harmonický stav, kdy mikrobiální společenství funguje v mezidruhovém rovnováze. Existuje však možnost, že mechanismy pro udržování střevního zdraví budou narušeny v důsledku změněného mikrobiálního složení, tzv. dysbiózy, která je často doprovázena přemnožením potenciálně patogenních bakterií nebo mikroskopických hub ve spojení s výraznou ztrátou mikrobiální diverzity nebo klíčových funkčních skupin, doprovázenou zánětlivou reakcí hostitele, a tedy přispíváním k rozvoji onemocnění (Manichanh et al., 2006). Dysbióza je obvykle spojena se škodlivými účinky na celkové zdraví organismu a může mít dlouhodobé důsledky vedoucí k poruchám nebo onemocněním, včetně obezity, diabetu, alergických onemocnění, rakoviny tlustého střeva a zánětlivých střevních onemocnění (Penders et al., 2007).

Některé studie prokázaly, že u kojenců léčených antibiotiky i po krátkou dobu dochází ke změně jejich bakteriálního profilu. Tento proces je charakterizován snížením biodiverzity mikroorganismů. Současně se zvyšuje množství bakterií, které mohou být potenciálně škodlivé a odolné vůči antibiotikům a dochází ke snížení počtu bakterií, které by mohly být prospěšné, jako jsou bifidobakterie a laktobacily. Tyto časné dysbiózy se projevují i po několika týdnech od podání antibiotik, což naznačuje možné dlouhodobé důsledky dysbiózy spojené s časným užíváním antibiotik (Gibson et al., 2015).

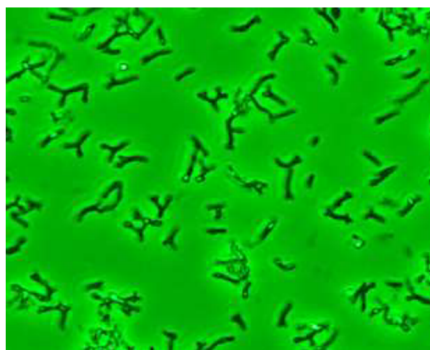
3.2 Bifidobakterie

Tissier na počátku 20. století (1900) jako první informoval o izolaci druhu *Bifidobacterium* (tehdy pod názvem *Bacillus bifidus communis*) ze stolice kojeneho dítěte. Později byly zařazeny do čeledi *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus bifidum*) a to až do roku 1924, kdy se objevily na seznamu *L. bifidum* byl Orla-Jensenem překlasifikován do nového rodu *Bifidobacterium*. Bifidobakterie jsou striktně anaerobní, i když některé druhy, konkrétně *B. indicum* a *B. asteroides*, snášejí mírné množství kyslíku (Tanaka et al. 2018). Jsou grampozitivní, heterofermentativní, nepohyblivé, nesporulující a nevláknité polymorfní tyčinkovité bakterie s vysokým obsahem G+C (od 42 do 67 mol% guaninu a cytosinu) ve svých

DNA bázích. Buňky bifidobakterií jsou charakteristické svým nepravidelným tvarem různě dlouhých tyčinek, které mohou být krátké (Obrázek 2), zakřivené, válcovité se zaobleným koncem nebo mají nepravidelný tvar připomínající písmena V nebo Y (Obrázek 3).



Obrázek 3: Pravidelné tyčinky - *B. breve*, vzorek 8 (J. Hašková)



Obrázek 2: Tyčinky ve tvaru Y - *B. dentium*, vzorek 9 (J. Hašková)

Většina lidských kmenů bifidobakterií roste při optimální teplotě 36–38 °C. Bifidobakterie jsou mikrobi tolerantní ke kyselinám a jejich optimální pH pro růst je 6–7 (Leahy et al. 2005). Bifidobakterie produkují kyselinu mléčnou jako jeden ze svých konečných produktů fermentace, stejně jako významné množství kyseliny octové (Pokusaeva et al., 2011).

Mezi již jmenované nejdominantnější fyly osídlující střevní mikrobiotu dospělého člověka patří Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes a Bacteroidetes, přičemž výrazně menší zastoupení má Actinobacteria (do něhož patří rod *Bifidobacterium*) a Proteobacteria. U dospělých jsou tyto fyly v rozporu s mikrobiálním složením pozorovaným v kojeneckém věku, kde jsou *Bifidobacterium* spp. významně hojnější (Stuivenberg et al. 2022). Rod *Bifidobacterium* tedy zastává nejvýznamnější mikrobiální členy ve střevě zdravých, kojeneckých dětí. Toto nadměrné zastoupení v raném střevním prostředí potvrzuje jejich významnou roli v kojeneckém vývoji popsaným výše (Bäckhed et al., 2015).

K roku 2021 zahrnuje rod *Bifidobacterium* 94 uznaných (pod)druhů; většina z nich jsou běžní obyvatelé gastrointestinálního traktu lidí a zvířat (Alessandri et al. 2021). Mezi druhy, které se nejčastěji vyskytují u lidí patří *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. dentium*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. longum* a *B. pseudolongum*, zatímco *B. animalis* subsp. *lactis* je druh, který je častěji obsažen ve fermentovaných a funkčních potravinách, a také v doplňcích stravy. Zajímavé je, že některé druhy, jako *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum* nebo *B. catenulatum*, jsou hojněji zastoupeny u dospělých. *B. bifidum* nebo *B. breve*, jsou početnější u kojenců, přičemž *B. longum* je druh nejrozšířenější v průběhu celého života napříč různými věky hostitelů (Saturio et al., 2021). *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* subsp. *infantis* má prokazatelné protizánětlivé vlastnosti, které chrání epitelální buňky před toxiny. Jednotlivé druhové rozložení závisí na faktorech prostředí, věku hostitele a lokalizaci ve střevech (Fujimura et al. 2010).

3.2.1 Taxonomie bifidobakterií

Rod *Bifidobacterium* patří do phylum Actinobacteria, třídy Actinobacteria, řádu Bifidobacteriales a čeledi *Bifidobacteriaceae*. Fylogenomika *Bifidobacterium* odhalila

relativně méně případů ztráty genů předků a více případů získání genů během evolučního vývoje tohoto rodu (Li et al. 2024). Standardními technikami pro identifikaci a typizaci bifidobakterií jsou analýzy založené na sekvenování DNA. Druhy patřící do rodu *Bifidobacterium* sdílejí vysokou podobnost sekvencí 16S rRNA a tvoří koherentní fylogenetickou jednotku (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017).

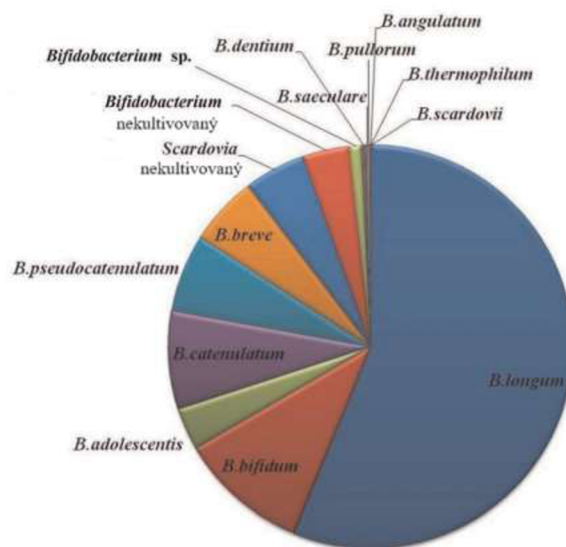
V roce 2002 byl zveřejněn první bifidobakteriální genom z kmene *B. longum*. Od té doby se počet veřejně dostupných bifidobakteriálních genomů neustále zvyšuje (Bottacini et al. 2014). Nedávná fylogenetická analýza bifidobakterií ukázala, že v rámci rodu *Bifidobacterium* existuje deset dílčích fylogenetických skupin: *B. adolescentis*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. bombi*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. psychraerophilum* a *B. tissieri*. Tyto skupiny částečně korelují s ekologickými nikami, z nichž byly reprezentativní druhy izolovány, přičemž například příslušníci skupiny *B. asteroides* jsou běžnými obyvateli mikrobioty hmyzu a příslušníci skupiny *B. pullorum* jsou charakterističtí pro ptáky (Milani et al., 2015).

B. catenulatum, *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. animalis* a *B. dentium* patří k popsáným druhům bifidobakterií osídlujících gastrointestinální trakt člověka, které jsou běžně detekovány ve vzorcích stolice (Delgado et al., 2006).

3.2.1.1 Typicky kojenecké druhy

Celkové množství bifidobakterií a zastoupení jednotlivých druhů v kojeneckém střevě se liší v rámci jedinců. Částečným důvodem je zřejmě jejich rozmanitá genová výbava. *Bifidobacterium* spp. také vykazují jak mezikmenové, tak vnitrokmenné rozdíly v metabolických a fermentačních funkcích (Stuivenberg et al., 2022). Schopnost druhů *Bifidobacterium* rozkládat sacharidy ovlivňuje jejich přítomnost a podíl na složení mikrobioty. Převaha bifidobakterií ve střevní mikrobiotě (kojených) dětí se přisuzuje schopnosti některých bifidobakteriálních druhů využívat HMO (Bottacini et al., 2014).

Na Univerzitě v Parmě v Itálii byla v roce 2012 provedena analýza jedenácti vzorků stolice odebraných od zdravých kojenců různého geografického původu (Itálie, Španělsko nebo Irsko), typu výživy (mateřské mléko nebo umělá výživa) a způsobu porodu (vaginální nebo porod císařským řezem). Složení fekální mikrobioty získané ze souboru 11 vzorků bylo analyzováno sekvenováním oblastí V6 a V8 regionů genu 16S rRNA (Sakanaka et al. 2020). Nejpočetněji zastoupenou třídou ve vzorcích kojenecké stolice byly Bifidobacteriales s 80,6% zastoupením, druhou a třetí nejpočetnější třídou byly Lactobacillales s 7,2 % a Clostridiales s 3,1 % zastoupením. Dominantními bifidobakteriálními druhy zjištěnými ve zkoumaných vzorcích kojenecké stolice byly *B. longum* s 56,2 % a *B. bifidum* s 10,7 %, dále také *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* aj. (Obrázek 4) (Turrone et al., 2012). Dominance *B. longum* a *B. bifidum* ve střevní mikrobiotě kojenců odpovídá jejich schopnosti využívat oligosacharidy pocházející od hostitele (mucin a HMO) (Bottacini et al., 2014).



Obrázek 4: Souhrnné složení mikrobioty na úrovni rodu *Bifidobacterium* u analyzovaných kojenců (Turroni et al., 2012).

3.2.2 Metabolismus sacharidů

Bifidobakterie jsou sacharolytické mikroorganismy, které hrají důležitou roli při fermentaci sacharidů v tlustém střevě (Saturio et al., 2021). Bifidobakterie významně přispívají také k metabolismu svého hostitele rozkladem rostlinných sacharidů pocházejících ze stravy (škrob, pektiny, celulóza, fruktany, glukany), které jsou schopny využívat jako zdroj uhlíku, a sacharidů dodaných hostitelem, tzv. hostitelských glykanů, konkrétně mucinů a HMO, které hrají klíčovou "prebiotickou" roli podporující růst prospěšných bakterií a vytvoření žádoucí střevní mikrobioty v raném věku. HMO jsou komplexní sacharidy, které se hojně vyskytují v mateřském mléce (Thomson et al. 2018). HMO se skládají z pěti monosacharidových stavebních kamenů: glukózy (Glc), galaktózy (Gal), N-acetylglukosaminu (GlcNAc), fukózy (Fuc) a kyseliny sialové N-acetyl-neuraminové (Neu5Ac). Kombinací těchto stavebních jednotek v definovaných glykosidických vazbách vzniká velké množství strukturně odlišných HMO (Milani et al. 2017), které jsou v mateřském mléce přítomny v koncentracích 10–15 g/l (Pokusaeva et al. 2011).

Obecně platí, že střevní bakterie degradují polymerní sacharidy na nízkomolekulární oligosacharidy, které mohou být následně degradovány na monosacharidy pomocí široké škály enzymů degradujících cukry (Garrido et al. 2013). Bifidobakteriální glykosidové hydrolázy jsou α -galaktosidázy a β -galaktosidázy. β -galaktosidázy představují nejrozšířenější prostudovanou skupinu bifidobakteriálních glykosylhydroláz s transglykosylovou aktivitou, kterou lze využít k syntéze prebiotických látek z laktózy, což jim umožňuje růst na mléce nebo substrátech odvozených z mléka, včetně laktózy (Pokusaeva et al. 2011). V případě bifidobakterií se tyto monosacharidy přeměňují na meziprodukt hexózové fermentační dráhy, nazývané také fruktózo-6-fosfátový shunt a nakonec se přeměňují na SCFA a další organické sloučeniny. Hlavním enzymem této dráhy je fruktóza-6- fosfátfosfoketoláza (Garrido et al. 2013).

Schopnost bifidobakterií metabolizovat konkrétní sacharidy je druhově a kmenově závislá. Typicky kojenecké druhy *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. bifidum* nebo *B. breve*, rozkládají HMO a využívají je jako zdroj energie, zatímco *B. longum* subsp. *longum* a jiné druhy bifidobakterií, které jsou spojovány s mikrobiotou dospělých jedinců, se vyznačují schopností fermentace zejména rostlinných oligosacharidů a HMO využít nedokáží. *B. bifidum* je dokonce schopné metabolizovat i již zmíněný mucin pocházející z hostitele (Duranti et al. 2019). K degradaci mucinu dochází postupně s odstraňováním složek monosacharidů, nikoliv s odstraňováním celé polysacharidové struktury, což vyžaduje množství enzymů s různou glykosidickou specifičností (Egan et al., 2014). Rozklad mucinu malým počtem extracelulárních bakterií produkujících glykosidázu může poskytovat nutriční podporu jiným střevním bakteriím. Navazuje se tím zajímavá kooperace na bázi živin, kdy mikrobiální druh uvolňuje hostitelské glykanové složky, které jsou následně metabolizovány jiným bakteriálním druhem (Turróni et al. 2022). Tento jev je nazýván cross-feeding (Egan et al., 2014).

3.2.3 Bifidobakterie při podpoře zdraví hostitele

Využití funkčních potravin směřujících k orálnímu podávání prospěšných bifidobakterií (probiotik), a to samostatně nebo v kombinaci se substráty (prebiotiky), které podporují růst prospěšných mikrobů ve střevě, je základem dietních intervenčních strategií pro změnu nebo zmírnění střevní dysbiózy (Tojo et al. 2014). Jasným příkladem nerovnováhy střevní mikrobioty je důsledek aplikace antibiotik k léčbě infekcí, která jsou potřebná k likvidaci patogenů. Tyto látky nicméně zároveň narušují také symbionty obývající naše střevo. Tato skutečnost spolu se zvýšenou rezistencí vůči antibiotikům zaznamenanou v posledních letech vede k zájmu o aplikaci prospěšných mikroorganismů neboli probiotik, která mají podpořit léčbu infekcí prostřednictvím obnovení střevní homeostázy (Hidalgo-Cantabrana et al. 2017). Probiotika byla definována jako živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství přinášejí hostiteli zdravotní prospěch. Historicky se výběr probiotik zakládal na technologických vlastnostech, v současné době však vědecké poznatky ukazují, že výběr probiotik musí být prováděn racionálním způsobem, zaměřeným na specifické cíle a populace (Arboleya et al., 2015).

B. animalis subsp. *lactis* se tradičně a velmi často používá v probiotických mléčných výrobcích a doplňcích stravy. Různé druhy bifidobakterií (*B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum* nebo *B. longum* subsp. *infantis*), většinou v kombinaci s druhy *Streptococcus thermophilus* anebo *Lactobacillus acidophilus*, se ukázaly jako účinné v prevenci a léčbě průjmů spojených s antibiotiky, stejně jako v prevenci nekrotizující enterokolitidy (NEC) u dětí (Tojo et al. 2014).

U předčasně narozených dětí je vysoké riziko vzniku žaludečních infekcí v důsledku nezralosti imunitního systému, antibiotické léčby a opožděné mikrobiální kolonizace. Pro předčasně narozené děti jsou obvykle používány probiotika obsahující bakterie a v menší míře kvasinky, které jsou spojovány se zdravým vývojem střev a imunitní funkcí (Alfaleh & Anabrees 2014). Nejvíce studované jsou bifidobakterie a laktobacily, dále *S. thermophilus* a kvasinka *Saccharomyces boulardii*. Probiotické bakterie fermentují nestravitelné sacharidy, jako jsou HMO, které jsou hojně obsaženy v mateřském mléce, na finální produkty SCFA, které mají příznivé účinky na zdraví střev. Některé bifidobakterie jsou obzvláště silnými

producenty acetátu, který zlepšuje funkci střevní bariéry a snižuje pH střevního prostředí, což jsou obecné atributy zdravého střeva. Jiné komenzálové pak přeměňují acetát a laktát produkovaný laktobacily a bifidobakteriemi na butyrát, který je zdrojem energie pro kolonocyty a je považován za protizánětlivý (DeVeaux et al., 2023).

3.3 Faktory ovlivňující výskyt bifidobakterií

Vývoj a stabilita střevní mikrobioty z hlediska taxonomického složení a diverzity se liší podle různých faktorů, jako je způsob porodu, způsob výživy již od prvních dní, užívání antibiotik, prebiotická a probiotická suplementace a další faktory prostředí, které budou níže detailněji popsány.

3.3.1 Prenatální vývoj jedince

Po více než sto let byl plod považován za sterilní a kolonizace mikroorganismy se tedy předpokládala až během porodu a po něm. Nedávné zprávy však naznačují, že již během života plodu může být lidský organismus vystaven jak patogenním, tak komenzálním mikroorganismům (Fujimura et al. 2010). Mikroorganismy v pupečnickové krvi, plodové vodě, placentě a fetální membráně byly detekovány po rozvoji molekulárních technik a porodnické gynekologie zaměřené na stanovení sterility během těhotenství. Doba potřebná pro kolonizaci plodu nebyla přesně odhadnuta, ale údaje naznačují, že roli hraje polykání plodové vody plodem. Složení plodové vody se v průběhu těhotenství mění a zahrnuje fetální exkřety a sekrety, hormony, růstové faktory, ale také bakteriální buňky a produkty jejich rozpadu (DiGiulio et al. 2008). Dovednost polykat se rozvíjí kolem 10 týdnů po oplodnění. Teoreticky by se bakterie mohly do těla plodu a plodových tekutin přenášet krevním řečištěm anebo vzestupem z pohlavního kanálu. Přesný mechanismus domnělého přenosu není přesně stanoven, ale spekuluje se, že se na něm mohou podílet i imunitní buňky (Perez et al. 2007). Pro kolonizaci plodu je rozhodující zdravotní stav matky, její stravovací návyky a další faktory prostředí, jako je např. vliv stresu prožitého v těhotenství nebo prenatální antibiotická terapie, kdy byla zjištěna snížená diverzita střevních bakterií potomků po léčbě matek antibiotiky (Fallani et al. 2010). Také byly provedeny některé studie, které hodnotily vliv prenatálně podávaných probiotik na střevní mikrobiotu jejich novorozenců, kdy bylo zjištěno, že *Lactobacillus* spp. byly přítomny v placentě a ve stolici donošených novorozenců, jejichž matky užívaly probiotika během těhotenství (Rautava et al. 2012). Na druhou stranu některé studie tyto zjištění zpochybňují a přiklánějí se k mikrobiální kolonizaci až v průběhu porodu (Kim et al. 2009).

3.3.2 Vliv mateřské mikrobioty

Po mnoho let je způsob porodu považován za jeden z nejdůležitějších faktorů, které utvářejí mikrobiotu nejen střeva, ale i dalších míst osídlených mikroorganismy, konkrétně také kůže, nosu, krku a ucha. Přirozeně narození novorozenci jsou kolonizováni bakteriemi žijícími v matčině pochvě a konečníku (Dominguez-Bello et al. 2010).

Porod císařským řezem v prostředí operačního sálu způsobuje opožděný kontakt novorozence s matkou a opožděné zahájení kojení. Tyto podmínky významně ovlivňují

kolonizaci novorozence a způsobují jeho osídlení primárně zejména nemocniční mikrobiotou. Naopak střevní mikrobiota novorozenců narozených přirozenou cestou je podobná střevní mikrobiotě matky. V případě novorozenců narozených císařským řezem tento vztah zjištěn nebyl (Jakobsson et al. 2014). Současně se předpokládá, že vnější perinatální faktory, jako jsou podmínky na operačním sále anebo zdravotní stav osob pečujících o novorozence, mohou být pro proces kolonizace významnější než samotný císařský řez. Zajímavé je, že se ukázalo, že je velmi důležité, zda byl císařský řez proveden elektivně, nebo zda mu předcházela fyziologický začátek porodu. Bylo zjištěno, že druhý způsob je spojen s větší podobností střevní mikrobioty ve srovnání s dětmi narozenými přirozenou cestou. Naopak u dětí narozených prostřednictvím elektivního císařského řezu se vzor střevní mikrobioty více podobal bakteriální mikrobiotě kůže matky (Chu et al. 2017) .

3.3.3 Způsob porodu

Způsob porodu má vliv na počáteční bakteriální osídlení, protože bakterie, se kterými se dítě setkává při vaginálním porodu, jsou velmi odlišné od bakterií, se kterými se setkává při porodu císařským řezem. Děti narozené císařským řezem, jak již bylo zmíněno, se setkávají především s bakteriemi z jejich prostředí, a to vzduchu a zdravotnického personálu. V této situaci se prostředí stává rozhodujícím zdrojem kolonizačních bakterií, přičemž v řadě studií byla pozorována opožděná kolonizace mateřskými bakteriemi. Ačkoli se v průběhu prvního roku života bakteriální profily stávají podobnějšími bez ohledu na způsob porodu, jejich rozdíly mohou přetrvávat po celý první rok života (Butel et al. 2018).

U vaginálně narozených dětí dochází ke kolonizaci střeva novorozence zejména mikroby asociovanými s vaginou, jako jsou rody *Lactobacillus* a *Prevotella*. Naproti tomu mikrobiota kojenců narozených císařským řezem je ochuzená a opožděná v kolonizaci rody *Bifidobacterium* a *Bacteroides*, ale je osídlená zejména rodem *Clostridium* (Dominguez-Bello et al. 2010). Děti narozené císařským řezem jsou častěji kolonizovány povrchovými bakteriemi kůže, například rody *Staphylococcus* a *Corynebacterium* (Stuivenberg et al. 2022). Fekální mikrobiota 72 % vaginálně narozených dětí se podobá fekální mikrobiotě jejich matek, u dětí narozených císařským řezem je toto procento sníženo na pouhých 41 % (Bäckhed et al. 2015).

Zajímavou skupinou jsou předčasně narození novorozenci, kteří vykazují opožděnou kolonizaci střeva komenzálními anaerobními mikroby, jako jsou rody *Bifidobacterium* a *Bacteroides*, přičemž jejich stolice naopak obsahuje výrazně vyšší množství *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. a dalších (oportunních) patogenních mikroorganismů ve srovnání se stolicí donošených novorozenců (Hill et al. 2017). Tito novorozenci jsou označováni jako předčasně narození, pokud se narodí před 37. týdnem těhotenství (Escribano et al. 2019). Složení střevní mikrobioty předčasně narozených dětí poté souvisí se zvýšeným rizikem vzniku NEC nebo sepse (Cernada et al. 2016). Kromě toho se střevní mikrobiota nedonošených dětí liší nejen složením, ale i funkcí. Hlavní SCFA produkované střevní mikrobiotou byly nalezeny v nižších hladinách ve vzorcích stolice nedonošených dětí než ve stolici dětí donošených (Arbolea et al. 2016).

3.3.4 Způsoby výživy kojence

Způsob výživy je dalším významným faktorem, který určuje časnou mikrobiální kolonizaci, a tím ovlivňuje složení střevní mikrobioty novorozence a funkci trávicího traktu (O'Sullivan et al. 2015). Kojené děti si udržují trvalé mikrobiální rozdíly, které jsou nezávislé na způsobu porodu, a to díky účinkům HMO. Lidské mléko obsahuje mnohem širší škálu cukrů než ostatní mléka savců. Až 8 % jeho kalorické hodnoty je poskytováno ve formě nestravitelných HMO (Zimmermann et al. 2019).

3.3.4.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko je považováno za přirozený a optimální způsob výživy novorozence. Jeho složení se předpokládá, že se evolucí vytvořil výhradně pro tento účel. Mateřské mléko je komplexní potrava bohatá na laktózu, mastné kyseliny a bílkoviny, které kojenci přímo dodávají energii. Podle WHO se výlučné kojení doporučuje po dobu šesti měsíců a některé zdravotní přínosy lze pozorovat u kojenců kojených do jednoho roku věku (Thomson et al. 2018). Kromě toho, že poskytuje klíčové živiny, které jsou nezbytné pro správný růst a vývoj, mateřské mléko také obsahuje širokou škálu bioaktivních látek a imunitních buněk, které mají protizánětlivé, protiinfekční a probiotické účinky. Patří mezi ně například imunoglobulin A, lysozym, laktoferin, alfa-laktalbumin, komplexní lipidy, volné oligosacharidy a další glykokonjugáty. Mateřské mléko navíc obsahuje asi 10^9 bakteriálních buněk/l a prebiotické oligosacharidy, které podporují množení probiotických mikroorganismů, jako jsou *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp. (Al-Rashidi 2022). Kojení je spojeno se značnými zdravotními výhodami, včetně ochrany kojence před průjmem, NEC, respiračními infekcemi (včetně akutního zánětu středního ucha), ústní kandidózou, enterovirovou infekcí, atopickou dermatitidou, obezitou a alergickými onemocněními. Tyto výhody jsou důležité zejména pro kojence se zvýšenou náchylností, jako jsou předčasně narozené nebo nemocné děti (Zimmermann & Curtis, 2020).

Výhradně kojení kojenci mají nižší diverzitu střevní mikrobioty s vyšším relativním zastoupením bakterií rodů *Bifidobacterium* (a vyšším počtem různých druhů bifidobakterií), *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Kojení mateřským mlékem selektuje specifické druhy *Bifidobacterium*, kdy některé z nich rozkládají HMO a výrazně dominují střevnímu ekosystému a produkují SCFA, které snižují střevní pH a vytvářejí tak prostředí nepřátelské pro patogenní bakterie. Působí protizánětlivě, chrání střevní epitel a regulují imunitní systém. Tyto vlastnosti mohou mít za následek redukované riziko infekčních a imunitních onemocnění u kojenců, u kterých se tyto druhy vyskytují (Al-Rashidi 2022).

3.3.4.2 Náhradní kojenecká výživa

Krmení kojenců umělou výživou, zejména kojeneckými formulemi, má také prokazatelný vliv na složení střevní mikrobioty s nižším zastoupením druhů *Bifidobacterium*. Tyto formule mají nedostatečný obsah prebiotických oligosacharidů (konkrétně HMO) a často obsahují vyšší množství bílkovin. Ačkoli je mnoho výrobků kojenecké výživy doplněno fruktooligosacharidy anebo galaktooligosacharidy, nejsou selektivní, protože je může využít nejen většina druhů *Bifidobacterium* (včetně *B. adolescentis*, který je typická pro dospělé jedince), ale navíc mohou

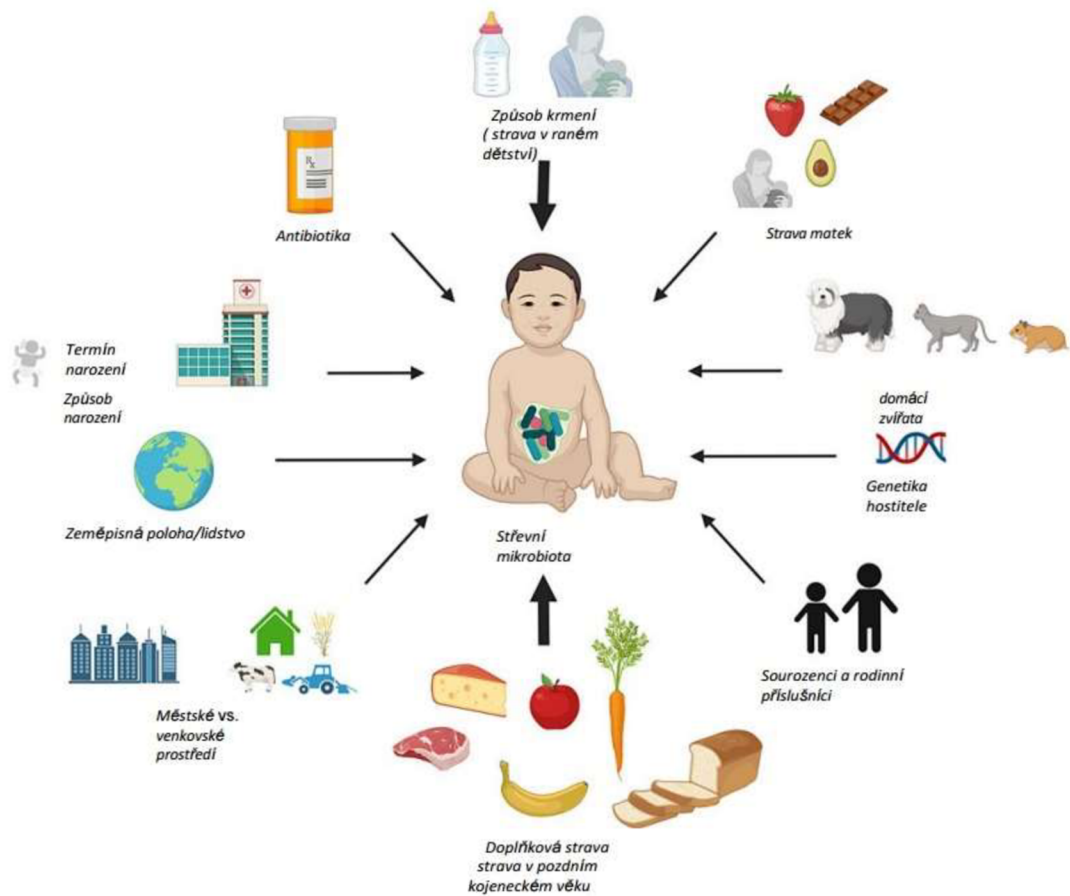
také stimulovat růst dalších mikroorganismů, jako jsou rody *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bacteroides* (Akiyama et al. 2015). V důsledku toho dochází k vytvoření rozmanitější střevní mikrobioty. Kojenci krmení formulí jsou také častěji kolonizováni oportunními patogenními a toxiny produkujícími druhy bakterií a vykazují ve střevě převážně proteolytický namísto sacharolytického metabolismu, což může mít vliv na riziko infekčních, ale i metabolických a imunitních onemocnění. Nedostatečné vyžrávání střevní mikrobioty podporované stravou během příkrmování je spojeno se špatným růstem a neurologickým, kostním a imunitním vývojem (Przyrembel 2012). Umělé mléko podporuje také množení střevních enterobakterií a enterokoků. U kojenců krmených umělou výživou mají ve střevní mikrobiotě vyšší relativní zastoupení rody *Bacteroides*, *Clostridium* (*C. difficile* a *C. perfringens*) a *Enterococcus*, a čeledi *Lachnospiraceae* a *Enterobacteriaceae* (např. *E. coli*) a další. S postupným růstem kojenců a přechodem na pevnou stravu, se zvyšuje rozmanitost jejich střevní mikrobioty a stává se podobnější mikrobiotě dospělých (Zimmermann & Curtis, 2020).

3.3.5 Vlivy vnitřního a vnějšího prostředí

Proces mikrobiální kolonizace u kojenců může ovlivňovat řada faktorů (vnitřních i vnějších), které mohou mít následně vliv na zdraví kojence (Obrázek 5) (Derrien et al. 2019). Po porodu se na novorozence různými způsoby mechanicky přenášejí mikrobi z prostředí, úst a kůže matky, což může ovlivnit rozmanitost střevní mikrobioty novorozence (Munyaka et al. 2014).

Rodinní příslušníci a blízcí příbuzní, kteří jsou s dítětem v úzkém nebo stálém kontaktu, mají přímý vliv na diverzitu mikrobů, které se přenášejí na novorozence. Kojenci ve věku 1 měsíce, kteří byli vybráni ze studie KOALA Birth Cohort Study v Nizozemsku, se staršími sourozenci měli ve střevní mikrobiotě vyšší počet bifidobakterií než kojenci bez sourozenců. Rovněž bylo zjištěno, že kojenci bez starších sourozenců měli ve střevech zvýšený podíl enterobakterií a klostridií, ale také nižší poměr anaerobů a fakultativních anaerobů (Hwang 2012). Vliv na mikrobiotu může mít i zeměpisná poloha, protože rozdíly v mikrobiotě souvisejí i se stravovacími návyky a životním stylem v určité oblasti. Kromě toho mohou mikrobiální diverzitu ovlivnit také hygienické postupy (např. čištění dudlíku dítěte sáním nebo jinými metodami). Přítomnost či nepřítomnost domácích zvířat se také podílí na počáteční mikrobiální kolonizaci kojenců. Podobně také vystavování hospodářským nebo domácím zvířatům, zejména psům, v raném věku, významně snižuje riziko astmatu anebo alergických reakcí (von Mutius 2007).

Přibývá také vědeckých důkazů o tom, že genetika hostitele ovlivňuje získávání a vývoj střevní mikrobioty kojenců. V této souvislosti byl u lidských dvojčat a rodinných příbuzných hodnocen podíl genotypu hostitele na utváření složení a struktury mikrobioty (Benson et al. 2010).



Obrázek 5: Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu (Laursen 2021) – pozn.: volně přeloženo z angličtiny

4 Metodika

Součástí této bakalářské práce bylo kultivační stanovení počtu bifidobakterií, laktobacilů a *E. coli* přítomných ve fekálních vzorcích 12 kojeneckých dárců, kojeneckým mateřským mlékem, kteří byli bez zjevných zdravotních obtíží, pomocí selektivních kultivačních médií. Dále byla provedena identifikace jednotlivých detekovaných kmenů bifidobakterií izolovaných z uvedených médií pomocí metody hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF MS. Na základě získaných výsledků byly kmeny vybrány pro jejich následné uložení do sbírky mikroorganismů Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU v Praze.

4.1 Odběr vzorku

Vzorek o váze zhruba 1 g čerstvé stolice byl odebrán matkou dítěte do předem připravené a zvážené sterilní zkumavky s fyziologickým roztokem (K_2HPO_4 1,2 g/l, KH_2PO_4 0,333 g/l; oba Lach-Ner, ČR; 75 % roztok), glycerinem (VWR, USA; 25 % roztok) a perlami pro homogenizaci vzorku. K odběru byl od rodičů podepsán informovaný souhlas. Takto odebraný vzorek byl ihned zamražen a jeho následná manipulace a transport byla prováděna na ledu. Všechny uvedené analýzy vzorků stolice kojenců byly prováděny s informovaným souhlasem zákonných zástupců kojence.

4.2 Kultivační média

Pro kultivaci a izolaci bakterií byly připraveny kultivační média. Celkové počty anaerobních bakterií byly kultivovány na neselektivním agaru Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar se sójovým peptonem (WSP). Varianty tohoto agaru obohacené o antibiotika byly poté použity pro stanovení bifidobakterií. Potřebné množství jednotlivých komponent podle požadovaného objemu na přípravu WSP agaru je uvedeno v tabulce (Tabulka 1). Anaerobní prostředí v těchto roztocích bylo zajištěno pomocí metodou roll-tube techniky podle Hungate (1969). Po odstranění kyslíku následovala sterilace média.

Tabulka 1: Médium Wilkins-Chalgren agar se sojovým peptonem na celkové počty anaerobních bakterií (WSP)

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Wilkins-Chalgren bujón (Oxoid)	33 g
Soya pepton (Oxoid)	5 g
Tween ® 80 (Sigma-Aldrich, USA)	1 ml
L-cystein (Sigma-Aldrich)	0,5 g

Agar byl společně s požadovanými ingrediencemi rozmíchán v destilované vodě a následně prošel sterilací v tlakovém hrnci po dobu 60 minut. Poté byla média přemístěna do vodní lázně predehřáté na 50 °C. Médium pro celkové počty anaerobních bakterií je takto bez dalších úprav připraveno pro použití. Jako médium pro stanovení bifidobakterií byl WSP agar obohacen o selektivní složky. První variantou byl WSP agar s antibiotikem mupirociem a kyselinou octovou (WSP-MUP), druhou pak WSP agar s mupirocinem, norloxacinem a kyselinou

octovou (WSP-NORF). Antibiotika a další složky pro selektivní úpravu médií byly přidány až po jejich vyrovnání teploty s teplotou v lázni. Složení médií pro kultivaci bifidobakterií WSP-MUP a WSP-NORF jsou zmíněna v tabulkách (Tabulka 2 a Tabulka 3).

Tabulka 2: Složení média WSP-MUP

Látka	Množství
Destilovaná voda	100 ml
Wilkins-Chalgren bujón (Oxoid)	4,3 g
Soya pepton (Oxoid)	0,5 g
Tween ® 80 (Sigma-Aldrich)	0,1 ml
L-cystein (Sigma-Aldrich)	0,05 g
Mupirocinové disky (Oxoid)	1 balení
Ledová kyselina octová	100 µl

Tabulka 3: Složení média WSP – NORF

Látka	Množství
Destilovaná voda	900 ml
Wilkins-Chalgren bujón (Oxoid)	33 g
Soya pepton (Oxoid)	5 g
Tween ® 80 (Sigma-Aldrich)	1 ml
L-cystein (Sigma-Aldrich)	0,5 g
Mupirocin (Oxoid)	200 mg
Roztok norfloxacinu (1 mg NORF/ml dH ₂ O/10 µl k. octové)	100 ml

Jako médium pro laktobacily byl použit Rogosa agar (ROG; Oxoid) dle stanoveného množství 6,9 g/100 ml, který se každých 10 minut míchal zvlášť v hrnci a tímto způsobem se rozvářel asi 45 minut. Po uplynutí 45 minut se do média přidala 98% kyselina octová (132 µl/100 ml) a ještě 5 minut se médium ponechalo v hrnci povářet a následně se také přesunulo do 50 °C vodní lázně. Pro stanovení *E. coli* byl použit chromogenní TBX agar (Tryptone Bile X-Glucuronide Medium; Oxoid) dle výrobcem uvedeného množství 3,66 g/100 ml. Po jeho vysterilování v tlakovém hrnci byl také přesunut do 50 °C vodní lázně. Po vytemperování byl asepticky rozlit na velké Petriho misky.

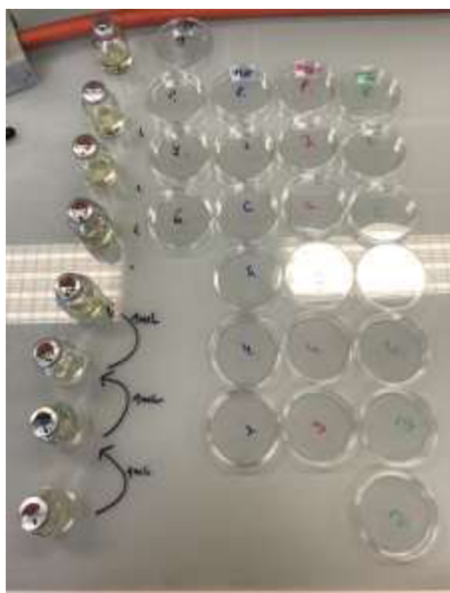
4.3 Mikrobiologický rozbor fekálních vzorků kojenců

Mikrobiologický rozbor byl proveden deskovou metodou na malých Petriho miskách. Jednotlivé vzorky byly podrobeny rozboru pomocí připravených ředících řad (Tabulka 4). Ředící řada je série roztoků s klesající koncentrací vzorku. Vzorek byl podroben desítkovému ředění až do koncentrace 10⁻⁹. Zkumavka se vzorkem stolice byla 1. ředěním, nejprve jsme zkumavku s materiálem zvážili a odečetli hmotnost zkumavky před odběrem. Vzniklým rozdílem se podělí číslo 1 a získaná hodnota uvádí množství vzorku, které bylo třeba aplikovat do 2. ředění. Poté byl po promíchání aplikován vždy 1 ml vzorku z předchozí zkumavky do následující. Tak pokračujeme, až do poslední zkumavky. Do Petriho misek byla poté

zaočkována inokula jednotlivých ředění, která byla označena konkrétní koncentrací vzorku a typem agaru. Obrázek 6 ukazuje použitá ředění při rozboru fekálního vzorku u jednotlivých medií – celkové počty (CP), bifidobakterie na WSP-MUP, bifidobakterie na WSP-NORF a laktobacily na ROG. Na obrázku nejsou zachyceny připravené nalité velké Petriho misky s TBX médiem pro detekci *E. coli*.

Tabulka 4: Složení ředících řad

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Trypton (Oxoid)	5 g
Nutrient broth (Oxoid)	5 g
Yeast extract (Sigma-Aldrich)	2,5 g
Tween ® 80 (Sigma-Aldrich)	0,5 ml
Cystein (Sigma-Aldrich)	0,25 g



Obrázek 6: Použitá ředění při rozboru fekálního vzorku u jednotlivých medií – pro celkové počty bakterií (CP), pro *Bifidobacterium* modifikovaný Wilkins-chalgren bujón s antibiotiky a kyselinou octovou (WSP-MUP, WSP-NORF) a pro *Lactobacillus* spp. Rogosa agar s kyselinou octovou (ROG) (J. Hašková)

V případě zaočkování inokula jednotlivých ředění u rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* bylo nejprve převedeno 0,5 ml inokula do Petriho misek, které poté bylo zalito odpovídajícím agarem a následně krouživým pohybem dostatečně promícháno a uzavřeno víčkem. Pro CP byl použit WSP neselektivní agar, pro *Bifidobacterium* spp. modifikované agary WSP-MUP a WSP-NORF, pro *Lactobacillus* spp. ROG a pro *E. coli* TBX agar. Při stanovení laktobacilů se vzorek přelil druhou vrstvou média, aby bylo docíleno mikroaerofilních podmínek. U *E. coli* bylo na tuhý agar očkováno 0,1 ml inokula, které bylo posléze rozetřeno sterilní hokejkou. Následně proběhla kultivace jednotlivých skupin bakterií. Pro anaerobní způsob kultivace byly použity sáčky s katalyzátory GENbag anaer (bioMérieux, Francie). Konkrétní podmínky kultivace jsou zaznamenány v tabulce 5.

Tabulka 5: Podmínky kultivace

KULTIVACE			
Skupina bakterií (kultivační médium)	TEPLOTA [°C]	ČAS [hod]	ATMOSFÉRA
Celkové počty anaerobních bakterií (WSP)	37	48	anaerobní
Bifidobakterie (WSP-MUP)	37	48	anaerobní
Bifidobakterie (WSP-NORF)	37	48	anaerobní
Laktobacily (ROG)	37	48	mikroaerofilní
<i>E. coli</i> (TBX)	37	24	aerobní

4.4 Kvantifikace a izolace narostlých kolonií

Po skončení kultivace byly nejprve odebrány za aseptických podmínek izoláty narostlých kolonií ze selektivních medií pro bifidobakterie, laktobacily a *E. coli*. Jednalo se o odebrání 6–10 různorodých kolonií z každého fekálního vzorku a druhu konkrétního média (WSP-MUP, WSP-NORF, ROG a TBX). Cílem bylo odebrat z daného vzorku, co nejvíce kolonií s rozdílnými kultivačními charakteristikami. V případě *E. coli* byly izoláty odebírány i na základě odlišnosti barev narostlých kolonií (zelená a bílá barva). Mikrobiologickou 1 μ l kličkou byla vyjmuta část izolované kolonií ze vzorků a přenesena do zkumavky s tekutým médiem modifikovaného WSP bujónu s anaerobním prostředím pro kultivaci odebraných izolátů. Takto vytvořený izolát byl kultivován při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Po izolaci narostlých kolonií byla na řadě kvantifikace. Stanovení počtu narostlých kolonií bylo provedeno pomocí digitálního počítadla (Antylia Scientific, USA). U bifidobakterií, laktobacilů a celkových počtů byl získaný počet kolonií vynásoben 2x, protože inokulační dávka byla 0,5 ml. U kolonií spočítaných na TBX byla inokulační dávka 0,1 ml a tudíž byl jejich počet vynásoben 10x. Výsledek byl vyjádřen dekadickým logaritmem jako přesný počet kolonií tvořících jednotku v 1 g fekálního vzorku dle následujícího vztahu:

$$P = \frac{P1 + P2}{11} \times (KTJ/g)$$

Kde platí:

P1, P2 – počet kolonií po dvou sobě jdoucích počítatelných plotnách

F – převrácená hodnota nejvyššího ředění

4.5 Selektce izolátů bifidobakterií, laktobacilů a *E. coli*

Po uplynutí kultivace bakteriálních izolátů WSP bujónu následovala jejich příprava pro identifikaci metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Tomu vždy předcházela mikroskopická kontrola ve fázově kontrastním mikroskopu (Nikon Eclipse E 200LED MV RS,

Japonsko), jelikož předpokladem úspěšné identifikace je vždy práce s čistou kulturou. U *E. coli* byly v mikroskopu vyšetřovány přímo narostlé kolonie, kdy byla jejich část odebrána z Petriho misky do kapky destilované vody na podložním sklíčku, zatímco u ostatních narostlých izolátů byla prováděna mikroskopická kontrola až z kapky kultury. U všech vybraných izolátů byly pořízeny fotografie.

4.6 MALDI-TOF MS analýza

MALDI-TOF MS je nástroj pro rychlou mikrobiální identifikaci a diagnostiku. Je to moderní metoda, která se řadí mezi přístrojové metody založené na hmotnostní spektrofotometrii. Výsledkem je získané hmotnostní spektrum jednotlivých vzorků, které se porovnává s databází a lze tak identifikovat zkoumané mikroorganismy (Singhal et al. 2015). Z mikroskopicky zkontrolovaných čistých izolátů byl pomocí injekční stříkačky asepticky odebrán objem 1 ml kultur do 1,5ml Eppendorf zkumavek pro identifikaci MALDI-TOF MS pro metodu ethanol-formic acid extraction dle instrukcí výrobce (Bruker Daltonik GmbH, Německo). Odebrané kultury byly odstředěny při 14500 otáčkách po dobu 2 minut. Odstředěním bylo dosaženo usazení sedimentu na dně zkumavky. Supernatant byl slit a pomocí pipety bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu (PENTA, Česká Republika), dále došlo k promíchání se vzniklým sedimentem, tzv. peletou, a za stejných podmínek byl vzorek znovu stočen v centrifuze. Opět došlo k slití a zbylý supernatant ethanolu byl odpipetován, poté se nechaly otevřené zkumavky schnout při pokojové teplotě. K takto vysušeným peletám bylo přidáno 15 μ l 70% mravenčí kyseliny (Honeywell FlukaTM, USA) a 15 μ l 100% acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Obsah byl homogenizován pomocí vortexu a odstředěn. Takto připravený supernatant byl poté pipetován ve dvou kopiích po 1 μ l na destičku MALDI target a ponechán důkladně zaschnout. Po zaschnutí byl zakryt 1 μ l HCCA matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, Bruker, Německo) a znovu ponechán zaschnout. Takto připravená destička se vzorky mohla být vložena do přístroje a analyzována. Po analýze byla získána score, která byla srovnána s dostupnou databází bakterií a poté byla interpretována podle výrobce (Bruker Daltonik GmbH, Německo), což je uvedeno v tabulce 6. Tento způsob extrakce byl použit pro identifikaci všem bakterií kromě *E. coli*. Kmeny *E. coli* byly pro identifikaci připraveny metodou EDT dle pokynů výrobce. Konkrétně byla část bakteriální biomasy přenesena sterilní plastovou špičkou na MALDI target. Poté byla přikryta 1 μ l 70% mravenčí kyseliny a ponechána zaschnout. Po zaschnutí byla analogicky překryta 1 μ l HCCA matrice a znovu ponechána zaschnout a následně mohly být vzorky změřeny.

Tabulka 6: Interpretace MALDI-TOF MS výsledků

Rozsah	Interpretace	Barva
2,00–3,00	Identifikace druhu s vysokou mírou jistoty	zelená
1,70–1,99	Identifikace s nízkou mírou jistoty – jistá rodová příslušnost	žlutá
0,00–1,69	Identifikace organismu nelze provést	červená

4.7 Rozšíření sbírky izolátů bifidobakterií, laktobacilů a *E. coli*

Izoláty vyselektované pro uložení do sbírky KMVD byly uchovány jako kryokultury a zároveň z nich byla rovnou vyizolována i DNA pro budoucí analýzy.

Pro extrakci DNA bylo odebráno 0,5 ml kultury čerstvě narostlé čisté kultury bakterií. Pomocí PrepMan Ultra™ (Applied Biosystems, USA) byla extrahována DNA dle pokynů výrobce. Zkumavky byly stočeny v centrifuze při rychlosti 14500 otáček dvě minuty. Následovalo slítí supernatantu a resuspendace usazených pelet v 50 µl PrepMan Ultra™. Vzorek byl poté vložen do termostatu při teplotě 99 °C po dobu 10 minut. Po vychladnutí byla suspenze opět stočena v centrifuze. Posledním krokem bylo přepipetování supernatantu do nové sterilní Eppendorf zkumavky bez porušení usazené pelety. Tímto způsobem byly vyizolovány vzorky DNA, které byly poté uloženy do –20 °C v mrazáku.

Pro přípravu kryokultur byl nejprve asepticky napipetován (0,12 g K₂HPO₄; 0,33 g KH₂PO₄, oba Lach-Ner, Slovensko; 0,05 g cystein Oxoid, UK; 100 ml dH₂O) s glycerolem (VWR, USA) do sterilních kryozkumavek v poměru ke kultuře 2:3. Obsah zkumavek byl poté promíchán a přemístěn do mrazáku s –20 °C. Tímto způsobem byla uchována sbírka nových divokých bakteriálních kmenů KMVD.

5 Výsledky

V rámci této bakalářské práce bylo mikrobiologické analýze podrobena celkem 12 fekálních vzorků nasbíraných od kojeneckých dárců kojených mateřským mlékem (s informovaným souhlasem), kteří byli bez zjevných zdravotních obtíží. Jednalo se o 7 kojenců ženského pohlaví a 5 kojenců mužského pohlaví různého věku v průměru $4,17 \pm 2,17$ měsíců.

5.1 Stanovené kultivační počty bakterií

Ze všech fekálních vzorků byly stanoveny celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterie, laktobacily a *E. coli*. U TBX media byly navíc rozlišeny varianty kolonií zelených, zelených s bílým středem a bílých. Kultivační počty stanovených skupin bakterií jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Množství kolonií tvořících jednotku (log KTJ/g)

Fekální vzorek	Kultivační počty v log KTJ/g fekálního vzorku						
	WSP	WSP-MUP	WSP-NORF	ROG	TBX bílé	TBX zel.	TBX bílé se zel. stř.
1	10,03	9,49	9,76	7,65	6,81	5,39	n.d.
2	8,99	7,91	10,38	5,51	6,00	6,86	5,90
3	9,34	8,20	6,56	7,66	5,95	7,07	5,78
4	11,02	7,01	10,06	9,80	n.d.	7,59	5,89
5	10,93	5,80	8,03	10,62	7,56	n.d.	n.d.
6	9,99	9,87	9,30	5,81	7,23	n.d.	6,56
7	9,71	9,13	8,92	6,87	6,62	n.d.	n.d.
8	10,03	9,96	5,95	6,68	6,60	n.d.	7,74
9	9,71	9,87	8,51	4,20	8,58	n.d.	n.d.
10	7,69	5,88	n.d.	6,55	6,54	n.d.	6,56
11	10,93	10,94	n.d.	n.d.	6,39	7,44	7,24
12	10,81	10,55	10,37	n.d.	n.d.	7,00	8,80
Průměr±SD	9,93±0,97	8,72±1,75	8,78±1,55	7,14±1,73	6,83±0,79	6,89±0,79	6,72±1,06

Vysvětlivky: WSP – celkové počty kultivovatelných anaerobních bakterií na WSP médiu; WSP-MUP – počet bakterií (bifidobakterií) narostlých na WSP médiu s mupirocinem a kyselinou octovou; WSP-NORF – počet bakterií (bifidobakterií) narostlých na WSP s norfloxacinem, mupirocinem a kyselinou octovou; ROG – počet laktobacilů narostlých na ROG médiu; TBX bílé – počet bakterií tvořících bílé kolonie na chromogenním TBX médiu; TBX zel. – počet *E. coli* tvořících zelené kolonie na chromogenním TBX médiu; TBX bílé se zel. stř. – počet *E. coli* tvořících bílé kolonie se zeleným středem na chromogenním TBX médiu; n.d. – na daném ředění nebyly detekovány žádné kolonie (detekční limit pro stanovení na WSP-NORF byl $< 3 \log \text{KTJ/g}$, $< 3 \log \text{KTJ/g}$ pro TBX).

Celkové počty kultivovatelných anaerobních bakterií dosahovaly v průměru $9,93 \pm 0,97$ log KTJ/g. Pro stanovení bifidobakterií byly použity dvě selektivní média. Průměrný počet bifidobakterií v médiu WSP-MUP byl $8,72 \pm 1,75$ log KTJ/g a u média WSP-NORF $8,78 \pm 1,55$ log KTJ/g. Pro stanovení laktobacilů bylo použito selektivní médium ROG a jejich průměrný počet byl stanoven jako $7,14 \pm 1,73$ log KTJ/g. Počty *E. coli* byly určeny na médiu TBX, na kterém byly detekovány kolonie třech různých kultivačních znaků. Počty zelených kolonií, tedy β -glukuronidáza pozitivních *E. coli*, byly v průměrné hodnotě $6,89 \pm 0,79$ log KTJ/g a počty bílých kolonií se zeleným středem, také β -glukuronidáza pozitivních *E. coli*, byly $6,72 \pm 1,06$ log KTJ/g. Počty bílých kolonií, které mohou umožnit detekci β -glukuronidáza negativních *E. coli* a dalších koliformních bakterií, byly v průměru $6,83 \pm 0,79$ log KTJ/g.

5.2 MALDI-TOF MS identifikace bakteriálních izolátů

Po proběhlé kultivaci byly z Petriho misek s počítatelnými koloniemi na selektivních mediích, tedy z WSP-MUP, WSP-NORF, ROG a TBX, na základě variability kultivačních znaků, celkem vybráno a izolováno 255 jednotlivých bakteriálních kolonií, které byly kultivovány a následně podrobeny další identifikaci. Z těchto získaných izolátů se podařilo pomocí MALDI-TOF MS zidentifikovat celkem 91 bifidobakterií, 36 laktobacilů, 56 *E. coli* a ostatních taxonů (10 stafylokoků, 9 enterokoků, 7 bakterií z rodu *Citrobacter*, 1 bakterie z rodu *Actinomyces*, 6 bakterií z rodu *Klebsiella*, 5 bakterií z rodu *Bacteroides* a 1 bakterie z rodu *Hungatella*). 203 izolátů (79,61 %) dosáhlo zeleného score, což znamená úspěšnou identifikaci na úroveň druhu s vysokou mírou jistoty. Dalších 35 izolátů (13,73 %) bylo zařazeno do žlutého score, což znamená identifikaci s nižší mírou jistoty, ale s jistou rodovou příslušností a u 17 izolátů (6,67 %) nebyla možná identifikace organismu.

U kojence 1 byly detekovány *B. breve*, *L. rhamnosus*, *E. coli* a *E. faecalis*. U kojence 2 byly naopak detekovány bifidobakteriální druhy *B. adolescentis*, *B. longum* a *B. breve* a mezi detekovaný druhy laktobacilů to byl *L. gasseri*, dále *E. coli*, *E. durans*, ale také *S. warneri* a *C. amalonauticus*. U kojence 3 byly detekovány bifidobakteriální druhy *B. breve* a *B. longum*, mezi druhy laktobacilů *L. acidophilus*, *L. reuteri* a také *E. coli*. U kojence 4 byl detekován *B. dentium*, dále *B. breve*, *L. reuteri*, *S. oralis* a *E. coli*. U kojence 5 to byly *B. dentium*, *B. bifidum*, ale také *S. epidermis*, *S. aureus* a *C. freundii*. *S. warneri*, *S. hominis*, *Cronobacter* sp., *P. ursingii*, *B. fragilis*, *L. fermentum*, *L. salivarius* byly společně s bifidobakteriálním druhem *B. animalis* a s *E. coli* detekovány u kojence 6. Jako bifidobakteriální druh u kojence 7 byl detekován *B. longum* a mezi druhy laktobacilů to byly *L. fermentum*, *L. rhamnosus* a *L. gasseri* dále také *E. faecalis*, *K. oxytoca* tvořící bílé kolonie. U kojence 8 byly detekovány *B. breve*, *L. fermentum*, ale také *E. gallinarum*, *E. coli* tvořící zelené kolonie a *K. variicola*. U kojence 9 byly detekovány *B. scardovii* vykazující se dlouhými nepravidelnými tyčinkami tvořící shluky, *B. dentium*, *L. gasseri*, *A. urogenitalis*, *C. freundii*, *C. braakii* a *K. variicola*. Kojenec 10 byl hojně detekován bakteriálními druhy *B. caccae*, *H. hathewayi*, ale také *E. coli* a *L. rhamnosus*. U kojence 11 a 12 byly detekovány *B. breve* a *E. coli*.

Nejčastějšími detekovanými bifidobakteriálními druhy u kojenců tedy byly *B. breve* (7 kmenů), *B. longum* (3 kmeny) a *B. dentium* (3 kmeny) naproti tomu méně častými to byly druhy *B. scardovii* (1 kmen), *B. adolescentis* (1 kmen), *B. bifidum* (1 kmen), *B. animalis* (1 kmen). Mezi nejčastěji detekovaný druh laktobacilů byl detekován *L. fermentum* (3 kmeny), *L. rhamnosus* (3 kmeny), *L. gasseri* (3 kmeny) a nejméně častý *L. salivarius* (1 kmen), *L. reuteri*

(1 kmen), *L. acidophilus* (1 kmen). Ve střevní mikrobiotě kojenců kojených mateřským mlékem, kteří byli bez zjevných zdravotních obtíží se podařilo také identifikovat *E. coli* (9 kmenů) a řadu dalších koliformních bakterií, jako např. *K. variicola* (2 kmeny), *C. braakii* (1 kmeny), *E. faecalis* (1 kmen), *P. ursingii* (1 kmen), *E. durans* (1 kmen).

5.3 Rozšíření bakteriální sbírky komenzálů

Na základě MALDI-TOF MS výsledků, mikroskopické kontroly čistoty kultury a hostitele pro získání jedinečných bakteriálních kmenů bylo z 255 analyzovaných izolátů vybráno 98 pro uložení do sbírky bakteriálních komenzálů KMVD ČZU v Praze. Konkrétně se jednalo o 39 bifidobakterií (druhy *B. breve* (16 kmenů), *B. longum* (8 kmenů), *B. dentium* (6 kmenů), *B. animalis* (3 kmeny), *B. bifidum* (2 kmeny), *B. adolescentis* (2 kmeny), *B. scardovii* (2 kmeny), 21 laktobacilů (druhy *L. fermentum* (6 kmenů), *L. rhamnosus* (5 kmenů), *L. gasseri* (4 kmeny), *L. reuteri* (4 kmeny), *L. acidophilus* (1 kmen) a *L. salivarius* (1 kmen), *E. coli* (23 kmenů), *E. faecalis* (3 kmeny), *E. durans* (2 kmeny), *C. amalonauticus* (1 kmen), *C. freundii* (4 kmeny), *B. fragilis* (1 kmen), *B. caccae* (1 kmen), *E. gallinarum* (1 kmen), *A. urogenitalis* (1 kmen), *H. hathewayi* (1 kmen). Pro každý uložený bakteriální kmen byla do sbírky uložena i jeho DNA. V kapitole samostatné přílohy jsou uvedeny všechny uložené kmeny bakterií do sbírky. Dané divoké kmeny bifidobakterií a ostatních komenzálů od kojeneckých dárců, kteří byli kojeni mateřským mlékem a nevykazovali žádné zjevné zdravotní obtíže, jsou součástí kontrolní skupiny bifidobakteriálních druhů a ostatních komenzálů, které budou využity pro další testování v rámci navazujících projektů zahrnujících kojeneckou mikrobiotu.

6 Diskuze

Střevní mikrobiota hraje velmi důležitou roli ve vývoji imunity, výživě a zdraví kojence (Munyaka et al. 2014). Je známo, že střevní prostředí se během prvních týdnů života dítěte značně mění. Brzy po narození je střevo dítěte klasicky popisováno jako zpočátku osídlené řadou fakultativních bakterií, jako jsou zástupci *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp. a *Staphylococcus* spp. Po spotřebování dostupného kyslíku se začnou množit striktní anaeroby, včetně rodů *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a *Clostridium*. Na konci prvního roku života je poté střevní mikrobiota složena převážně z anaerobních bakterií (Talarico et al. 2017). Bifidobakterie představují nejvýznamnější mikrobiální členy ve střevě zdravých kojených dětí. Toto nadměrné zastoupení v raném střevním prostředí naznačuje jejich důležitou roli v kojeneckém vývoji (Stuivenberg et al. 2022). Druhy rodu *Bifidobacterium* metabolizují širokou škálu jednoduchých a složitých sacharidů, některé z nich jsou přijímané potravou a jiné jsou odvozeny od hostitele (Ladeira et al. 2023).

Praktická část této bakalářské práce byla zaměřena na screening výskytu komenzálních bakterií ve 12 fekálních vzorcích kojenců ve věku $4,17 \pm 2,17$ měsíců, kteří byli kojeni mateřským mlékem a byli bez zjevných známek zdravotních obtíží. Celkové počty kultivovatelných anaerobních bakterií dosahovaly v průměru $9,93 \pm 0,97$ log KTJ/g. Průměrný počet bifidobakterií v médiu WSP-MUP byl $8,72 \pm 1,75$ log KTJ/g a u média WSP-NORF $8,78 \pm 1,55$ log KTJ/g. Pro stanovení laktobacilů bylo použito selektivní médium ROG a jejich průměrný počet byl stanoven jako $7,14 \pm 1,73$ log KTJ/g. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že bifidobakterie jsou nejvýznamnější skupinou kultivovatelných anaerobních komenzálů ve střevní mikrobiotě kojenců, zatímco laktobacily jsou minoritněji zastoupeny. To potvrzují studie Solís et al. (2010) a Turroni et al. (2012), ve kterých byla dominance bifidobakterií u skupiny kojenců přijímajících mateřské mléko také detekována. Přestože laktobacily nebyly u kojenců zastoupeny v tak vysokých počtech, Subramanian et al. (2014) je u bangladéšských kojenců naopak detekovali jako nejvíce zastoupenou skupinu kojeneckých komenzálů. Z hlediska zastoupení koliformních bakterií je zajímavé, že byly v této práci detekovány kolonie narostlé na TBX agaru se třemi různými kultivačními znaky, konkrétně počty zelených kolonií, tedy β -glukuronidáza pozitivních *E. coli*, byly v průměrné hodnotě $6,89 \pm 0,79$ log KTJ/g a počty bílých kolonií se zeleným středem, také β -glukuronidáza pozitivních *E. coli*, byly $6,72 \pm 1,06$ log KTJ/g. Počty bílých kolonií, které umožnily detekci β -glukuronidáza negativních *E. coli* a dalších koliformních bakterií, byly v průměru $6,83 \pm 0,79$ log KTJ/g. Na základě získaných výsledků lze tedy předpokládat, že detekované skupiny bakterií jsou hojně a běžně zastoupenými komenzály ve střevní mikrobiotě kojenců. Naše výsledky jsou ve shodě se studií KOALA Birth Cohort Study v Nizozemsku, která podrobila vzorky stolice od 1032 kojenců ve věku 1 měsíce kvantitativním testům pro stanovení počtu bifidobakterií, *E. coli*, laktobacilů a celkového počtu bakterií, kdy téměř všichni kojenci byli osídleni bifidobakteriemi a tyto bakterie převažovaly nad všemi ostatními skupinami a druhy bakterií. Podobných hodnot kultivačních počtů poté dosáhli také Penders et al. (2006), kdy také potvrdili, že většina kojenců byla kolonizována *E. coli*, a je tedy zřejmě běžnou součástí kojenecké mikrobioty obvykle až v koncentracích 10^9 KTJ/g. V rámci této studie byly detekovány i počty laktobacilů 10^8 KTJ/g a celkové počty kultivovaných anaerobních bakterií, které dosahovaly v průměru dokonce až 10^{11} KTJ/g. Při srovnání našich dat s ostatními

studiemi tedy lze konstatovat, že bifidobakterie u kojených kojenců obvykle dosahují 10^{8-9} KTJ/g, laktobacily 10^7 KTJ/g a *E. coli* 10^{6-7} KTJ/g.

Bifidobakterie tedy byly vyhodnoceny jako převažující komenzální bakterie v našich 12 fekálních vzorcích kojenců. Kolonizace bifidobakteriemi začíná již během porodu. Mikrobiální kolonizace trávicího traktu kojenců se stává komplexnější díky expozici mikroorganismům z prostředí, mateřského mléka a konzumaci potravin (Kusharyati et al. 2020). Bifidobakterie jsou důležitým rodem střevní mikrobioty a některé druhy hrají prospěšnou roli při udržování zdraví hostitele. Mateřské mléko je jednak důležitým zdrojem bifidobakterií pro kojence, ale také nezastupitelným zdrojem unikátních HMO, které podporují kolonizaci bifidobakteriemi (Talarico et al. 2017). Přeměna cukrů je ovlivněna enzymatickou aktivitou v bakteriálních buňkách. Ne všechny bakterie mohou využívat všechny typy sacharidů jako zdroje uhlíku, a to z důvodu omezené aktivity enzymů. Bifidobakterie jsou běžně schopny využívat jako zdroje uhlíku glukózu, galaktózu, laktózu, maltózu, fruktózu a řadu dalších (Kusharyati et al. 2020). Ve Finsku Grönlund et al. (2007) analyzovali 61 kojenců ve věku 1 měsíce a prokázali, že nejčastějším druhem z kojeneckých vzorků byla detekována skupina *B. longum* následovaná *B. bifidum*, *B. animalis* a *B. breve*. S tím koresponduje další studie provedená v Německu Kleessen et al. (1995), ve které vyšetřili 39 kojenců ve věku 1 měsíce a prokázali, že nejčastějším druhem byl *B. longum* subsp. *infantis*, následovaný *B. bifidum* a *B. breve*. V mezinárodním měřítku jsou tedy u kojenců nejčastěji zjišťovanými druhy *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* a *B. longum* subsp. *infantis* (Turrone et al. 2012). Což potvrzují výsledky i této bakalářské práce, kdy nejčastěji detekované bifidobakteriální druhy byly *B. breve* a *B. longum*. Méně častými detekovanými druhy poté byly *B. bifidum*, *B. scardovii* a *B. adolescentis*, který je ale typičtější pro dospělé jedince (Matsuki et al. 2003). Již dříve byla prokázána rozhodující role *B. longum* subsp. *infantis* díky jeho rozmanité genomické kapacitě a schopnosti trávit a využívat HMO. Na základě těchto zjištění by tedy mělo smysl tento druh doplňovat jako probiotikum do kojenecké výživy (Stuivenberg et al. 2022).

Je známo, že také laktobacily jsou přítomny ve střevní mikrobiotě kojenců, ačkoli jsou v tlustém střevě přítomny v nižším počtu než bifidobakterie, přesto jsou přítomny již brzy po porodu. Jejich množství je vyšší u vaginálně porozených novorozenců díky kontaktu novorozence s vaginální mikrobiotou, která může být zdrojem laktobacilů, než u novorozenců porozených císařským řezem (Milani et al. 2017). Nižší zastoupení laktobacilů ve srovnání s bifidobakteriemi u kojených kojenců bylo potvrzeno i v této práci. Jako nejčastěji detekovaný druh laktobacilů byl detekován *L. fermentum*. Podobně jeho časté zastoupení ve střevní mikrobiotě kojenců potvrzuje i studie, kdy byly ze 7 vzorků stolice pomocí sekvenování genu 16S rRNA nejčastěji izolovanými druhy laktobacilů *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* a *L. acidophilus* (Davoodabadi et al. 2015). Je zajímavé, že v mateřském mléce se nacházejí nejen bifidobakterie, ale i laktobacily. Kromě způsobu porodu je tedy mateřské mléko zřejmě velmi významným faktorem pro kolonizaci kojence a následné udržení vysokých hladin bifidobakterií a laktobacilů. Mateřské mléko totiž není pouze dalším zdrojem těchto prospěšných mikroorganismů, ale obsahuje také kolem 200 různých oligosacharidů, což ho řadí mezi primární prebiotika, podporující růst těchto bakterií, a současně tedy i mezi probiotika (Soto et al. 2014).

Kromě řady popsaných prospěšných vlastností je nicméně nutné konstatovat, že některé komenzální střevní mikroorganismy mají i patogenní potenciál (Adlerberth & Wold 2009).

Živé střevní bakterie se mohou přes střevní epitel dostat do krevního oběhu, což je proces označovaný jako translokace. Mezi translokační bakterie lze obecně zařadit například bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, stafylokoky a *Clostridium* spp., který způsobuje NEC, pozdní sepsi a zdravotní problémy v pozdějším věku, jako je astma a ekzém (Alcon-Giner et al. 2020). Translokace se zvyšuje souběžně se zvyšováním populačních hladin těchto bakterií. Zdá se, že většina obligátních anaerobů není schopna translokace, pravděpodobně proto, že v živé tkáni umírají na kyslík. Nicméně k translokaci může přispívat nezralá střevní bariéra a nedostatečně vyvinutý imunitní systém u novorozenců (Adlerberth & Wold 2009). Přestože by do této skupiny potenciálně nebezpečných komenzálních bakterií tedy spadala i námi poměrně ve vysokých počtech detekované *E. coli* a další koliformní bakterie, je pravděpodobné, že na rozvoj jejich nežádoucích vlastností, bude mít vliv i řada dalších faktorů, jako je např. jejich vyšší zastoupení ve střevní mikrobiotě nedonošených dětí (Alcon-Giner et al. 2020), podávání antibiotik, způsob krmení a bakteriální osídlení matky (Kuang et al. 2016). Proto je důležité zdůraznit zásadní funkci komenzální mikrobioty, která hostitelskému organismu za normálních podmínek poskytuje i řadu benefitů, jako např. správný vývoj imunitního systému, pozitivní vliv na ochranu lidského střeva před různými střevními infekcemi a také je spojena s produkcí prospěšných metabolitů (Yang et al. 2019). Zároveň je střevní mikrobiota dynamickou komunitou, ve které dochází k řadě interakcím a jednotliví její členové se vzájemně ovlivňují (Turroni et al. 2022). Kmeny *Lactobacillus* spp. lidského původu mají například mírnou inhibiční aktivitu vůči průjmovým *E. coli* a tyto kmeny mohou být užitečné jako kandidáti na probiotika v prevenci střevních infekcí (Davoodabadi et al. 2015). Stejně tak u bifidobakterií byl prokázán nezanedbatelný přínos pro lidský organismus. Jejich metabolity, například octová a mléčná kyselina, mají vliv na imunitu hostitele, zvyšují obranyschopnost střeva vůči patogenním bakteriím a jejich vzniklé kyselé prostředí podporuje tvorbu některých vitamínů a minerálních látek (Wong et al. 2006). Je tedy žádoucí hledat strategie podpory komenzální mikrobioty, kterými by byla podpořena její rovnováha.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vytvoření přehledné literární rešerše na základě aktuálních vědeckých poznatků o dynamicky se rozvíjejícím rodu *Bifidobacterium*. Dalším cílem bylo stanovit kultivační počty bifidobakterií ve střevní mikrobiotě kojenců, izolace a identifikace jednotlivých detekovaných kmenů bifidobakterií, jejich selekce, následné uložení a rozšíření do sbírky bifidobakterií KMVD ČZU v Praze pro jejich další testování. Hypotézou této bakalářské práce byl předpoklad hojného výskytu typicky kojeneckých druhů bifidobakterií v testovaných vzorcích stolic kojenců. Bifidobakterie představovaly dominantní složku střevní mikrobioty kojenců a v testovaných vzorcích byly hojně detekovány typicky kojenecké druhy bifidobakterií. Lze tedy konstatovat, že hypotéza byla potvrzena. Sledované komenzální skupiny bakterií dosahovaly poměrně vysokých kultivačních počtů, konkrétně bylo průměrně detekováno 10^{8-9} KTJ/g bifidobakterií, 10^7 KTJ/g laktobacilů a 10^{6-7} KTJ/g *E. coli*. Z vykultivovaných komenzálů bylo poté celkem izolováno 255 jednotlivých bakteriálních kolonií, z nichž 203 izolátů bylo zidentifikováno až na úroveň druhu pomocí MALDI-TOF MS. Poté bylo vyselektováno 98 kmenů, které byly uloženy do sbírky mikroorganismů KMVD ČZU v Praze. Konkrétně se jednalo o 39 bifidobakterií, 21 laktobacilů a 23 kmenů *E. coli*.

Nejčastějšími detekovanými bifidobakteriálními druhy u kojenců byly *B. breve*, *B. longum* a *B. dentium*, naproti tomu méně častými druhy byly *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. animalis* a *B. scardovii*. Jako nejčastěji detekované druhy laktobacilů byly detekovány *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* a méně často poté *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*. Ve střevní mikrobiotě kojenců kojených mateřským mlékem, kteří byli bez zjevných zdravotních obtíží se podařilo také identifikovat *E. coli* a řadu dalších koliformních bakterií.

8 Literatura

- Adlerberth I, Wold AE. 2009, February. Establishment of the gut microbiota in Western infants.
- Akiyama T, Kimura K, Hatano H. 2015. Diverse galactooligosaccharides consumption by bifidobacteria: Implications of β -galactosidase-LacS operon. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **79**:664–672. Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry.
- Alcon-Giner C et al. 2020. Microbiota Supplementation with Bifidobacterium and Lactobacillus Modifies the Preterm Infant Gut Microbiota and Metabolome: An Observational Study. *Cell Reports Medicine* **1**. Cell Press.
- Alessandri G, van Sinderen D, Ventura M. 2021, January 1. The genus bifidobacterium: From genomics to functionality of an important component of the mammalian gut microbiota running title: Bifidobacterial adaptation to and interaction with the host. Elsevier B.V.
- Alfaleh K, Anabrees J. 2014, April 10. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. John Wiley and Sons Ltd.
- Al-Rashidi HE. 2022, March 1. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. Elsevier B.V.
- Arboleya S et al. 2016. Impact of prematurity and perinatal antibiotics on the developing intestinal microbiota: A functional inference study. *International Journal of Molecular Sciences* **17**. MDPI AG.
- Arboleya S, Sánchez B, Milani C, Duranti S, Solís G, Fernández N, De Los Reyes-Gavilán CG, Ventura M, Margolles A, Gueimonde M. 2015. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *Journal of Pediatrics* **166**:538–544. Mosby Inc.
- Arumugam M et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174–180. Nature Publishing Group.
- Bäckhed F et al. 2015, June 1. Erratum: Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life (*Cell Host and Microbe* (2015) 17(5) (690–703)). Cell Press.
- Benson AK et al. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:18933–18938. National Academy of Sciences.
- Blaser MJ, Devkota S, McCoy KD, Relman DA, Yassour M, Young VB. 2021, December 1. Lessons learned from the prenatal microbiome controversy. BioMed Central Ltd.
- Bottacini F, Ventura M, Sinderen D van, Motherway MOC. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories* **13**. BioMed Central Ltd.

- Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Dematteis S. 2018, December 1. The developing gut microbiota and its consequences for health. Cambridge University Press.
- Cernada M, Bäuerl C, Serna E, Collado MC, Martínez GP, Vento M. 2016. Sepsis in preterm infants causes alterations in mucosal gene expression and microbiota profiles compared to non-septic twins. *Scientific Reports* **6**. Nature Publishing Group.
- Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. 2017. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature Medicine* **23**:314–326. Nature Publishing Group.
- Davoodabadi A, Dallal MMS, Lashani E, Ebrahimi MT. 2015. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology* **8**. Kowsar Medical Institute.
- Del Chierico F et al. 2015. Phylogenetic and metabolic tracking of gut microbiota during perinatal development. *PLoS ONE* **10**. Public Library of Science.
- Delgado S, Suárez A, Mayo B. 2006. Bifidobacterial diversity determined by culturing and by 16S rDNA sequence analysis in feces and mucosa from ten healthy spanish adults. *Digestive Diseases and Sciences* **51**:1878–1885.
- Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. 2019, December 1. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. Elsevier Ltd.
- DeVeaux A, Ryou J, Dantas G, Warner BB, Tarr PI. 2023. Microbiome-targeting therapies in the neonatal intensive care unit: safety and efficacy. Taylor and Francis Ltd.
- DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, Kim CJ, Erez O, Edwin S, Relman DA. 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: A molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE* **3**.
- 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.
- Duranti S et al. 2019. *Bifidobacterium bifidum* and the infant gut microbiota: an intriguing case of microbe-host co-evolution. *Environmental Microbiology* **21**:3683–3695. Blackwell Publishing Ltd.
- Egan M, Motherway MOC, Ventura M, van Sinderen D. 2014a. Metabolism of sialic acid by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:4414–4426. American Society for Microbiology.
- Egan M, O’Connell Motherway M, Kilcoyne M, Kane M, Joshi L, Ventura M, Van Sinderen D. 2014b. Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium. *BMC Microbiology* **14**. BioMed Central.

- Ehrlich AM et al. 2020. Indole-3-lactic acid associated with Bifidobacterium-dominated microbiota significantly decreases inflammation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiology* **20**. BioMed Central Ltd.
- Escribano E, Saralegui C, Moles L, Montes MT, Alba C, Alarcón T, Lázaro-Perona F, Rodríguez JM, de Pipaón MS, del Campo R. 2019. Influence of a *Serratia marcescens* outbreak on the gut microbiota establishment process in low-weight preterm neonates. *PLoS ONE* **14**. Public Library of Science.
- Fallani M et al. 2010. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: Geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **51**:77–84.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: Composition and development. Pages 48–55 *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*.
- Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch S V. 2010, April. Role of the gut microbiota in defining human health.
- Garrido D, Ruiz-Moyano S, Jimenez-Espinoza R, Eom HJ, Block DE, Mills DA. 2013. Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* isolates. *Food Microbiology* **33**:262–270.
- Gibson MK, Crofts TS, Dantas G. 2015, October 1. Antibiotics and the developing infant gut microbiota and resistome. Elsevier Ltd.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**:1355–1359.
- Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. 2017. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiology Spectrum* **5**. American Society for Microbiology.
- Hill CJ et al. 2017. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome* **5**. BioMed Central Ltd.
- Hwang J-S. 2012. Immune Disorders and Its Correlation with Gut Microbiome. Page IMMUNE NETWORK www.immunenetwork.org. Available from www.immunenetwork.org.
- 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. BMJ Publishing Group.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* **21**:8836–8847. WJG Press.
- Kim MJ et al. 2009. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Laboratory Investigation* **89**:924–936.

- Kuang YS et al. 2016. Composition of gut microbiota in infants in China and global comparison. *Scientific Reports* **6**. Nature Publishing Group.
- Kusharyati DF, Pramono H, Ryandini D, Manshur TA, Dewi MA, Khatimah K, Rovik A. 2020. Bifidobacterium from infant stool: The diversity and potential screening. *Biodiversitas* **21**:2506–2513. Society for Indonesian Biodiversity.
- 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**. OAE Publishing Inc.
- Laursen MF. 2021, November 30. Gut Microbiota Development: Influence of Diet from Infancy to Toddlerhood. S. Karger AG.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. Pages 1303–1315 *Journal of Applied Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd.
- LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. 2013, April. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective.
- Li W et al. 2024. Genomic and functional diversity of cultivated Bifidobacterium from human gut microbiota. *Heliyon* **10**. Elsevier Ltd.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012, September 13. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota.
- Macfarlane S, Macfarlane GT. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society* **62**:67–72. Cambridge University Press (CUP).
- Manichanh C et al. 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**:205–211.
- Marcos-Fernández R, Blanco-Míguez A, Ruiz L, Margolles A, Ruas-Madiedo P, Sánchez B. 2023. Towards the isolation of more robust next generation probiotics: The first aerotolerant Bifidobacterium bifidum strain. *Food Research International* **165**. Elsevier Ltd.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R. 2003. PCR Primers for the Detection and Identification of Bifidobacteria 61 Genus-and Species-Specific PCR Primers for the Detection and Identification of Bifidobacteria. Page Issues *Intest. Microbiol.* Available from www.caister.com/bacteria-plant.
- Milani C et al. 2015. Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut. *Scientific Reports* **5**. Nature Publishing Group.
- Milani C et al. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota DOI: 10.1128/MMBR. Available from <https://doi.org/10.1128/MMBR>.
- Munyaka PM, Khafipour E, Ghia JE. 2014, October 1. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Frontiers Media S.A.*

- O'Sullivan A, Farver M, Smilowitz JT. 2015, November 13. The Influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. *Libertas Academica Ltd.*
- Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. 2002. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *D. Steinkopff-Verlag.*
- Penders J, Stobberingh EE, Brandt PAV Den, Thijs C. 2007, November. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders.
- Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics* **119**.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2011, August. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*.
- Przyrembel H. 2012. Timing of introduction of complementary food: Short- and long-term health consequences. *Annals of Nutrition and Metabolism* **60**:8–20. *S. Karger AG.*
- Rautava S, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. 2012a. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology* **102**:178–184.
- Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. 2012b, October. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease.
- Relman DA. 2012. The human microbiome: Ecosystem resilience and health. *Nutrition Reviews* **70**.
- Sakanaka M, Gotoh A, Yoshida K, Odamaki T, Koguchi H, Xiao JZ, Kitaoka M, Katayama T. 2020, January 1. Varied pathways of infant gut-associated *Bifidobacterium* to assimilate human milk oligosaccharides: Prevalence of the gene set and its correlation with bifidobacteria-rich microbiota formation. *MDPI AG.*
- Saturio S et al. 2021a. Early-life development of the bifidobacterial community in the infant gut. *International Journal of Molecular Sciences* **22**. *MDPI AG.*
- Saturio S, Nogacka AM, Alvarado-jasso GM, Salazar N, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M, Arboleya S. 2021b, December 1. Role of bifidobacteria on infant health. *MDPI.*
- Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, Huttenhower C, Izard J. 2012. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome biology* **13**.
- Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. 2014. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: Influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **59**:78–88. *Lippincott Williams and Wilkins.*
- Staley C, Weingarden AR, Khoruts A, Sadowsky MJ. 2017, January 1. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Springer Verlag.*

- Stuivenberg GA, Burton JP, Bron PA, Reid G. 2022, February 1. Why Are Bifidobacteria Important for Infants? MDPI.
- Talarico ST, Santos FE, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. 2017. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. *Clinics* **72**:154–160. Universidade de Sao Paulo.
- Tanaka K, Satoh T, Kitahara J, Uno S, Nomura I, Kano Y, Suzuki T, Niimura Y, Kawasaki S. 2018. O₂-inducible H₂O₂-forming NADPH oxidase is responsible for the hyper O₂ sensitivity of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. *Scientific Reports* **8**. Nature Publishing Group.
- Thomson P, Medina DA, Garrido D. 2018, October 1. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. Academic Press.
- Thursby E, Juge N. 2017, June 1. Introduction to the human gut microbiota. Portland Press Ltd.
- Tojo R, Suárez A, Clemente MG, De Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. 2014, November 7. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. WJG Press.
- Turroni F et al. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS ONE* **7**.
- Turroni F, Milani C, Ventura M, van Sinderen D. 2022, February 1. The human gut microbiota during the initial stages of life: insights from bifidobacteria. Elsevier Ltd.
- Vallès Y, Artacho A, Pascual-García A, Ferrús ML, Gosálbes 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**. Public Library of Science.
- Ventura M, Turroni F, Canchaya C, Vaughan EE, O’Toole PW, Van Sinderen D. 2009. Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Frontiers in Bioscience* **14**:3214–3221. Bioscience Research Institute.
- von Mutius E. 2007. Allergies, infections and the hygiene hypothesis - The epidemiological evidence. *Immunobiology* **212**:433–439. Elsevier GmbH.
- Wong JMW, De Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. 2006. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids.
- Yang B, Chen Y, Stanton C, Ross RP, Lee YK, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2019. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* composition at species level and gut microbiota diversity in infants before 6 weeks. *International Journal of Molecular Sciences* **20**. MDPI AG.
- Zimmermann P, Curtis N. 2020, July 1. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. W.B. Saunders Ltd.
- Zimmermann P, Messina N, Mohn WW, Finlay BB, Curtis N. 2019. Association between the intestinal microbiota and allergic sensitization, eczema, and asthma: A systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**:467–485. Mosby Inc.

9 Samostatné přílohy

Příloha 1: Seznam uložených kojeneckých kmenů komenzálních bakterií do sbírky KMVD ČZU v Praze

n.	Kód izolátu	ID izolátu	Kojenec	MALDI-TOF MS	Score	Uloženo
1	J1	MUP I1/8 a	1	<i>B. breve</i>	2,08	09.03.2022
2	J10	NORF I1/8 d	1	<i>B. breve</i>	1,91	09.03.2022
3	J13	LBC I1/8 a	1	<i>L. rhamnosus</i>	2,34	09.03.2022
4	J14	LBC I1/8 b	1	<i>L. rhamnosus</i>	2,13	09.03.2022
5	n°4	TBX 1/5	1	<i>E. faecalis</i>	1,85	10.03.2022
6	n°5	TBX 1/5	1	<i>E. faecalis</i>	2,04	10.03.2022
7	n°7	TBX 1/4	1	<i>E. coli</i>	2,22	10.03.2022
8	n°8	TBX 1/4	1	<i>E. coli</i>	2,35	10.03.2022
9	n°9	TBX 1/4	1	<i>E. coli</i>	2,41	10.03.2022
10	n°10	TBX 1/4	1	<i>E. coli</i>	2,20	10.03.2022
11	n°13	TBX 1/3	1	<i>E. coli</i>	2,41	10.03.2022
12	n°14	TBX 1/3	1	<i>E. coli</i>	2,33	10.03.2022
13	n°15	TBX 1/3	1	<i>E. faecalis</i>	2,29	10.03.2022
14	n°16	TBX 1/2	1	<i>E. coli</i>	2,40	10.03.2022
15	n°17	TBX 1/2	1	<i>E. coli</i>	2,32	10.03.2022
16	J19	NORF I2/6 c	2	<i>B. breve</i>	2,10	17.03.2022
17	J20	NORF I2/6 d	2	<i>B. longum</i>	2,04	17.03.2022
18	J22	NORF I2/8	2	<i>B. adolescentis</i>	1,99	17.03.2022
19	J23	MUP I2/5 a	2	<i>B. breve</i>	2,06	17.03.2022
20	J25	MUP I2/6 a	2	<i>B. adolescentis</i>	2,06	17.03.2022
21	J30	LBC I2/6	2	<i>E. durans</i>	2,29	17.03.2022
22	J32	LBC I2/4 b	2	<i>B. longum</i>	2,23	29.03.2022
23	J33	LBC I2/3	2	<i>L. gasseri</i>	2,45	29.03.2022
24	n°1	TBX 2/6	2	<i>E. coli</i>	2,41	24.03.2022
25	n°2	TBX 2/5	2	<i>E. coli</i>	2,38	24.03.2022
26	n°3	TBX 2/5	2	<i>E. coli</i>	2,35	24.03.2022
27	n°4	TBX 2/5	2	<i>C. amalonauticus</i>	2,25	24.03.2022
28	n°7	TBX 2/4	2	<i>E. coli</i>	2,32	24.03.2022
29	n°8	TBX 2/4	2	<i>E. coli</i>	2,41	24.03.2022
30	n°9	TBX 2/4	2	<i>E. coli</i>	2,26	24.03.2022
31	n°12	TBX 2/3	2	<i>E. coli</i>	2,29	24.03.2022
32	n°16	TBX 2/3	2	<i>E. coli</i>	2,20	24.03.2022
33	n°6	TBX 2/4	2	<i>E. durans</i>	2,23	25.03.2022
34	J35	LBC I3/4 a	3	<i>L. reuteri</i>	1,93	29.03.2022
35	J36	LBC I3/4 b	3	<i>L. acidophilus</i>	2,31	29.03.2022
36	J37	LBC I3/3 a	3	<i>L. reuteri</i>	1,90	29.03.2022
37	J39	LBC I3/6 a	3	<i>B. longum</i>	2,17	29.03.2022
38	J41	NORF I3/6	3	<i>B. breve</i>	2,15	29.03.2022
39	J42	NORF I3/5	3	<i>B. breve</i>	2,19	29.03.2022
40	n°1	TBX 3/3	3	<i>E. coli</i>	2,05	31.03.2022

41	n°3	TBX 3/3	3	<i>E. coli</i>	2.24	31.03.2022
42	n°7	TBX 3/3	3	<i>E. coli</i>	2.11	31.03.2022
43	n°8	TBX 3/4	3	<i>E. coli</i>	2.25	31.03.2022
44	n°11	TBX 3/6	3	<i>E. coli</i>	2.09	31.03.2022
45	J52	MUP I4/4 a	4	<i>B. dentium</i>	1.97	12.04.2022
46	J55	MUP I4/4 d	4	<i>B. dentium</i>	2.07	12.04.2022
47	J57	NORF I4/8 b	4	<i>B. breve</i>	2.10	12.04.2022
48	J61	NORF I4/7 c	4	<i>B. breve</i>	2.15	12.04.2022
49	J64	LBC I4/3 a	4	<i>L. reuteri</i>	2.25	12.04.2022
50	J66	LBC I4/3 c	4	<i>L. reuteri</i>	2.33	12.04.2022
51	n°2	TBX 4/5	4	<i>E. coli</i>	2.24	12.04.2022
52	n°3	TBX 4/6	4	<i>E. coli</i>	2.28	12.04.2022
53	J68	MUP I5/4	5	<i>B. dentium</i>	2.25	12.04.2022
54	J71	MUP I5/3 c	5	<i>B. dentium</i>	2.22	12.04.2022
55	J79	LBC I5/8 c	5	<i>B. bifidum</i>	2.33	12.04.2022
56	J81	LBC I5/ 7	5	<i>B. bifidum</i>	2.37	12.04.2022
57	n°9	TBX 5/6	5	<i>C. freundii</i>	2.23	12.04.2022
58	n°11	TBX 5/6	5	<i>C. freundii</i>	2.15	12.04.2022
59	n°16	TBX 5/4	5	<i>C. freundii</i>	2.28	12.04.2022
60	n°17	TBX 5/4	5	<i>C. freundii</i>	2.24	12.04.2022
61	J89	NORF I6/7 a	6	<i>B. animalis</i>	2.17	12.05.2022
62	J98	LBC I6/4	6	<i>L. fermentum</i>	2.15	12.05.2022
63	J99	LBC I6/3 a	6	<i>L. fermentum</i>	2.16	12.05.2022
64	J102	LBC I6/3 d	6	<i>L. salivarius</i>	2.16	12.05.2022
65	J131	NORF I6/7 b	6	<i>B. animalis</i>	2.37	26.07.2022
66	J133	MUP I6/8 a	6	<i>B. fragilis</i>	2.22	26.07.2022
67	J137	MUP I6/7 b	6	<i>B. animalis</i>	2.21	26.07.2022
68	J91	NORF I7/8 a	7	<i>B. longum</i>	2.01	12.05.2022
69	J94	NORF I7/7 b	7	<i>B. longum</i>	2.05	12.05.2022
70	J96	NORF I7/7 d	7	<i>B. longum</i>	2.12	12.05.2022
71	J104	LBC I7/4 a	7	<i>L. fermentum</i>	2.13	12.05.2022
72	J105	LBC I7/4 b	7	<i>L. fermentum</i>	2.06	12.05.2022
73	J107	LBC I7/7 a	7	<i>L. rhamnosus</i>	2.35	12.05.2022
74	J108	LBC I7/7 b	7	<i>L. gasseri</i>	2.27	12.05.2022
75	J144	MUP I7/8 b	7	<i>B. longum</i>	2.22	26.07.2022
76	J147	MUP I7/7 b	7	<i>B. longum</i>	2.17	26.07.2022
77	J109	NORF I8/6	8	<i>B. breve</i>	2.06	22.07.2022
78	J113	NORF I8/4 c	8	<i>B. breve</i>	2.15	22.07.2022
79	J115	NORF I8/3	8	<i>E. gallinarum</i>	2.05	22.07.2022
80	J125	LBC I8/4 a	8	<i>L. fermentum</i>	2.11	22.07.2022
81	J127	LBC I8/4 c	8	<i>L. fermentum</i>	2.16	22.07.2022
82	J148	MUP I8/8 a	8	<i>B. breve</i>	2.12	26.07.2022
83	J150	MUP I8/8 c	8	<i>B. breve</i>	2.14	26.07.2022
84	J120	NORF I9/4	9	<i>A. urogenitalis</i>	1.79	22.07.2022
85	J156	NORF I9/6 a	9	<i>B. scardovii</i>	2.24	26.07.2022
86	J157	NORF I9/6 b	9	<i>B. scardovii</i>	2.27	26.07.2022

87	J160	MUP I9/8 c	9	<i>B. dentium</i>	2.15	26.07.2022
88	J161	MUP I9/7 a	9	<i>B. dentium</i>	2.16	26.07.2022
89	J164	LBC I9/2 a	9	<i>L. gasseri</i>	2.31	03.08.2022
90	J165	LBC I9/2 b	9	<i>L. gasseri</i>	2.29	03.08.2022
91	J168	MUP I10/4 c	10	<i>B. caccae</i>	2.27	03.08.2022
92	J170	MUP I10/3 b	10	<i>H. hathewayi</i>	2.24	03.08.2022
93	J173	LBC I10/4 a	10	<i>L. rhamnosus</i>	2.29	03.08.2022
94	J174	LBC I10/4 b	10	<i>L. rhamnosus</i>	2.32	03.08.2022
95	J177	MUP I11/8 b	11	<i>B. breve</i>	2.00	03.08.2022
96	J179	NORF I11/8 a	11	<i>B. breve</i>	1.96	03.08.2022
97	J186	NORF I12/8 a	12	<i>B. breve</i>	2.04	03.08.2022
98	J188	NORF I12/8 c	12	<i>B. breve</i>	2.06	03.08.2022