

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Rozvoj a modulace střevní mikrobioty kojence

Bakalářská práce

Autor práce: Antonie Kryštofová

Obor studia: Výživa a potraviny (ATZD)

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Rozvoj a modulace střevní mikrobioty kojence" 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 1. května 2021

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za její rady, odborné vedení, trpělivost a ochotu mi kdykoliv během mého zaučení v laboratoři či při tvoření mé práce pomoci. Dále velké poděkování patří Ing. Nikol Modráčkové a pracovníkům v laboratoři Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky.

Rozvoj a modulace střevní mikrobioty kojence

Souhrn

Složení střevní mikrobioty kojence je kritické pro následný vývoj, správnou funkci imunitního systému, v boji s patogenními druhy mikroorganismů a v prevenci proti různým chorobám či onemocnění. Její kompozice a diverzita je individuální, avšak obecně platí, že se laktobacily a bifidobakterie řadí mezi prospěšné mikroorganismy, kdežto klostridie či enterokoky jsou spíše spjaty s nepříznivými scénáři. Kolonizace střev kojence pravděpodobně počíná již v placentě matky a po porodu je mikrobiota ovlivněna řadou faktorů. Mezi nejvlivnější faktory se řadí typ porodu, tedy vaginální či císařský řez. Dále způsob výživy, kojeneček může být vyživován kojením, sušeným mlékem či smíšenou stravou. Nejvyšší výskyt přínosných bakterií je spojován s vaginálním porodem a kojením mlékem přímo z prsu. Mezi další faktory patří užití probiotik, prebiotik a postbiotik. Mikrobiota se ustálí ve věku asi tři let a následně se svou kompozicí začne podobat mikrobiotě dospělého jedince.

Cílem této práce bylo zpravovat problematiku rozvoje střevní mikrobioty kojence a její možné modulace probiotiky a prebiotiky. Laboratorní část práce byla cílena na mikrobiologické kultivační analýzy s následnou identifikací izolátů pomocí MALDI TOF MS.

Vzorky stolice kojence narozeného vaginálním porodem byly odebírány po dobu jednoho roku (celkem analyzováno 42 vzorků). Chlapec byl částečně kojen, dokrmován kojenečnou výživou s probiotickým kmenem *Lactobacillus reuteri* a prebiotikem 2' fukosyllaktosa, od 4. měsíce stáří byla do jeho výživy postupně začleněna pevná strava. Ve vzorcích stolice kojence byl monitorován výskyt celkových počtů anaerobních bakterií, komenzálních bakterií jako jsou bifidobakterie a laktobacily, a koliformní bakterie *Escherichia coli*. V prvních vzorcích stolice (od 10. dne dále) byl detekován výskyt klostridií; *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *C. butyricum*, dále pak *Actinomyces neuii*. Z pozitivně působících bakterií byly detekovány laktobacily (*L. reuteri*, *L. rhamnosus*), bifidobakterie byly chybějící složkou mikrobioty daného kojence. Ve věku 30 dnů byly kojenci podány probiotické kapky BioLac, obsahující *Bifidobacterium breve* a *L. plantarum*. Ihned po prvním podání se bifidobakterie staly dominantní složkou mikrobioty stolice kojence v počtech více jak 10^9 KTJ/g a po celý zbytek sledování dominoval v kapkách obsažený *B. breve*. V průběhu roku byly detekovány další 3 kmeny bifidobakterií; *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis* subsp. *lactis*. Jednalo se buď o přirozenou kolonizaci nebo o ovlivnění probiotickými příkrmy (kaše) v případě *B. animalis* subsp. *lactis*. Osídlení laktobacily kolísalo kolem 10^7 KTJ/g a po celý rok dominovaly již výše zmíněné *L. reuteri*, *L. rhamnosus*. Dvakrát byl identifikován *L. fermentum* pravděpodobně ve spojitosti s různými příkrmy. V kapkách obsažený *L. plantarum* nebylo nikdy možné detekovat. Další monitorovaná bakterie byla *E. coli*, poprvé byla detekována ve věku 30 dnů, pravidelnější a vyšší kolonizace počala až v období zařazení smíšené stravy, tj. okolo 4. měsíce stáří. Podání probiotických kapek bylo zásadní, od počátku kolonizace bifidobakteriemi již klostridie nebyly více detekovány, a tak se zabránilo kojenečným kolikám. V průběhu celého roku se mikrobiota střev kojence postupně měnila v návaznosti na různá podaná probiotika, prebiotika a změny v dietě.

Klíčová slova: mikrobiota, bifidobakterie, laktobacily, kojeneček, vývoj

Development and modulation of infant intestinal microbiota

Summary

The composition of the infant gut microbiota is critical for the subsequent development, proper function of the immune system, in the fight against pathogenic species of microorganisms and in the prevention of various diseases or illnesses. Its composition and diversity are individual, but in general, lactobacilli and bifidobacteria are considered as beneficial microorganisms, while clostridia or enterococci are rather associated with adverse scenarios. Colonization of the infant's gut probably begins in the mother's placenta, and after delivery, the microbiota is affected by a number of factors. The most influential factors include the mode of delivery, ie vaginal or caesarean section. Furthermore, the feeding system, the infant can be breastfed, milk powder fed or mixed feeding. The highest abundance of beneficial bacteria is associated with vaginal delivery and breastfeeding directly from the breast. Other factors include the use of probiotics, prebiotics and postbiotics. The microbiota stabilizes at the age of about three years and then with its composition begins to resemble the adult-like microbiota.

The aim of this work was to report the development of the infant gut microbiota and its possible modulation by probiotics and prebiotics. The laboratory part of the work was focused on microbiological culture analyzes with subsequent identification of isolates using MALDI TOF MS.

Stool samples from an infant born by vaginal delivery were taken for one year (a total of 42 samples were analyzed). The boy was partially breastfed, supplemented with infant formula containing the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* and the prebiotic 2'-fukosyllactose, and from the age of 4 months, a solid diet was gradually incorporated into his diet. The incidence of total numbers of anaerobic bacteria, commensal bacteria such as bifidobacteria and lactobacilli, and coliform *Escherichia coli* was monitored in infant stool samples. Clostridia were detected among the first stool samples (from day 10 onwards); *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *C. butyricum*, then also *Actinomyces neuii*. From the beneficial bacteria were detected lactobacilli (*L. reuteri*, *L. rhamnosus*), bifidobacteria were a missing component of the infant microbiota. At 30 days of age, the infant was given BioLac probiotic drops containing *Bifidobacterium breve* and *L. plantarum*. Immediately after the first administration, bifidobacteria became the dominant component of the infant's stool microbiota in numbers greater than 10^9 CFU/g, and in the drops contained *B. breve* was dominant for the rest of the monitoring. During the year, another 3 strains of bifidobacteria were detected; *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis* subsp. *lactis*. This was either natural colonization or influenced by probiotic foods (porridge) in the case of *B. animalis* subsp. *lactis*. The population of lactobacilli fluctuated around 10^7 CFU/g and the above-mentioned *L. reuteri*, *L. rhamnosus* dominated throughout the whole year. *L. fermentum* has been identified twice, probably in connection with various foods. In the drops contained *L. plantarum* could never be detected. Another monitored bacterium was *E. coli*, which was first detected at the age of 30 days, more regular and higher colonization did not begin until the period of inclusion of a mixed diet, ie around 4 months of age. The administration of probiotic drops was crucial,

since the beginning of colonization by bifidobacteria, clostridia were no longer detected, thus preventing infant colic. Throughout the whole year, the microbiota of the infant's intestines gradually changed in connection with various administered probiotics, prebiotics and changes in diet.

Keywords: microbiota, bifidobacteria, lactobacili, infant, development

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Hypotéza a cíl práce	10
2.1	Hypotéza.....	10
2.2	Cíl práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Střevní mikrobiota	12
3.1.1	Charakteristika střevní mikrobioty	12
3.1.2	Složení střevní mikrobioty	12
3.1.3	Mikrobiota kojence.....	15
3.2	Vývoj střevní mikrobioty	15
3.2.1	Perinatální kolonizace	15
3.2.2	Rané stádium života	16
3.2.2.1	Vývoj u předčasně narozených kojenců	16
3.2.3	Dospělost a stáří	16
3.2.4	Ovlivňující faktory	17
3.2.4.1	Typ porodu	17
3.2.4.2	Způsoby výživy kojence.....	18
3.3	Možnosti modulace střevní mikrobioty	18
3.3.1	Dieta	18
3.3.1.1	Rostlinná dieta.....	20
3.3.1.2	Středomořská dieta	20
3.3.1.3	Západní dieta	20
3.3.2	Probiotika	20
3.3.2.1	Druhy probiotických bakterií	21
3.3.2.2	Vliv probiotik na mikrobiotu.....	21
3.3.2.3	Postbiotika	22
3.3.3	Prebiotika.....	22
3.3.3.1	Charakteristika prebiotik	22
3.3.3.2	Vliv prebiotik na mikrobiotu.....	23
3.3.3.3	Oligosacharidy mateřského mléka	23
3.3.4	Antibiotika.....	24
3.3.4.1	Podání během těhotenství.....	24
3.3.4.2	Podání během raného života dítěte.....	25
3.3.4.3	Rezistence na antibiotika.....	25
3.4	Metody detekce mikrobioty	26
4	Metodická část a materiál.....	29
4.1	Cíl metodiky	29
4.2	Odběr vzorků	29
4.3	Příprava vzorků.....	29
4.4	Použitá média a jejich příprava	30

4.5	Rozbor	30
4.6	Izolace kolonií	31
4.7	Výběr vhodných izolátů a kontrola čistoty	32
4.8	MALDI TOF MS stanovení.....	32
5	Výsledky	34
6	Diskuse.....	38
7	Závěr	41
8	Literatura	42
9	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Vnitřek a povrch těla obývá obrovské množství mikroorganismů. Společenství, které tyto mikroorganismy tvoří, nazýváme mikrobiota. Mikrobiota trávicího traktu, konkrétně střev, je v posledních letech středem mnoha vědeckých publikací, neboť je tato oblast velice zajímavá a skrývá značný potenciál.

Složení mikrobioty je částečně dáno genetickými predispozicemi. Přesto existuje řada faktorů, které jsou pro její modulaci naprosto klíčové. První kolonizace střev pravděpodobně počíná ještě před dovršením vývinu jedince a před samotným porodem, tedy uvnitř placenty matky. Výskyt patogenních druhů mikroorganismů v placentě je spjat s nepříznivými výsledky porodu a různými komplikacemi. Jakým způsobem matka dítě porodí, zda vaginálně nebo císařským řezem, velkým podílem ovlivní mikrobiotu během prvních měsíců života. Toto ovlivnění může dítě doprovázet i do pozdějšího věku, i když po dovršení jednoho roku již změny způsobené typem porodu nejsou tak zjevné. V případě vaginálního porodu přijde dítě do styku s mikroorganismy z kůže matky, s jejími fekálními bakteriemi a vaginální mikrobiotou. Přesto, že je u císařského řezu snaha o co největší přiblížení k prvním kolonizátorům po vaginálním porodu, dítě přijde do styku spíše s mikroby zdravotnického personálu a jejich vybavení.

Nejdůležitější a nejvlivnější období nastává záhy po porodu, jedná se o první měsíce života. Střevní mikrobiota je nejcitlivější a velice reaguje na různé podněty okolí. To nasvědčuje faktu, že mezi hlavní ovlivňující faktory patří i typ kojení a způsoby výživy kojence. Zda matka bude kojit přirozeně z prsu, přes lahev nebo bude kojenci podávat smíšenou stravu. Střevní mikrobiota se moduluje a její složení v tomto období bude ovlivňovat vývoj jedince a následně může ovlivnit i jeho zdravotní stav v budoucnu. Pomáhá mu v boji s různými druhy patogenních mikroorganismů, dokáže zlepšit jeho imunitní systém a předchází řadě různých onemocnění spojených s nerovnováhou ve střevní komunitě.

Přesto, že tyto první měsíce života kojence jsou pro správný vývoj jedince a modulaci zásadní, lze mikrobiotu ovlivnit i v pozdějším věku života, a to mnoha faktory. Jedná se zejména o dietu, podání probiotik či prebiotik. Každý jedinec má ale složení své mikrobioty jedinečné, a tak neexistuje jeden správný postup, jak mikrobiotu pozitivně modulovat.

2 Hypotéza a cíl práce

2.1 Hypotéza

Předpokládáme, že podávání vhodných probiotických bakterií, jako jsou zástupci rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, může pomoci eliminovat výskyt kojeneckých kolik a klostridií v mikrobiotě kojence.

2.2 Cíl práce

Cílem práce je zpravovat problematiku rozvoje střevní mikrobioty kojence a její možné modulace probiotiky a prebiotiky. Praktická část práce se zabývá monitoringem výskytu komenzálních bakterií jako jsou bifidobakterie, laktobacily a koliformní bakterie ve stolici konkrétního kojence v průběhu rozvoje střevní mikrobioty během prvního roku života s ohledem na aplikaci probiotik, prebiotik a změn v dietě.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota

3.1.1 Charakteristika střevní mikrobioty

Termín mikrobiota označuje ekologickou komunitu komensálů a potenciálních patogenů žijících v lidském těle (Frühauf 2017). Střeva jsou domovem trilionů mikroorganismů, přibližné množství je 10^{14} a kódují 100krát více genů než samotný lidský genom (Gill et al. 2006; Huttenhower et al. 2012). Hrají velice podstatnou roli v mnoha aspektech lidské biologie. To naznačuje, že i náš lidský genom byl formován interakcemi právě s těmito mikroby během naší koevoluce (Sonnenburg et al. 2016).

Existují tři domény života a ve střevní mikrobiotě se mohou nacházet zástupci z kterékoliv z těchto domén. Tyto domény se nazývají Archea, Bacteria a Eukarya. Tvoří mezi sebou a také s člověkem složité trofické vztahy, od symbiózy až k parazitismu (Ventura et al. 2009). Seskupení střevní mikrobioty dospělého jedince dosáhne klimaxu, a to vytvořením homeostázy mezi všemi svými členy (Tamboli et al. 2004). Narušení homeostázy zapříčiňuje celá řada faktorů a tím může vzniknout stav zvaný dysbióza (Spor et al. 2011). Dysbióza mikrobioty bývá spojována s řadou negativních a dlouhodobých následků, může vést ke vzniku různých chorob či onemocnění, včetně obezity, diabetu, Crohnovy choroby (Kim 2015) a syndromu dráždivého tračníku (Claesson et al. 2011). Přesto, že se může zdát, že neexistuje žádná jedinečná, dokonalá a optimální kompozice střevní mikrobioty, vyvážené prostředí ve střevech je pro lidské zdraví klíčové (Selber-Hnatiw et al. 2017).

Modulace střevní mikrobioty je brána jako možná cesta k léčbě mnoha onemocnění spojených s již zmíněnou dysbiózou (Cani 2018). Přesto, že za poslední roky bylo dosaženo významného pokroku ve zkompletování atlasu taxonomií, mnohem omezenějšího pokroku bylo získáno při objasňování fungování lidského střevního ekosystému, vztahů a interakcí mezi samotnými mikroorganismy a mezi mikroorganismy a hostitelem. To je jeden z důvodů, proč je rozvoj klinických terapií založených na mikrobiotě pomalejší (Lloyd-Price et al. 2016; Selber-Hnatiw et al. 2017; Vrancken et al. 2019).

3.1.2 Složení střevní mikrobioty

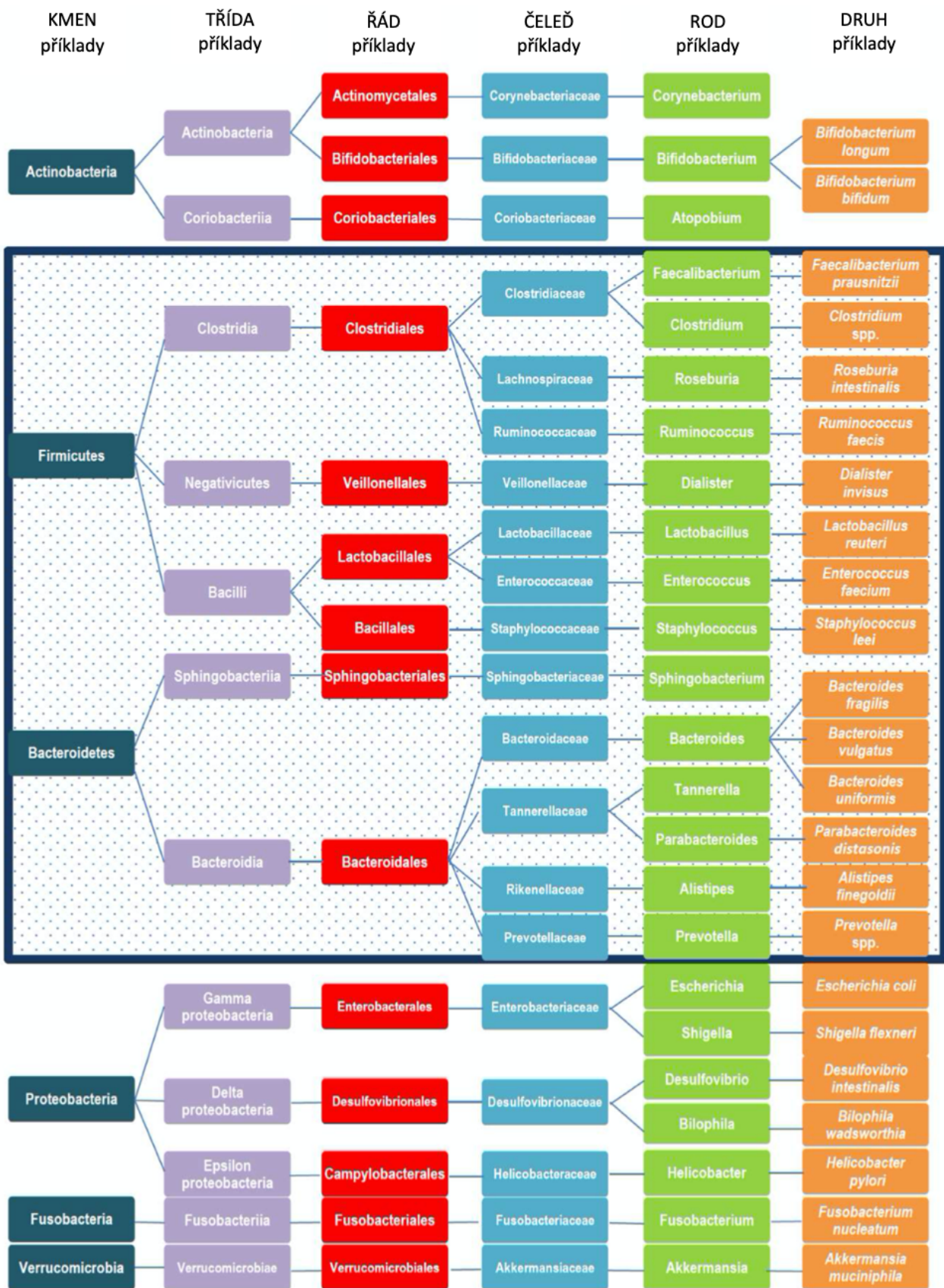
Komunita mikroorganismů sídlící v gastrointestinálním traktu člověka se skládá z různých druhů bakterií taxonomicky klasifikovaných podle rodu, čeledi, řádu a kmene. Každá lidská mikrobiota je formována, jak již bylo naznačeno, v raném věku jedince (Rinninella et al. 2019). Tvoří ji tisíce komenzálů, symbiotických druhů bakterií a mezi nimi jsou domény Bacteria, Archea, jednobuněčné Eukarya, zahrnující i houby, dále viry a další nebakteriální a nearcheální mikrobiální druhy (Lagier et al. 2016; Matijašić et al. 2020). Množství rodů bakterií osídlující gastrointestinální trakt se odhaduje na 1800 a počet druhů na 15000-36000 (Frič 2010).

Analýzy odhalily, že více než 90 % druhů bakterií nacházejících se ve střevech dospělého jedince pochází z kmenů Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria a Actinobacteria. Mezi další

kmeny se pak řadí Fusobacteria a Verrucomicrobia (Hold et al. 2002; Arumugam et al. 2011; Guinane et al. 2013)

Kmeny Bacteroidetes a Proteobacteria patří mezi Gram-negativní bakterie podílející se na trávení sacharidů, vývoji střevní mikrobioty, modulaci imunitního systému a na ochraně před kolonizací patogeny (Russell et al. 2014).

Kmen Firmicutes se skládá z více než 200 rodů, mezi které patří například *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* a *Bacillus*. Nicméně ve střevech 95 % kmene Firmicutes tvoří rod *Clostridium*. Do kmene Actinobacteria patří rod *Bifidobacterium* (Arumugam et al. 2011), který se považuje za klíčový rod bakterií u kojenců a lze ho najít u valné většiny (Milani et al. 2017). Do kmene Bacteroidetes se řadí rod *Bacteroides* a do Proteobacteria rod *Escherichia* (Arumugam et al. 2011). Příklady, jak kompozice lidské střevní mikrobioty může vypadat, jsou uvedeny v obrázku č. 1.



Obrázek č. 1 - příklady kompozice střevní mikrobioty (Rinninella et al. 2019)

3.1.3 Mikrobiota kojence

Mikrobiota kojence zaujímá důležitou roli v dalším vývoji jedince. To zahrnuje správnou funkci a vývoj imunitního systému a prevenci proti kolonizaci patogenními druhy organismů (Yassour et al. 2018). Narozdíl od dospělých jedinců je mikrobiota kojenců velmi nestabilní a dynamická (Arrieta et al. 2014). Ustálí se ve věku zhruba tří let a následně se začne přibližovat mikrobiotě dospělého jedince (Yatsunenka et al. 2012). Studie také poukazují na fakt, že lidská mikrobiota hraje značnou roli v dalším vývoji jedince (Smith et al. 2013), ve zdraví člověka a v prevenci vzniku onemocnění.

Dříve se předpokládalo, že osídlení střev kojence počíná porodem. V posledních letech se ale vyskytly důkazy, že se jistá kolonizace mikroorganismy vyskytuje již v placentě, v pupeční šňůře a v plodové vodě matky (Milani et al. 2017; Tomlinson et al. 2019).

Složení a vývoj mikrobioty kojence ovlivňuje mnoho faktorů, některé jsou součástí již perinatálního vývoje (tj. vývojem těsně před porodem, při vlastním porodu a těsně po porodu). Obecně se jedná o typ porodu a krmení kojence, užití antibiotik, dieta, věk matky, genetika a také životní styl matky nebo i mnoha předešlých generací (Milani et al. 2017).

Začátky kolonizace střev jsou do značné míry určeny prostředím, kterému je kojeneček vystaven. Děti jsou od jejich narození vystaveny různým environmentálním zdrojům bakterií, zahrnující například mikrobiotu vaginální, fekální a mikrobiotu kůže matky (Palmer et al. 2007). Otázka, které bakterie budou nakonec kolonizovat střeva jedince, je prozatím pouze částečně objasněna. Tento selekční proces může ovlivnit mnoho faktorů, jako například mikrobiální složení střev matky kojence, stav imunitního systému hostitele a také nalezené zdroje uhlíku v jedinečném prostředí střev kojence (Olszak et al. 2012; Yassour et al. 2018). V prvních dnech a měsících života kojence je mikrobiota značně variabilní a odlišná pro každého jedince a také se čteněji vyskytují populace tvořené pouze jednou taxonomickou skupinou (Palmer et al. 2007). Obecně by se dalo říci, že bifidobakterie z kmene Actinobacteria představují důležitou komenzální skupinu ve střevech kojenců a patří mezi první mikrobiální kolonizátory ve střevech. Dále jsou časté laktobacily a klostridie (Turroni et al. 2012).

3.2 Vývoj střevní mikrobioty

3.2.1 Perinatální kolonizace

Po více než století lékaři předpokládali, že struktury jako plod, děloha či placenta jsou, pokud se něco nepokazí, sterilní. Až donedávna byla tedy placenta obvykle považována za sterilní, sloužící jako bariéra proti bakteriálním infekcím a zároveň poskytující výživu rostoucímu plodu. Nedávné studie nám ale sdělují, že je zde možný výskyt mikroorganismů a může tak hrát roli ve vývoji jedince po narození a v řízení jeho raného věku života. Přítomnost patogenních bakterií v placentě je spojena s nepříznivými výsledky porodu, včetně nedonošených dětí, mrtvě narozených dětí a syndromu fetální zánětlivé odpovědi (Milani et al. 2017; Tomlinson et al. 2019). Existuje velká variabilita u detekovaných bakterií v placentě s omezeným množstvím údajů dostupných z mikrobiomu pupečnickové krve. V různých studiích se vyskytují velké rozdíly v typu a rozmanitosti bakterií detekovaných v placentě (Gil et al. 2020). Placentu ale pravděpodobně kolonizují kmény Firmicutes, Proteobacteria,

Actinobacteria a Bacteroidetes a z konkrétních rodů jsou nejčetnější stafylokoky a enterobakterie (Tuominen et al. 2018).

Z jiných struktur lze zmínit například plodovou vodu. V jisté studii se objevily důkazy, že kolonizace plodové vody je obdobná té ve vaginální flóře, se zástupci laktobacilů, streptokoků, bifidobakterií a dalších (Rehbinder et al. 2018). I přes vyskytující se studie je toto vysoce kontroverzní téma (Milani et al. 2017).

3.2.2 Rané stádium života

Ke konci prvního roku života si mikrobiota u každého kojence stále zachovává svou jedinečnost, ale pomalu se začíná podobat profilu, který je charakteristický pro gastrointestinální trakt dospělého. Každé dítě má ve střevech odlišné seskupení mikrobiálních druhů, které si získalo a udrželo. V přesném časovém vzoru se určité druhy bakterií objevují a mizí a přetrvávají týdny až měsíce (Palmer et al. 2007). Interpersonální rozdíly jsou u dětí daleko výraznější než u dospělých. Značné odchylky ve složení mikrobioty jsou též mezi jedinci žijícími v různých zemích a částech světa (Yatsunenko et al. 2012).

Často se předpokládá, že úplně prvními kolonizátory budou aerobní bakterie, jako stafylokokus, streptokokus a enterobakterie. O trochu později se začnou objevovat spíše striktní anaerobní bakterie, jako klostridie či bifidobakterie. Rod *Bacteroides* se vyskytuje téměř u všech rok starých kojenců a též u některých novorozenců (Palmer et al. 2007). U dětí žijících v Africe se objevuje rod *Prevotella*. Bifidobakterie taktéž dominují po celý první rok života kojence, i když se jejich zastoupení během tohoto období snižuje (Yatsunenko et al. 2012).

3.2.2.1 Vývoj u předčasně narozených kojenců

V prostředí NICU (Neonatal Intensive Care Unit), jednotky intenzivní péče novorozence, jsou kojenci po narození vyživováni zdravotnickým personálem, který nosí ochranné lékařské vybavení jako rukavice a pláště, tím limitují šíření kterýchkoliv mikroorganismů do mikrobiomu kojence.

V porovnání s kojenci, kteří jsou narozeni v řádném a zdravém termínu, zde dominují grampozitivní koky z čeledi *Staphylococcaceae*. Naopak kratší dobu jsou dominantní enterobakterie a kolonizace bifidobakteriemi, které bývají u kojenců častým a hojným zástupcem, je opožděná. Po měsíci vývoje již kompozice mikrobioty kojenců nevykazuje tak značné rozdíly, ale stále u těch, kteří byli narozeni předčasně, vypovídá zřetelně vyšší kolonizaci enterobakteriemi spolu s klostridii a nižší výskyt bifidobakterií. Je zde též vyšší risk kolonizace patogenními druhy mikroorganismů (Tauchi et al. 2019).

3.2.3 Dospělost a stáří

Přesto, že je mikrobiota dospělého v průběhu života spíše stabilní, mohou se objevit i výkyvy a změny v jejím složení. Může je zapříčinit například stárnutí, změna stravy

či reaktivita imunitního systému jedince. Obecně by se dalo říci, že se s přibývajícím věkem snižuje druhová rozmanitost, a to u většiny skupin mikroorganismů (Woodmansey 2007).

Pokud se porovná mikrobiota dospělého s jedincem staršího věku, objevují se rozdíly mezi mírou osídlení kmenem Firmicutes, a to třeba rodem *Clostridium*, dále kmenem Bacteroidetes (Claesson et al. 2011). Zvýšená diverzita klostridií se vyskytuje spíše u mladších dospělých (Zwielehner et al. 2009).

Dle Woodmansey (2007) se s věkem zvyšuje počet fakultativních anaerobů, fusobakterií a klostridií, zároveň se snižuje množství prospěšných mikroorganismů, jako jsou laktobacily a bifidobakterie, a dále *Bacteroides*. Podle Hopkins & Macfarlane (2002) se množství rodu *Bacteroides* s přibývajícím věkem též snižuje, ale zvyšuje se jeho druhová diverzita, a dále dle Claesson et al. (2001) a Zwielehner et al. (2009) se spolu se stárnutím může míra kolonizace *Bacteroides* zvyšovat. Výsledky jsou zde tedy nejednotné.

U mladších dospělých, do zhruba 34 let, se častěji vyskytují bifidobakterie jako například *Bifidobacterium angulatum* a *Bifidobacterium longum*. Dále také *Prevotella tanneri* a *Bacteroides ovatus* z kmene Bacteroidetes. Variabilita laktobacilů je u dospělých jedinců velká (Hopkins & Macfarlane 2002).

Starší dospělí a senioři nad 65 let častěji trpí na různé choroby a nemoci, které spolu se zvyšujícím se věkem mohou přibývat na závažnosti a složitosti. Jsou podchycovány a léčeny různými medikacemi, které následně mívají vliv právě na složení mikrobioty (Claesson et al. 2011).

3.2.4 Ovlivňující faktory

3.2.4.1 Typ porodu

Mezi dva základní typy porodu patří standartní vaginální porod a císařský řez. Ovlivňují mikrobiotu novorozenců i kojenců. Tyto změny jsou nejzřetelnější zejména během prvních tří měsíců života. Po uplynutí půl roku již změny mizí a nejsou tak značné rozdíly mezi mikrobioty dětí narozených vaginálním porodem a císařským řezem (Rutayisire et al. 2016). Dítě přivedené přirozenou cestou, tedy standartním vaginálním porodem, přijde do kontaktu s matčinou poševní mikrobiotou spolu s fekální. Oproti tomu první bakterie dětí narozených císařským řezem pochází z kůže matky. Dále novorozenci získávají bakterie i z povrchů v nemocnici a z kůže zdravotního personálu. Nejsou tedy přímo vystaveni pouze mikroorganismům, které jsou typické pro jejich matky (Biasucci et al. 2010; Sonnenburgovi 2016).

Dle Yang et al. (2019) se u kojenců narozených císařským řezem vyskytovalo asi 50 % zastoupení kmenem Firmicutes, 40 % zastoupení kmenem Proteobacteria, 10 % Actinobacteria a zanedbatelné množství kmenem Bacteroidetes. U standartního vaginálního porodu se poměry lehce liší. Nejvyšší zastoupení má též kmen Firmicutes, ale asi 40 %. Zastoupení kmene Proteobacteria bude podobné, okolo 35 %. Kmen Actinobacteria se vyskytuje hojněji, a to zhruba o polovinu, jeho zastoupení je tedy 20 %. Též bude následovat kmen Bacteroidetes, ale zde je jeho míra kolonizace asi 10 %.

Z konkrétních rodů se u standartního vaginálního porodu častěji vyskytuje *Streptococcus*, *Bacteroides* a *Bifidobacterium*, zatímco u císařského řezu spíše *Enterococcus* a *Clostridium*

(Yang et al. 2019). Rod *Bifidobacterium* je považován za přínosný v otázce vývoje imunitního systému a celkového zdraví, naopak *Clostridium* za hlavního činitele mnoha gastrointestinálních infekcí během kojeneckého věku jedince (Rutayisire et al. 2016). Dle Biasucci et al. (2010) se u císařského řezu bifidobakterie vyskytly zřídka, pouze asi z 9 % a detekované druhy byly *B. longum* a *Bifidobacterium gallicum*. U standartního vaginálního porodu byly bifidobakterie detekovány asi z 60 % a druhově značně rozmanitější. Navíc se vyskytly například druhy *B. longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium adolescentis*.

U rodu *Lactobacillus* jsou rozdíly zejména na úrovni druhů, to samé platí pro způsoby výživy kojence. Dominantní druhy ve všech skupinách jsou *Lactobacillus rhamnosus* (syn. *Lacticaseibacillus rhamnosus*) a *Lactobacillus gasseri*. Pro císařský řez mohou být typičtější druhy *Lactobacillus mucosae* (syn. *Limosilactobacillus mucosae*) a *Lactobacillus fermentum* (syn. *Limosilactobacillus fermentum*) (Yang et al. 2019).

3.2.4.2 Způsoby výživy kojence

Metoda kojení značně ovlivňuje složení a míru kolonizace mikrobioty kojence. Důležitým faktem je, zda matka kojí přirozeně přímo z prsu nebo mléko odebírá prostřednictvím pumpičky do lahve. Krmení kojence skrz láhev a nedostatečný kontakt ústní dutiny s prsem matky mohou mít nezávisle na sobě značný vliv na výskyt mikroorganismů a na zdraví kojence. Kojení kojence přes láhev je spojeno s celkově nižším výskytem mikroorganismů. Častěji se mohou objevovat čeledi *Enterococcaceae* a *Enterobacteriaceae*. Dále například čeleď *Pseudomonadaceae*, která se řadí mezi potenciálně patogenní a škodlivé druhy. U kojení přímo z prsu se častěji vyskytují bifidobakterie (Moossavi et al. 2019).

Také se rozlišuje několik typů výživy kojence. Mlékem přímo z prsu (BF; breast-fed), dále z lahve sušeným mlékem (MPF; milk-powder-fed) a smíšenou stravou (MF; mixed-fed). Hojnost zastoupení jednotlivých kmenů se zde liší. Kmen Firmicutes je nejvíce zastoupen u kojenců krmených sušeným mlékem, a to asi v 55 %. Kmeny Proteobacteria a Actinobacteria jsou naopak u sušeného mléka v porovnání se zbývajícími dvěma typy krmení zastoupeny méně. Kmeny Actinobacteria a Bacteroidetes jsou nejvíce zastoupeny u kojenců krmených mateřským mlékem přímo z prsu. Proteobacteria jsou nejčtenější u smíšené stravy.

Rod *Bifidobacterium* je nejhojnější u kojenců krmených mateřským mlékem přímo z prsu. *Enterococcus* je nejvíce zastoupen u kojenců krmených sušeným mlékem a *Clostridium* u krmení smíšenou stravou (Yang et al. 2019).

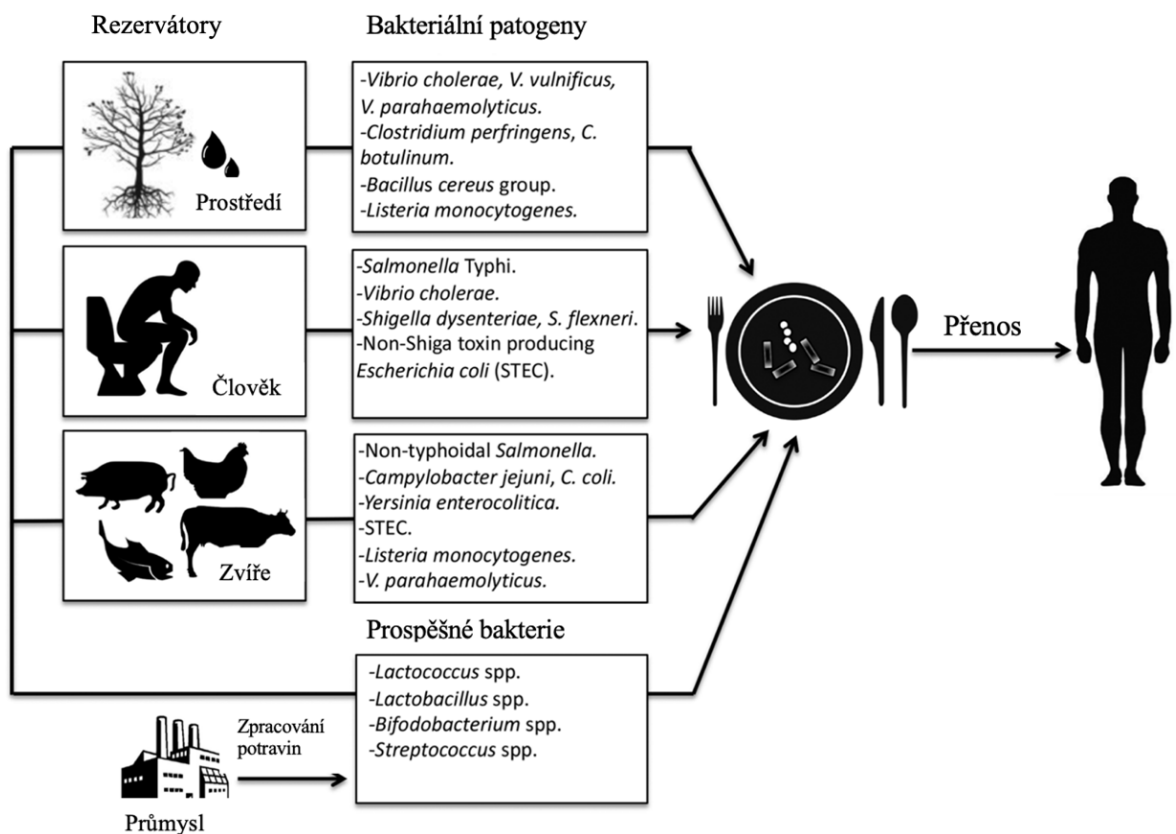
3.3 Možnosti modulace střevní mikrobioty

3.3.1 Dieta

Potraviny a strava se řadí mezi hlavní environmentální činitele formující střevní mikrobiotu, a to po celou dobu lidského života. Živiny, bioaktivní sloučeniny, specifické potraviny a stravovací návyky modulují složení a funkčnost mikrobioty, což má pozitivní nebo negativní dopad na lidské zdraví (Yang et al. 2020; Ramos & Martín 2021).

Mikroorganismy přenášené potravinami mohou být spojovány s velkým množstvím různých scénářů. Dokážou stimulovat lidské protilátky, dále uvolňovat chemické látky stimulující celkový zdravotní systém nebo také inhibovat vývoj různých nežádoucích patogenů. Jiné mikroorganismy způsobují minimální změny v hostitelské mikrobiální komunitě. Dále existují patogenní druhy, které dokáží značně narušit mikrobiotu a jsou spojovány se vznikem již zmiňované dysbiózy, též mohou být spojovány s chorobami přenášenými potravinami (Antunes et al. 2020). V zásadě je ale možné těmto chorobám předejít. Pokud se jedná o rizikového konzumenta, je důležité, aby byl poučen, kterým potravinám by se měl vyhnout a jaká preventivní opatření přijmout. Onemocnění způsobené konzumací potravin, které obsahují nežádoucí patogeny, se většinou sestává z akutních gastrointestinálních obtíží, jako je nevolnost, průjem či zvracení. Mezi rizikové mikroorganismy se řadí *Escherichia coli* či *Campylobacter* z kmene Proteobacteria (Acheson 2009).

V posledních letech se v této oblasti zvyšuje množství znalostí a zjišťuje se, které bakteriální rody a třídy nejčastěji ovlivňují hostitele skrze stravu. Příklady takových mikroorganismů jsou uvedené v obrázku č. 2. Mikrobiota hraje důležitou roli při řadě různých onemocnění, nicméně obsáhlejší informace zaměřující se na jednotlivé typy diet, které by tyto choroby díky obsahu mikroorganismů dokázaly ovlivnit a zlepšit, prozatím chybí (Josephs–Spaulding et al. 2016; Antunes et al. 2020).



Obrázek č. 2 – příklady hlavních patogenů a prospěšných bakterií přenášených z potravy do lidského těla (Antunes et al. 2020)

3.3.1.1 Rostlinná dieta

V rozvinutých zemích se vyskytuje stále více případů, kdy konzumace živočišných produktů lidem způsobila různé zdravotní komplikace a poruchy (Sakkas et al. 2020). Veganská neboli rostlinná dieta se jeví jako prospěšná pro lidské zdraví tím, že podporuje rozvoj rozmanitějších a stabilnějších mikrobiálních systémů. Má tendenci mít nízký obsah bílkovin a tuků, a naopak vysoký obsah sacharidů, vlákniny a fytochemikálií, zejména polyfenolů. Vláknina zvyšuje množství probiotických bakterií jako *Ruminococcus* nebo *Roseburia* a zároveň redukuje množství enterokoků či klostridií. Polyfenoly zvyšují četnost prospěšných bifidobakterií a laktobacilů (Tomova et al. 2019). Mezi její hlavní nedostatky se řadí již zmíněný nižší příjem určitých živin, jako jsou bílkoviny a tuky. Aby se předešlo deficitu těchto živin u konzumentů, je důležité, aby vegani dodržovali předem naplánovaný komplexní dietní plán. Existují důkazy, že tento typ diety dokáže pomoci při řadě různých chorob, ale i přes vyskytující se studie jsou její dopady na lidské zdraví a střevní mikrobiotu známé pouze částečně a je tak potřeba dalšího zkoumání (Sakkas et al. 2020).

3.3.1.2 Středomořská dieta

Nejčastěji bývá doporučována středomořská dieta (MD; mediterranean diet). Existuje mnoho důkazů o jejich příznivých účincích na mikrobiotu a celkové lidské zdraví (Dinu et al. 2018). Stravu charakterizují bohaté rostlinné potraviny, jako například zelenina, brambory, fazole a ořechy. Dále čerstvé ovoce, ryby, mléčné výrobky (zejména sýr a jogurt) a víno, v malém až středním množství (Willett et al. 1995). Tento typ stravy snižuje zastoupení klostridií, a naopak zvyšuje zastoupení laktobacilů a bifidobakterií (Rinninella et al. 2019).

3.3.1.3 Západní dieta

V dnešní době je takzvaná západní strava (WD; western diet) nejčastějším typem diety ve vyspělých zemích. Zahrnuje vysoké množství cukrů, tuků, živočišných proteinů, zároveň nízké množství prospěšné vlákniny a zeleniny. Tato strava může způsobovat střevní dysbiózu, dále obezitu a další různá onemocnění (Zinöcker & Lindseth 2018; Santos-Marcos et al. 2019). Ve srovnání se středomořskou stravou se u konzumentů vyskytuje nižší zastoupení laktobacilů a bifidobakterií. Také se snižuje četnost probiotického rodu *Roseburia* z kmene Firmicutes. Zvyšuje se zastoupení *Bacteroides* z kmene Bacteroidetes a *Enterobacteria* z kmene Proteobacteria (Rinninella et al. 2019).

3.3.2 Probiotika

Probiotika jsou živé a zdravé prospěšné mikroorganismy. Tělo je přijímá v podobě stravy či suplementů a následně s jejich pomocí dokáže zlepšit zdravotní stav jedince a ovlivnit jeho střevní mikrobiotu (Jabandžiev et al. 2019). V lidské mikrobiotě ovšem nesídlí trvale a v porovnání s rezidentními bakteriemi nejsou ani příliš početné (Sonnenburgovi 2016).

Soto et al. (2014) uvádí, že za první potenciální probiotikum novorozence lze považovat mateřské mléko, neboť obsahuje značné množství různých mikroorganismů včetně bifidobakterií a laktobacilů, konkrétně lze uvést například *B. breve*, *B. longum*, *L. fermentum*, *L. gasseri* a *Lactobacillus reuteri* (syn. *Limosilactobacillus reuteri*). Probiotické mikroorganismy je možné zkonsumovat také v nesterilizovaných kvašených potravinách, což je třeba jogurt nebo kysané okurky, či v nekvašených potravinách s přísadkou živých bakterií. Živé bakterie běžně obsahují i sýry, smetana a máslo (Sonnenburgovi 2016).

3.3.2.1 Druhy probiotických bakterií

Nejznámější probiotické bakterie jsou rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Jsou charakteristické pro zdravý střevní trakt a laktobacily též pro svou přítomnost ve fermentovaných potravinách. Jako probiotika lze použít i některé nepatogenní zástupce z rodů *Escherichia*, *Bacillus*, *Enterococcus* a *Saccharomyces*. Jak již bylo zmíněno, probiotika vykazují mnoho prospěšných vlastností, závisí ovšem na dávce a způsobu jejich podání. Vhodný popis probiotického produktu by měl obsahovat identifikaci rodu a druhu, označení kmene, životaschopný počet každého kmene ke konci trvanlivosti výrobku, doporučené podmínky skladování, přesný popis fyziologického účinku a další důležité náležitosti (Reid et al. 2003; Frič 2008). Jako konkrétní příklad lze uvést *L. rhamnosus* (Laitinen et al. 2005), *Lactobacillus casei* (syn. *Lacticaseibacillus casei*) (Merenstein et al. 2010), dále *Lactobacillus johnsonii*, *E. coli* Nissle (Jonkers et al. 2012) a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (Pärtty et al. 2013).

3.3.2.2 Vliv probiotik na mikrobiotu

Mezi konkrétní funkce probiotik se řadí například podpora tvorby hlenu pokrývající střevní stěnu. Tento hlen chrání lidskou střevní mikrobiotu před nežádoucími mikroorganismy. Dále pomáhají v boji proti gastrointestinálním infekcím, mohou mít kladný vliv při infekčním průjmu a likvidují patogeny (Sonnenburgovi 2016). Mohou se podílet na tvorbě peptidů s bakteriostatickými a baktericidními účinky, stimulovat eliminaci toxinů či regulovat funkce střevní bariéry (Frič 2008).

V případě suplementace během kojeneckého věku bude jejich podání zlepšovat imunitu, může zlepšovat náladu a s tím i zmírňovat podrážděnost. Tento scénář může nastat při podání bakterie *B. longum* subsp. *infantis* (Pärtty et al. 2013).

V dnešní době existuje řada studií dokazujících pozitivní vliv probiotik na lidské tělo. Například jeden finský vědecký tým prokázal, že podávání probiotik, konkrétně druhu *L. rhamnosus*, v perinatálním období matky může následně sloužit jako vhodná prevence či terapie alergických chorob u narozeného dítěte a snižovat riziko atopického ekzému (Laitinen et al. 2005).

Další studie nám sděluje, že denní konzumace fermentovaného kravského mléka obsahující *L. casei* může dětem pomoci v boji s gastrointestinálním onemocněním. Dále může snižovat výskyt běžných infekčních chorob (Merenstein et al. 2010).

3.3.2.3 Postbiotika

Postbiotika neobsahují živé mikroorganismy, ale zahrnují jakoukoli látku uvolňovanou nebo produkovanou metabolickou aktivitou mikroorganismů. Mají přímý nebo nepřímý příznivý účinek na hostitele. Použití metabolitů nebo fragmentů odvozených z mikroorganismů neboli postbiotik, je v moderní medicíně atraktivní terapeutickou a preventivní strategií. Podle současných údajů mají taková postbiotika pleiotropní účinky, včetně imunomodulačních, protizánětlivých, antioxidačních a protirakovinných vlastností (Zólkiewicz et al. 2020).

Jedna z jejich možných cest do lidského těla je prostřednictvím fermentovaných produktů. Specifické supernatanty kultur získaných díky bakteriální fermentaci obsahují velké množství různých látek. Fermentovaný produkt může obsahovat jak živé, tak neživé části mikroorganismu, dále jejich fragmenty, metabolity či jejich cytosol (Aguilar-Toalá et al. 2018; Jabandžiev et al. 2019).

3.3.3 Prebiotika

3.3.3.1 Charakteristika prebiotik

Prebiotika jsou definována jako substrát, který je selektivě využíván hostitelskými mikroorganismy a přináší zdravotní přínos, který musí být zdokumentován (Gibson et al. 2017). Jakákoliv složka potravy, která vstupuje do tlustého střeva, může být prebiotikem. Ve střevech jsou za pomoci původních bakterií, o nichž se předpokládá, že mají pozitivní efekt na mikrobiotu, fermentovány (Gibson 1998). Bakterie takto prebiotika využívají a zajistí si svůj růst, hojnost a dále možný kladný dopad na hostitele (Sonnenburgovi 2016). Tato fermentace dává základ účinným prebiotikům a jejich schopnosti měnit složení střevní mikrobioty směrem k prospěšnější struktuře. K tomu dojde pouze působením potenciálně prospěšných rodů bakterií, nikoli škodlivých skupin (Kolida et al. 2002).

Prebiotická kritéria splňují zejména oligosacharidy obsahující fruktózu, které se přirozeně vyskytují v různých rostlinách, jako je cibule, chřest, čekanka, banán a artyčok. Dále různé druhy vlákniny, jednoduché sacharidy, polysacharidy.

Z oligosacharidů je rozšířené a dobře dostupné prebiotikum inulin, prodává se jak ve formě potravinového doplňku, tak je možná konzumace prostřednictvím výše zmíněného ovoce a zeleniny (Gibson 1998). Koncept prebiotik také zahrnuje látky, které sacharidy neobsahují. Kromě gastrointestinálního traktu mohou být cílené i na jiná místa těla a mohou spadat do jiné kategorie, než jsou potraviny (Gibson et al. 2017). Mezi takové látky se řadí například polyfenoly, které mohou mít již zmíněný prebiotický efekt, a tak mohou podporovat růst laktobacilů a bifidobakterií. V případě, že se bohaté polyfenolové látky, například ve formě fenolických extraktů, doplní do fermentovaných produktů, mohou zvyšovat zdravotní benefity těchto funkčních potravin (Dueñas et al. 2015).

3.3.3.2 Vliv prebiotik na mikrobiotu

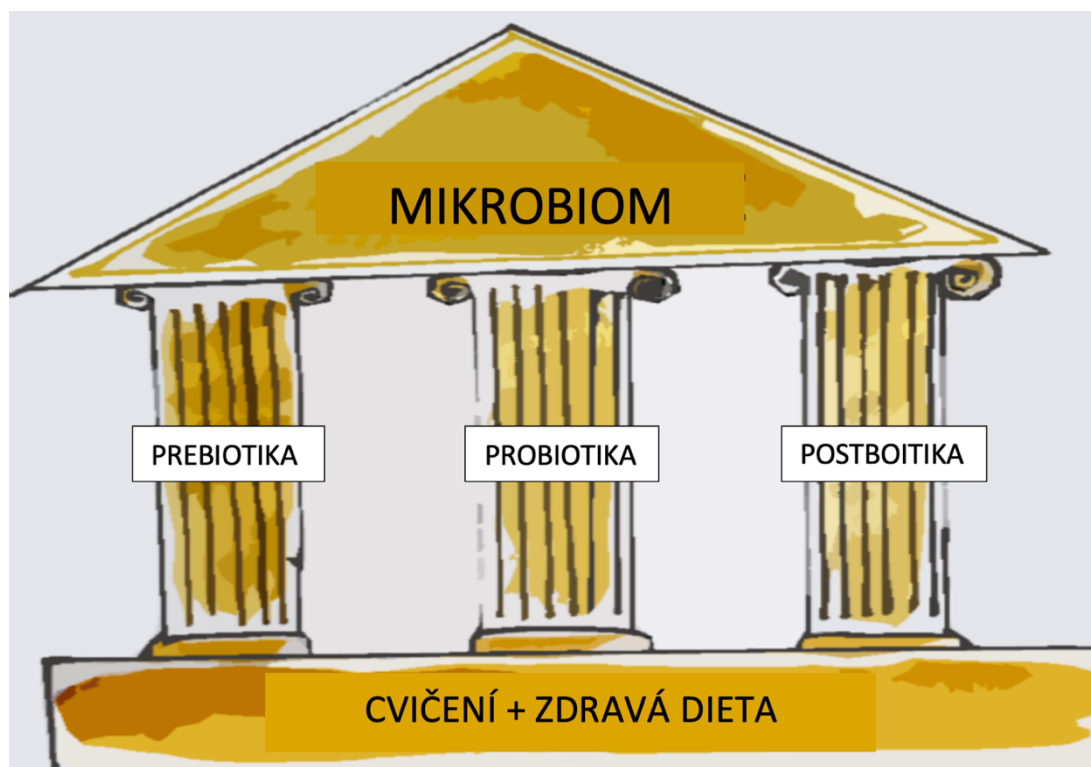
Prebiotika vyživují střevní mikrobiotu a z části také zajišťují výživu střevní sliznice (Gibson 1998). Dále dokáží přetrvávat v distální oblasti tlustého střeva, místa původu několika chronických chorobných stavů, jako je například rakovina tlustého střeva či ulcerózní kolitida. Předpokládá se, že mikrobiota v této oblasti střev může hrát důležitou roli při vzniku nebo průběhu těchto chorob.

Díky svým pozitivním vlastnostem jsou nejčastějšími cílovými organismy prebiotik bifidobakterie a laktobacily. Bifidobakterie jsou známé svými inhibičními účinky na různé patogeny, a protože jejich tvorbu prebiotika mohou stimulovat, stávají se tak důležitými v roli opevnění střevní mikrobioty a v odolávání různým patogenům (Kolida et al. 2002).

3.3.3.3 Oligosacharidy mateřského mléka

V mateřském mléce se vyskytuje přes 200 známých struktur oligosacharidů (Musilová & Rada 2015). Jsou to nekonjugované glykany a v mléku jsou hojné a jedinečné (Bode 2012; Triantis et al. 2018). Neslouží však jako výživa samotného novorozence, nýbrž jeho mikrobioty (Sonnenburgovi 2016). Množství a složení oligosacharidů v mléce je velice individuální a závisí na řadě různých faktorů, například na fázi laktace. Po uplynutí jednoho roku od začátku laktace bude množství oligosacharidů značně nižší. Průměrné množství je přibližně od 5 do 15 gramů na litr mléka (Chaturvedi et al. 2001; Bode 2012) a po tuku a laktóze jsou nejčastější složkou mléka (Sonnenburgovi 2016).

Původně byly tyto oligosacharidy považovány za prebiotický „bifidus faktor“, sloužící jako metabolický substrát pro požadované bakterie a formující složení střevní mikrobioty se zdravotními přínosy pro kojeného novorozence (Bode 2012). V gastrointestinálním traktu jsou tráveny minimálně, a tak se neporušené dostávají dál do tlustého střeva, kde formují mikrobiotu a pro novorozence se stávají prvním prebiotikem. Malá část oligosacharidů je vstřebávána do systémové cirkulace a následně vyloučena ledvinami. Mají také schopnost vázat se na povrchové receptory epitelových buněk či buněk imunitního systému. Na tomto principu mohou modulovat imunitu novorozence ve střevech nebo v jiných částech těla (Triantis et al. 2018). Mezi jejich vlastností a účinků se řadí i antimikrobiální a antiadhezivní, díky kterým mohou sloužit jako tzv. rozpustné receptory (DeR; decoy receptors). Patogeny se tak nemohou připojit k dětským sliznicím a tím se snižuje riziko různých infekcí (Bode 2012). Kromě již zmíněných funkcí se účastní na rozvoji mozku a zlepšují kognitivní funkce (Musilová & Rada 2015). Souhrn důležitých ovlivňujících faktorů, jako jsou probiotika, prebiotika, postbiotika a dieta, je uveden v obrázku č. 3.



Obrázek č. 3 - Střecha, která představuje mikrobiom, může být nepropustná a spolehlivá pouze za předpokladu, že níže uvedené konstrukce jsou pevné. Základem stavby je vhodná strava a fyzická aktivita. Metaforický základ, který představuje strava a cvičení, podtrhuje zásadní roli zdravého životního stylu při udržování lidského zdraví a pohody (Zólkiewicz et al. 2020).

3.3.4 Antibiotika

Od počátku užívání antibiotik již uplynulo téměř století. Jejich problematika je však stále složitější. Jeden z důvodů je vysoký nárůst rezistencí (Adámková & Blechová 2015). Jsou považována za spolehlivou cestu k léčbě mnoha různých chorob. Bylo ale prokázáno, že významně ovlivňují a rozrušují střevní mikrobiotu. Mohou mít buď dysbiotický účinek, nebo naopak eubiotický. Ten zvyšuje četnost potenciálně prospěšných bakterií. Jakou mírou a způsobem nakonec antibiotika naruší střevní mikrobiotu též záleží na dalších faktorech, jako je věk jedince, životní styl a kompozice mikrobioty ještě před podáním antibiotik (Ianiro et al. 2016).

3.3.4.1 Podání během těhotenství

Antibiotická léčba bývá během těhotenství a porodu velmi častá. Až 40 % novorozenců je vystaveno perinatálnímu podání antibiotik. Mezi onemocnění, která se během těhotenství nejčastěji léčí antibiotiky, patří záněty močových cest. Používá se například antibiotikum Nitrofurantoin. Další časté onemocnění jsou infekce dýchacích cest, které se mohou léčit antibiotiky jako jsou peniciliny (Fairlie et al. 2013; Stockholm et al. 2013). Antibiotika se též podávají v případě provedení akutního císařského řezu (Azad et al. 2015).

V prvních měsících života kojenců se v případě předchozího vystavení antibiotiky složení mikrobioty značně liší. Tyto rozdíly mohou přetrvávat až do 12 měsíců života. V případě spojení přirozeného vaginálního porodu a podání antibiotik je mikrobiota kojenců chudší na diverzitu i na počet. V případě podání antibiotik s následným porodem císařským řezem se diverzita zvyšuje.

Ve věku jednoho roku se již zaznamenává změn méně. Ovšem změny mikrobioty vyvolané antibiotiky může ovlivnit i fakt, zda byl kojenec kojen a jak dlouho, a dále již zmíněný typ porodu. U dětí, které nejsou kojené po dobu minimálně tří měsíců, je zvýšené riziko dlouhodobého narušení střevní mikrobioty, a to i kolem prvního roku života. Je snížen výskyt čeledi *Bacteroidaceae* a zvýšen řádu *Clostridiales*. Obdobný efekt jako absence kojení může mít nouzový císařský řez. Navíc se bude zvyšovat výskyt rodů *Veillonella* a *Streptococcus* z kmene Firmicutes (Azad et al. 2015).

3.3.4.2 Podání během raného života dítěte

Mnohé studie potvrdily, že podávání antibiotik kojencům a dětem může mít následný negativní dopad na jejich vývoj a zdravotní stav.

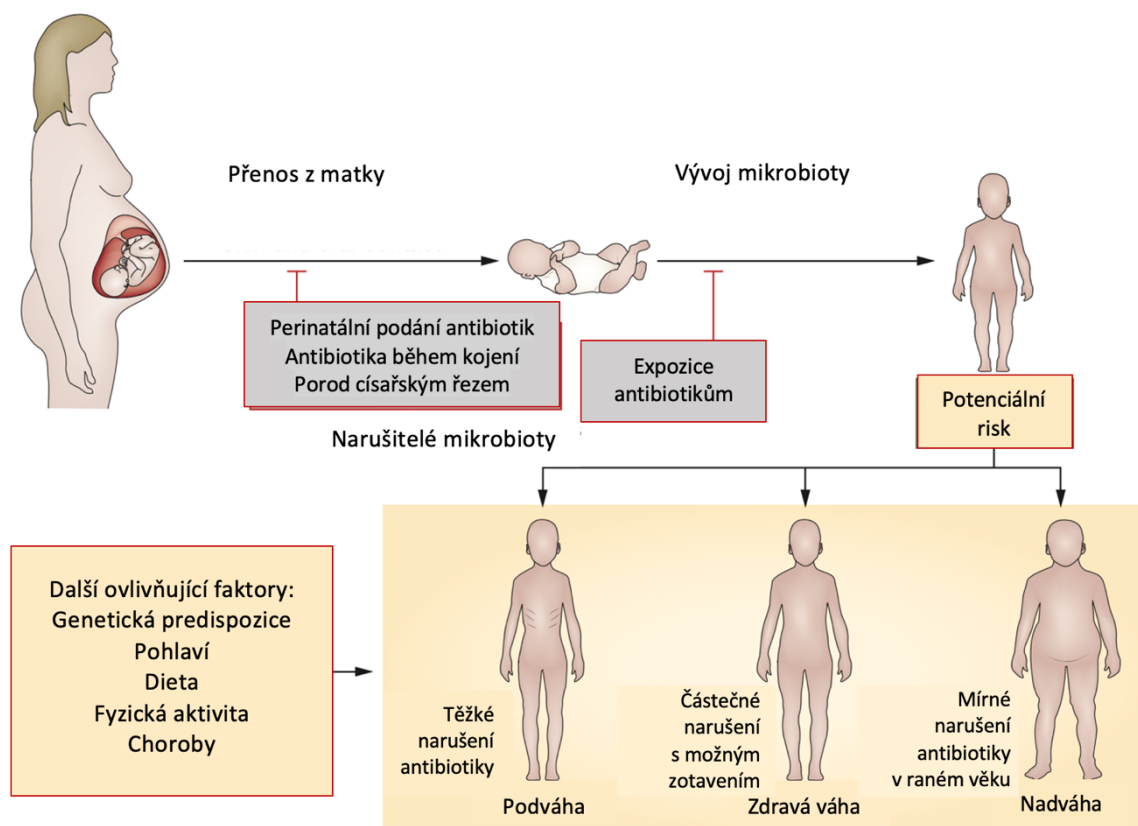
Expozice antibiotikům perinatálně a během prvních 2 let života významně ovlivňuje riziko vzniku atopických a metabolických poruch. Expozice během prvních 6 měsíců života se jeví jako nejkritičtější, což odpovídá době, kdy je mikrobiom nejvíce náchylný k nevratným poruchám (Bejaoui & Poulsen 2020). Současné kojení a užívání antibiotik matkami vede k tomu, že se antibiotika dostanou do mléka, a to pasivní difuzí nebo aktivním transportem. U kojeného dítěte se vystavení může projevit ve formě průjmu, malabsorpce a dalšími negativními dopady (Adámková & Blechová 2015).

Časná nebo opakovaná expozice kojenců a dětí antibiotikům se též pojí se zvýšeným rizikem vzniku nadváhy během dospívání a pozdějšího věku života (Bailey et al. 2014), tato problematika je blíže přiblížena v obrázku č. 4.

3.3.4.3 Rezistence na antibiotika

Rezistence na antibiotika počíná, když bakterie mění svou odpověď na užití různých léčiv. Tyto rezistentní bakterie mohou způsobit onemocnění daleko horší a vážnější než ty bakterie, které na antibiotika rezistentní nejsou. V dnešní době tato problematika patří mezi největší hrozby a může postihnout kohokoliv, v jakémkoliv věku a v kterékoliv zemi (WHO 2020).

Byly objeveny speciální faktory, které dávají vzniku rezistenci na antibiotika a jsou specifické pro pár matka-dítě. Existují geny, jejichž přítomnost sama o sobě přináší tuto rezistenci a také geny, u nichž je rezistence způsobena mutacemi s jedním nukleotidem. Rezistentní geny (AR; antibiotic resistance) se ve srovnání s mateřskými vzorky častěji vyskytují u dětských vzorků a některé AR geny se též vyskytují buď pouze u matek, nebo pouze u potomků (Yassour et al. 2018).



Obrázek č. 4 - Možné dopady užití antibiotik či dalších faktorů na váhu v pozdějším věku života. Kojenci dostávají většinu své kolonizující mikrobioty při narození, během kojení (prostřednictvím mateřského mléka) a prostřednictvím mateřských interakcí (kontakt s kůží). Mikrobiální společenství mohou být ovlivněna i užíváním antibiotik. V kojeneckém věku je mikrobiota obzvláště citlivá na narušení antibiotiky a pozměněná mikrobiota může ovlivnit růst a vývoj v pozdějším věku, s důsledky, jako je nadměrný přírůstek hmotnosti nebo zpomalený vývoj (Cox & Blaser 2015).

3.4 Metody detekce mikrobioty

Obecně lze metody identifikace rozdělit na metody kultivačně závislé a kultivačně nezávislé. Dalším důležitým faktem je, zda budeme identifikovat konkrétní mikroorganismus (izolovaný v čisté kultuře), nebo bakteriální společenstvo.

Kultivace zajišťuje kvantitativní a kvalitativní průkaz mikroorganismů. V této metodě detekce je třeba použít sterilní živné půdy, do kterých se aplikuje inokulum. Tyto kultivační půdy musí vyhovovat všem nárokům daného mikroorganismu (Bursová et al. 2014). Ne všechny mikroorganismy se však dostatečně množí a na médiu tak nemusí vytvořit viditelné kolonie. Některé buňky mohou produkovat mikrokolonie, které jsou pouhým okem neviditelné. Je důležitá snaha o zachování původních vlastností buněk i v laboratorních kulturách. To může zahrnovat jejich udržování ve stavu, co nejbližší původnímu stanovišti. Současné kultivační metody mají tendenci vybírat mikroorganismy, které jsou nejvhodnější pro život v laboratoři

(Austin 2017). S rychlým vývojem nástrojů pro molekulární identifikaci je třeba si pamatovat, že tradiční kultivační metody zůstávají pro mnohé účely stále nezbytné. Nevýhodou však je, že jsou tyto metody časově náročné (Emonet et al. 2010).

Molekulární techniky, konkrétně metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR; polymerase chain reaction), poskytují citlivé, rychlé a kvantitativní analytické nástroje. Lze takto sledovat různé patogeny, studovat je, a to včetně nových nebo objevujících se kmenů. Tyto techniky se používají například k hodnocení mikrobiologické kvality potravin a vody. Rozsah metod dostupných pro aplikaci molekulárních technik se zvýšil a související náklady klesly (Girones et al. 2010). PCR je metoda, kdy se amplifikují malé vzorky DNA. Namnoží se na množství, které bude dostatečně velké pro následnou analýzu. Touto metodou nelze amplifikovat celý genom, pouze relativně malé a specifické sekvence DNA. Využívá se zejména v případech, kdy by kultivace trvala moc dlouho. V klinice by totiž při využití kultivační metody pacient mohl na potřebou léčbu čekat i týdny (Tortora et al. 2015). Diagnostika virových onemocnění by měla být hlavním cílem užití metody PCR, neboť laboratorní testy pro identifikaci virů jsou buď pomalé, drahé nebo necitlivé. V dnešní době je PCR doposud nejznámější a neúspěšnější metoda molekulární biologie. Dokáže detekovat i pomalu rostoucí, obtížně kultivovatelné nebo nekultivovatelné mikroorganismy. Drtivá většina metod PCR používá tepelné cyklování, střídavě zahřívá a ochlazuje vzorek (Mohammed et al. 2015).

V posledních letech je k identifikaci mikrobiálních taxonomií využívána a též oblíbená metoda MALDI-TOF MS. Jedná se o hmotnostní spektrometrii s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice. Provedení analýzy je velice rychlé, přesné a vhodné pro širokou oblast mikroorganismů. Data získaná z hmotnostních spekter jsou porovnána s knihovnou hmotnostních spekter mikroorganismů. Jako výsledek bude následovat shoda nebo nesouhlas mikroorganismů se specifickým spektrem. Mikroorganismy se rozliší na rodové, druhové nebo kmenové úrovni (Huong et al. 2014; Bunesova et al. 2017). Příprava vzorků a kvalita zmíněné databáze se pro identifikaci bakterií jeví jako určující. Lze ji provádět pomocí dvou hlavních přístrojů, MALDI Biotyper od firmy Bruker a Shimadzu. Přesnější bakteriální identifikace je dosaženo pomocí přístroje od firmy Bruker, a to o necelých 10 % (Emonet et al. 2010). Zkoumaný vzorek se vždy smísí s matricí. Příklad takové matrice je HCCA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid), což je derivát kyseliny skořicové (Wang et al. 2012). Po smísení vznikne takzvaný „terčík“. Poté, co se destička umístí do přístroje, terčík zasáhnou krátké laserové pulsy (Emonet et al. 2010).

Další metodou analýzy mikrobioty je sekvenování nové generace (NGS; next generation sequencing). Za poslední dvě desetiletí se technologie sekvenování významně zlepšila. Tento vývoj poskytuje nové a vzrušující příležitosti mikrobiologům. Jedná se o rychlou a nákladově efektivní technologii. Poskytuje nové možnosti, jak prozkoumat interakce mezi patogenem a hostitelem. Umí charakterizovat všechny mikroorganismy vyskytující se v daném vzorku (Malla et al. 2019). Metoda sekvenování nové generace přinesla revoluci v genomickém výzkumu. Na rozdíl od PCR je možné sekvenovat celý lidský genom, a to během jediného dne. Kromě sekvenování celých genomů se pomocí této metody lze též zaměřit i na konkrétní oblasti zájmu nebo na malý počet individuálních genů. Tato metoda může přinést velké přínosy i v klinice, například může pomoci přesněji diagnostikovat a klasifikovat dané onemocnění. Existuje řada různých platforem NGS, které mohou využívat různé technologie sekvenování.

Všechny tyto platformy ovšem mají společný znak, masivní sekvenování milionů fragmentů DNA provádí paralelně (Behjati & Tarpey 2013).

4 Metodická část a materiál

4.1 Cíl metodiky

Cílem experimentální části práce bylo kultivačně stanovit počty celkových anaerobů, bifidobakterií, laktobacilů a koliformních bakterií/*Escherichia coli* přítomných ve vzorcích stolice konkrétního zdravého dítěte pomocí selektivních médií. Jednalo se o opakované analýzy vzorků stolice odebíraných v průběhu 1. roku stáří dítěte. Dále identifikovat kolonie izolované z uvedených médií, kromě celkových počtů (kontrolní skupina), pomocí metody hmotnostní spektrofotometrie MALDI TOF MS.

Analyzované vzorky stolice pocházely od chlapce, který se narodil přirozenou cestou, zdravý, s normální porodní váhou a po dobu 1. roku života byl částečně kojený, a zároveň dokrmován kojeneckým mlékem, od 4. měsíce byla do jeho jídelníčku zahrnuta pevná strava. Další informace k dietě a faktorům ovlivňující rozvoj mikrobioty jsou uvedeny v části výsledky.

4.2 Odběr vzorků

Vzorky stolice byly odebírány v pravidelných intervalech matkou dítěte. Čerstvý vzorek stolice (přibližně 1 g) byl sterilně odebrán do připravené a předem zvážené zkumavky s médiem (9 ml) obsahující glycerol (ochrana bakterií během skladování mražením) a skleněné perly, určené pro budoucí homogenizaci. Složení média je uvedeno v tabulce č. 3. Takto odebraný vzorek byl ihned zamražen. Manipulace a transport vzorků byla prováděna na ledu.

Všechny uvedené analýzy vzorků stolice dítěte byly provedeny s informovaným souhlasem rodičů dítěte.

4.3 Příprava vzorků

Před vlastní kultivační analýzou byl vzorek rozmrazen za pokojové teploty. Poté byl vzorek zvážen a homogenizován pomocí vortexu. Samotný vzorek představoval „1. ředění“ a bylo třeba vytvořit ředící řadu (1×10^{-2} do 1×10^{-9}). Aby stanovené počty po kultivaci odpovídaly 1 g stolice, musel se vypočítat rozdíl váhy zkumavky před a po odběru. Tímto rozdílem vydělit hodnotu 1, a poté se získalo množství vzorku, které se inokulovalo do 2. ředění. Následně se inokulovalo již vždy 1 ml („1 g“).

Vzorky byly po dobu 24 nebo 48 hodin kultivovány při 37 °C za anaerobních i aerobních podmínek. V případě anaerobní kultivace byl použit speciální box s vyvíječem těchto anaerobních podmínek a Anaerobag (bioMérieux, Francie) nebo byl použit anaerostat a manuálně se pomocí plynů CO₂/H₂ v koncentraci 10 %/90 % a paládiového katalyzátoru (Oxoid) vytvořilo anaerobní prostředí.

4.4 Použitá média a jejich příprava

Média pro celkové počty bakterií a pro bakterie rodu *Bifidobacterium* vychází ze základního modifikovaného agaru Wilkins – Chaldren (WCH; Oxoid, UK). Jeho modifikované složení je uvedeno v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 - složení modifikovaného Wilkins-chalgren agaru na 1000 ml vody

	WCH	Sójový pepton	L-cystein	Tween
Množství	43 g/l	5 g/l	0,5 g/l	1 ml/l

Agar byl společně se sójovým peptonem, L-cysteinem a tweenem rozmíchán v destilované vodě a sterilován po dobu 50 minut v Papinově hrnci. Po uplynutí této doby byla média přemístěna do vodní lázně o teplotě 50 °C. Po vyrovnání teplot byla k agarům přidána antibiotika a další složky pro jejich selektivní úpravu.

Celkové počty anaerobních bakterií

CP; bez dalších úprav

Médium pro rod *Bifidobacterium* (2 různá provedení)

BIF – MUP; mupirocin (200 mg/l) + ledová kyselina octová (1 ml/l)

BIF – NOR; mupirocin (200 mg/l) + norfloxacin – již s kyselinou octovou (10 ml/100 ml)

U BIF MUP a NOR se antibiotika, tedy mupirocin, musely dát dopředu louhovat do zkumavky s bujónem, a to alespoň na 30 minut.

Jako médium pro laktobacily byl použit Rogosa agar (Oxoid). V tomto případě se agar rozmíchal dle uvedeného poměru (6,9 g na 100 ml vody) v destilované vodě a nechal se za stálého míchání rozvařit zvlášť v hrnci. Rozvaření trvalo asi 45 minut, následně byla do média přidána 98% kyselina octová (132 µl/100 ml) a médium bylo necháno dalších 5 minut ve vroucí vodě. Poté bylo přesunuto do vodní lázně o teplotě 50 °C.

Pro koliformní bakterie/*E. coli* byl použit chromogenní TBX agar (Tryptone Bile X-Glucuronide Medium; Oxoid) a dle uvedeného množství (3,66 g/100 ml) rozmíchán v destilované vodě, vysterilován v Papinově hrnci. Po sterilizaci bylo médium přesunuto do vodní lázně o teplotě 50 °C.

4.5 Rozbor

Rozbor byl proveden pomocí deskové metody na Petriho miskách. Jednotlivá ředění byla očkovaná do Petriho misek, které byly označeny jak jednotlivými koncentracemi vzorku, tak typem agaru. Médii bylo použito pět typů – pro celkové počty bakterií CP (modifikovaný Wilkins-chalgren), pro *Bifidobacterium* BIF – MUP, BIF – NOR (modifikovaný Wilkins-chalgren) s antibiotiky a kyselinou octovou, pro *Lactobacillus* spp. LBC (Rogosa agar s kyselinou octovou) a pro *E. coli* či další koliformní bakterie TBX (TBX agar).

Očkování jednotlivých ředění v případě CP, BIF – MUP, BIF – NOR a LBC bylo provedeno tak, že se jednotlivá ředění nanasla do Petriho misek, až poté přelila médiem a krouživým pohybem promíchala. V tomto případě bylo do každé misky (malé misky, průměr 5 ml) naočkováno 0,5 ml příslušného ředění. Misky pro *Lactobacillus* byly po zatuhnutí ještě jednou přelity médiem (mikroaerofilní podmínky). V případě TBX bylo první nalito připravené médium do velké Petriho misky (průměr 10 ml) a na ztuhlém médiu se přenášela jednotlivá ředění, v tomto případě 0,1 ml a následně byla rozetřena pomocí sterilní skleněné hokejky.

Petriho misky pro CP, BIF – MUP a BIF – NOR byly kultivovány 48 hodin při 37 °C v anaerostatu s vyvíječem anaerobních podmínek (Anaerobag – bioMérieu), LBC byly kultivovány víčkem dolů s přístupem vzduchu 48 hodin (či více) při 37 °C a TBX s přístupem vzduchu po dobu 24 hodin při stejné teplotě, opět dnem vzhůru.

V tabulce č. 2 je uvedeno schéma rozboru, tedy, která ředění byla pro uvedené skupiny použita ke kultivaci.

Tabulka č. 2 - schéma použitých ředění při rozboru stolice

Číslo ředění	2	3	4	5	6	7	8	9
CP								
BIF - MUP								
BIF - NOR								
LBC								
TBX								

Po skončení kultivace byly jednotlivé Petriho misky opět rozloženy dle schématu (tabulka č. 2) a pomocí manuálního počítání kolonií nebo digitálního počítadla byly zjištěny počty narostlých kolonií (pouze na počítatelných ředěních). U BIF, LB a CP byl celkový počet vynásoben číslem 2 (jelikož pro kultivaci byly použity malé Petriho misky a inokulační dávka byla 0,5 ml a ne 1 ml). U TBX byl celkový počet vynásoben číslem 10 (byla použita dávka 0,1 ml).

Konečné množství bakterií bylo vypočteno podle následujícího vztahu (viz níže), výsledek byl vyjádřen jako přesný počet kolonií tvořících jednotek v 1 g testované stolice.

$$P = [(P1 + P2) / 11] * F \text{ (KTJ/g)}$$

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

F – převrácená hodnota nejvyššího ředění

KTJ – kolonie tvořící jednotka

4.6 Izolace kolonií

Pomocí bakteriologických kliček byly vyjmuty kolonie různých kultivačních charakteristik. Cílem bylo zachytit co největší možnou variabilitu. Sledovaly se odlišné kultivační charakteristiky, jako rozdílný tvar, barva či struktura. Tato kolonie byla opatrně a sterilně odebrána do zkumavek s tekutým médiem modifikovaného Wilkins Chalgren bujónu

(WCHB) připraveného anaerobně (níže v tabulce č. 3 je uvedeno přesné složení). Z každého vzorku stolice a druhu média bylo takto odebráno zhruba 6-10 různorodých kolonií podle variability kultivačních charakteristik.

Tímto byl vytvořen izolát a následně se v přehledně popsaných zkumavkách dal kultivovat na dobu 24 hodin při 37 °C.

Tabulka č. 3 - složení modifikovaného Wilkins-chalgren bujónu (WCHB) na 1000 ml vody

	WCHB	Sojový pepton	L-cystein	Tween
Množství	33 g/l	5 g/l	0,5 g/l	1 ml/l

4.7 Výběr vhodných izolátů a kontrola čistoty

Po skončení kultivace izolátů následoval výběr vhodných izolátů k vyhodnocení pomocí MALDI TOF MS. Nejprve byl vytvořen seznam všech izolátů, které se kultivovaly. Jednotlivé izoláty se pomocí injekčních stříkaček nanasly na podložní sklíčko, byly překryty krycím sklíčkem a pozorovány pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem. Cílem bylo vyřadit kontaminované kultury a opět podchytit co největší variabilitu. Pro následné stanovení bylo zapotřebí mít pouze čisté a jednotné kultury. Izoláty, kde se vykytovalo například více druhů morfologie tyčinek či koky, byly vyřazeny. Samotné mikroskopické pozorování probíhalo pod zvětšením 400× a u některých izolátů byl spolu s pozorováním vytvořen digitální snímek. Snímky některých nejčastěji detekovaných bakterií jsou vloženy do části přílohy. Zkumavky vybraných izolátů byly označeny specifickými kódy, pro lepší orientaci a zjednodušení provedení.

Z vybraných izolátů byl pomocí injekční stříkačky odebrán 1 ml kultury do uzavíratelných Eppendorf zkumavek (o velikosti 1,5 ml), které byly předem popsány stejnými kódy jako zkumavky s narostlými izoláty. Následovala příprava kultur pro následnou identifikaci vzorků.

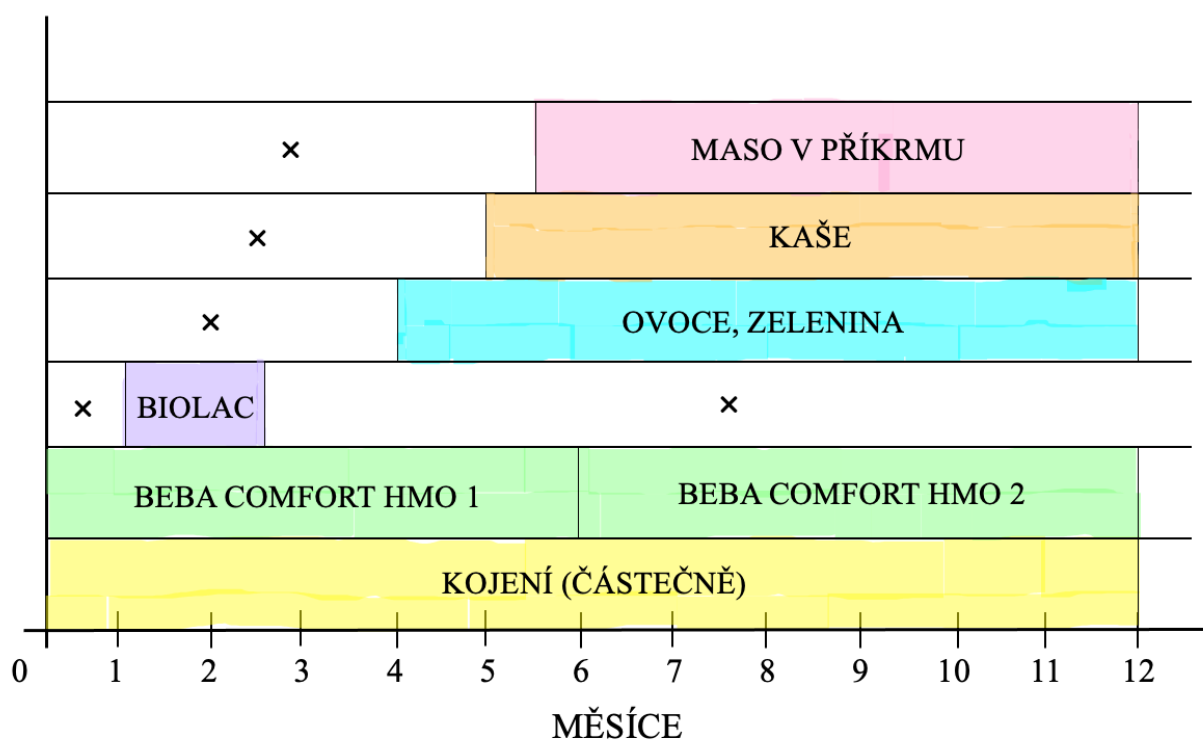
4.8 MALDI TOF MS stanovení

Odebrané kultury byly vloženy do centrifugy a stočeny při 14500 otáčkách po dobu 2 minut. Tím bylo dosaženo odstředění a usazení sedimentu na dně zkumavek. Z kultur byl slit supernatant a na dně zůstal sediment, takzvaná peleta. Jednotlivé pelety byly smíchány pomocí pipety s 500 µl 70% ethanolu. Proběhlo další stočení v přístroji, slil se ethanol. Zbytky ethanolu, které zůstaly u pelet, byly opatrně odpipetovány. Otevřené zkumavky se nechaly 10 minut schnout při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby bylo přidáno 15 µl kyseliny mravenčí (Sigma Aldrich) a následně 15 µl 100% acetonitrilu (Sigma Aldrich). Proběhlo homogenizování pomocí vortexu a opět byl vzorek stočen. Ve dvou kopiích se po 1 µl pipetovala tekutá složka výsledného roztoku, tedy supernatantu, a to na stříbrnou destičku (Bruker, Německo). Po zaschnutí supernatantu na destičce bylo pipetováno 1 µl HCCA matrice

a opět se nechalo zaschnout při pokojové teplotě. Destička byla vložena do přístroje (Bruker) a vzorky byly analyzovány a identifikovány SW Biotyper (Bruker).

5 Výsledky

Celkem bylo kultivačně analyzováno 42 vzorků stolice. První zařazený vzorek byl datován k 10. dnu života kojence a poslední vzorek byl odebrán 365. den věku dítěte. Kojenec byl po celou dobu vzorkování částečně krmen mateřským mlékem (přímo z prsu) a dokrmován dětskou výživou BEBA COMFORT HMO (Nestlé). Uvedené kojenecké mléko obsahuje probiotický kmen *Lactobacillus reuteri* (syn. *Limosilactobacillus reuteri*) a probiotický oligosacharid 2'FL (2'fukosyllaktosa). Z důvodu kojeneckých kolik a podezření na klostridiovou infekci byly kojenci mezi 30. - 45. dnem věku podávány probiotické kapky BioLac Baby (Generica), které obsahují druhy *Lactobacillus plantarum* (syn. *Lactiplantibacillus plantarum*) a *Bifidobacterium breve*. Kolem 19. týdne života byl kojenci poprvé podán příkrm v podobě pevné stravy, kdy některé z kojeneckých kaší obsahovaly *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Tyto a další faktory, které mohou mít vliv na rozvoj mikrobioty kojence jsou uvedeny na obrázku č. 5.



Obrázek č. 5 - výživa kojence

Kultivační analýza byla zaměřena na detekci a kvantifikaci celkových počtů anaerobních bakterií, bifidobakterií, laktobacilů a *Escherichia coli*. Koliformní bakterie nebyly nakonec kvantifikovány z důvodu nedostatečné selektivity TBX média. Výsledky kultivačních analýz jsou vyjádřeny logaritmem počtu kolonie tvořících jednotek v jednom gramu stolice (log KTJ/g) a jsou graficky znázorněny na obrázku č. 6.

První dny života byly hodnoty, jak bylo očekáváno, proměnlivé a variabilní. Na médiu pro bifidobakterie BIF-MUP byly detekovány rovné plyn produkující tyčinky odpovídající morfologií klostridiím, na více selektivním médiu BIF-NOR nebyly první dva odběry žádné kolonie, 3. odběr byly detekovány klostridie a koky. Jelikož se nejednalo o bifidobakterie,

nebyly tyto první vzorky do grafu ani hodnot zařazeny. Na Rogosa médiu byly od prvního rozboru detekovány tyčinky odpovídající morfologií laktobacilům, kdy zdrojem mohl být podávaný příkrm BEBA COMFORT HMO doplněný o *L. reuteri*. Složení střevní mikrobioty kojence, skladbu či četnost laktobacilů a zejména bifidobakterií také ovlivnily podané probiotické kapky. Detekované kolonie s morfologií bifidobakterií na médiích BIF-NOR a BIF-MUP se poprvé objevily kolem 32. dne života kojence. To odpovídá faktu, že 30. den života byla kojenci podána první dávka zmíněného probiotika. Došlo k výraznému navýšení počtů bakterií detekovaných na médiu pro bifidobakterie, a ovlivnění pokračovalo i po vysazení těchto kapek.

U média BIF-NOR se výskyt bifidobakterií pohyboval v rozmezí hodnot 8,82–11,75 vyjádřené v log KTJ na 1 g stolice. Průměrná detekovatelná hodnota u BIF-NOR byla $10,19 \pm 0,65$ log KTJ/g. U BIF-MUP je rozmezí podobné, a to 8,91–11,83 log KTJ/g, s průměrnou hodnotou $10,26 \pm 0,60$ log KTJ/g. Médium pro BIF-NOR je díky svému složení obohacenému o norfloxacin více selektivní, tudíž byly spíše očekávané nižší počty než u BIF-MUP. Tato skutečnost se potvrdila, ale rozdíly nebyly tak zjevné.

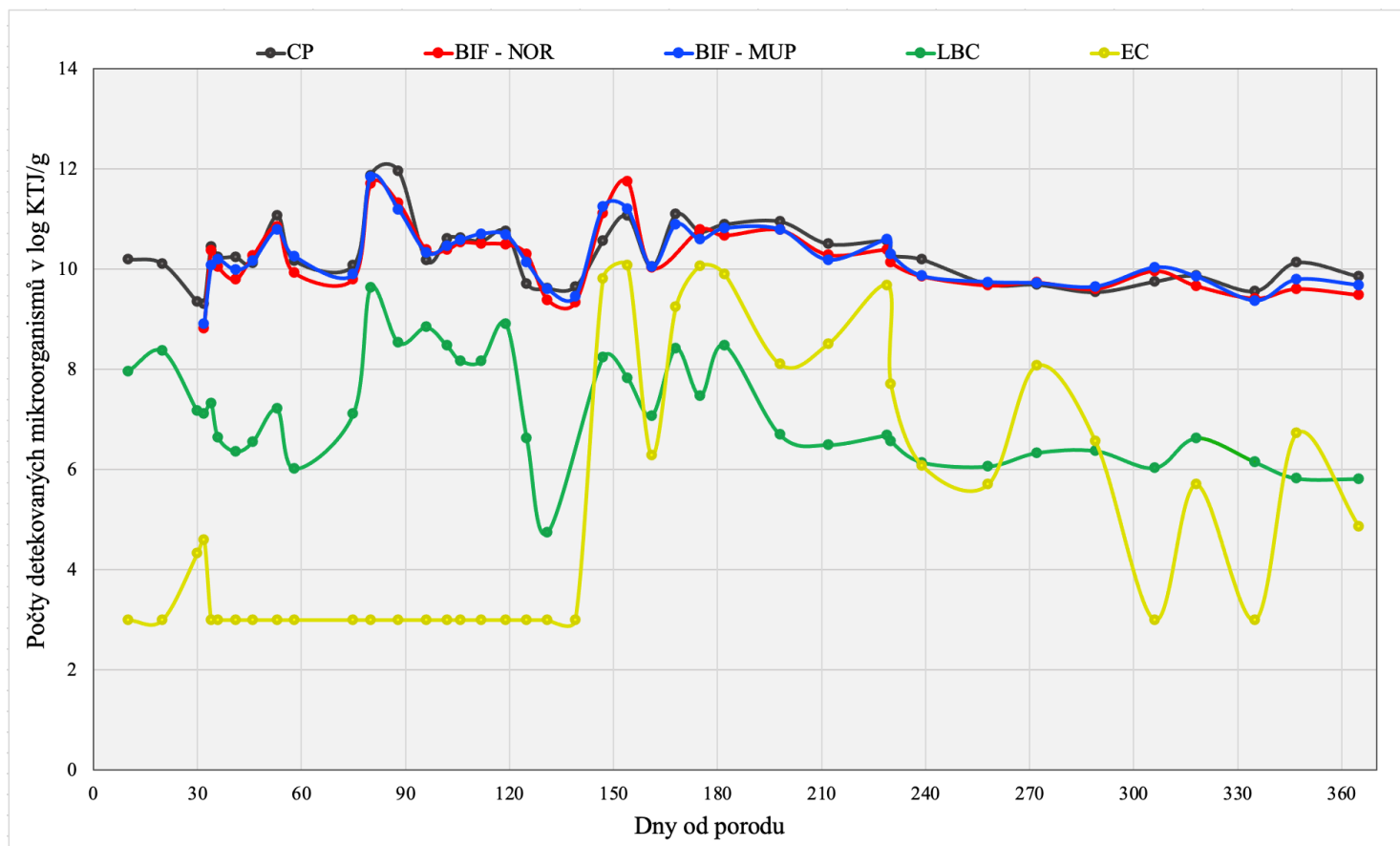
Hodnoty a trend celkových počtů (CP) se příliš nelišil od bifidobakterií. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 9,31–11,96 log KTJ/g. Průměrná hodnota byla $10,29 \pm 0,61$ log KTJ/g. Z výsledku je patrné, že bifidobakterie byly od 32. dne dominantní skupinou anaerobní mikrobioty kojence.

E. coli na TBX médiu byly detekovány u 20 ze 42 vzorků stolice. Nutno brát v potaz, že limitní detekovatelná hodnota je 10^3 KTJ/g. Ve vzorcích se *E. coli* poprvé objevily kolem 4. týdnu života, ale pak na nějakou dobu opět vymizely (byly pod hladinou detekce). Detekované kolonie *E. coli* měly modrozelenou barvu a v mikroskopu se zobrazovaly jako rovné krátké tyčinky. Pravidelněji se začaly vyskytovat až po 147. dnu života kojence, tedy v období 21. týdnu. To odpovídá období zhruba 14 dnů po příkrmu pevné stravy. Z grafu si lze všimnout, že se počty detekovaných skupin lehce zvýšily a začala se pravidelněji vyskytovat i *E. coli*.

E. coli se ve vzorcích stolice vyskytovaly v rozmezí $<10^3$ KTJ/g až 10,08 log KTJ/g. Průměrná hodnota po dobu sledování kojence byla $3,59 \pm 4,04$ log KTJ/g v případě průměru ze vzorků, kde byly kolonie detekovány. V případě, že byly v průměru zohledněny vzorky, kde kolonie *E. coli* nebyly detekovány, a namísto nuly bylo počítáno s hodnotou detekčního limitu 3, tak byl průměrný počet $5,16 \pm 2,65$ log KTJ/g. Uvedený rozdíl poukazuje na vysokou variabilitu mezi četnostmi *E. coli* u jednotlivých odběrů.

Výskyt laktobacilů byl zprvu též více proměnlivý. Například v 80. dnu života kojence bylo zaznamenáno výrazné zvýšení četnosti, a naopak kolem 130. dnu života značný pokles, viz obrázek č. 6. Od 198. dne života se množství laktobacilů kolonizujících střeva kojence ustálilo a následně byly hodnoty téměř neměnné. Zjištěné množství laktobacilů bylo v rozmezí 4,74–9,63 log KTJ/g, a průměrná detekovatelná hodnota byla $7,12 \pm 1,09$ log KTJ/g.

Vzorky BN27 u Rogosa média a BN31 u média pro BIF-NOR byly vyřazeny, neboť zde nebylo možné detekovat žádné mikroorganismy. Tato skutečnost je spíše přikládána chybě v postupu v laboratoři, trend ve výskytu bifidobakterií ani laktobacilů tomuto výpadku neodpovídá.



Obrázek č. 6 - graf vytvořený z kompozice mikrobioty kojence

Na základě identifikace pomocí MALDI-TOF MS bylo potvrzeno, že mezi izoláty z prvních vzorků u média BIF-MUP byly přítomny jiné mikroorganismy než bifidobakterie. Jak již bylo zmíněno, narostlé bakterie svou strukturou a dalšími charakteristikami připomínaly klostridie. Tento předpoklad byl potvrzen, jednalo se o *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* a dále i *Actinomyces neuii*. U izolátů z média pro BIF-NOR byl pomocí analýzy též potvrzen výskyt klostridií, konkrétně *Clostridium butyricum*. Dále byl identifikován *Enterococcus faecalis*, a to v tomtéž vzorku, tedy s kódem BN3 (30. den).

Následně byly kojenci podány probiotické kapky. Jak bylo očekáváno, hned po první dávce probiotik začaly dominovat bifidobakterie. Z identifikace vzorků je zřejmé, že dominantním zástupcem byl druh *B. breve*. To souhlasí se skutečností, že byl tento druh obsažen ve zmíněných kapkách. Tento zástupce rodu *Bifidobacterium* se u kojence vyskytoval od 32. dne a dále po celý první rok života. Kromě *B. breve* byl detekován také druh *Bifidobacterium longum*, ale již ne tak četně. S přibývajícím věkem byl ovšem *B. longum* identifikován častěji, a dokonce u některých izolátů z média BIF-NOR ke konci prvního roku převládal. 147. den života byl poprvé analyzován pro kojence doposud nový druh, *Bifidobacterium bifidum*, a to u médií BIF-MUP i BIF-NOR. 272. den byl poprvé a také naposledy identifikován druh *B. animalis* subsp. *lactis*, zde pouze u selektivnějšího média BIF-NOR.

Celkem bylo možno detekovat čtyři různé zástupce bifidobakterií. Obecně by se dalo říci, že se s přibývajícím věkem kojence diverzita zvýšila. Přesto byl v průběhu celého prvního roku života dominujícím zástupcem *B. breve*, který byl kojenci podán v rámci probiotických kapek.

Z laktobacilů bylo možné identifikovat celkem tři druhy, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* a *Lactobacillus fermentum* (syn. *Limosilactobacillus fermentum*). U prvních vzorků byl dominující druh *L. reuteri*, který byl součástí mléčného příkrmu BEBA. Od zhruba 32. dne byl spíše dominantní *L. rhamnosus*. Zde se pravděpodobně jedná o přirozenou kolonizaci, neboť tento druh nebyl obsažen v žádném příkrmu ani doplňcích stravy. Okolo 180. dne se objevil druh *L. fermentum*, ale byl identifikován pouze dvakrát. Je možná spojitost s příkrmem, neboť *L. fermentum* je bakterie mléčného kvašení. Poté byl opět dominující spíše *L. reuteri*, a to až do konce období jednoho roku stáří. V příloze č. 3 jsou uvedeny fotografie nejčastěji detekovaných bifidobakterií a laktobacilů kojence.

V podávaných kapkách byl obsažen *L. plantarum*, ale za celý rok života kojence ho nebylo možné detekovat ani jednou. Je možné, že jím trávicí trakt nebyl vůbec kolonizován, anebo ano, ale pouze v malém množství, a tak byl přerosten jinými druhy laktobacilů.

6 Diskuse

Lidské tělo obývá obrovská populace mikroorganismů, která se nazývá mikrobiota. Tato mikrobiota zásadně ovlivňuje celkové zdraví jedince (Ventura et al. 2009). Ve střevech se nachází triliony mikrobů a přesto, že ve střevní mikrobiotě neexistuje žádná jedna optimální a unikátní kompozice, její vyváženost je klíčová (Selber-Hnatiw et al. 2017). Pokud dojde ve střevech k rozrušení rovnováhy mezi jednotlivými druhy mikroorganismů, nastává stav zvaný dysbióza. Je narušen poměr mezi žádoucími a nežádoucími druhy mikroorganismů a může dát za vznik různým zdravotním komplikacím (Tamboli et al. 2003).

Nedávné studie odhalily, že mikroorganismy pravděpodobně osidlují gastrointestinální trakt kojence ještě před porodem a dokončením vývinu, tedy v břiše matky. Dle Tuominen et al. (2018) je placenta matky kolonizována kmeny Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria a Bacteroidetes, konkrétně nejčastěji stafylokoky, enterokoky a laktobacily. Vztahy mezi mikrobiotou placenty, její funkcí a vývojem plodu nejsou dobře objasněny, přesto se očekává a prozatímni výzkumy říkají, že má tato kolonizace vliv na zmíněný vývoj plodu, a zároveň i na další skutečnosti (Tomlinson et al. 2019). I tak se v různých studiích vyskytují velké rozdíly v typu a rozmanitosti bakterií detekovaných v placentě a o kolonizaci ostatních struktur je informací ještě méně (Gil et al. 2020).

Mikrobiota kojence je pro následný vývoj velmi důležitá. Má schopnost podpořit správnou funkci imunitního systému, dále pomáhá v prevenci proti různým chorobám a také v obraně před patogenními druhy mikroorganismů (Yassour et al. 2018). Diverzitu a míru kolonizace ve střevech kojence ovlivňuje způsob, jakým bylo dítě porozeno (Rutayisire et al. 2016). Se standartním vaginálním porodem je spjat častější výskyt bifidobakterií, zástupci bývají například *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium adolescentis* (Biasucci et al. 2010) a dále také rody *Streptococcus* a *Bacteroides*. U císařského řezu se spíše vyskytne *Enterococcus* a *Clostridium* (Yang et al. 2019), kdy se klostridie mohou stát příčinou různých gastrointestinálních obtíží kojence (Rutayisire et al. 2016). Mezi další ovlivňující faktory patří způsob výživy kojence, tj. kojení mateřským mlékem z prsu, sušeným mlékem z lahve či smíšená strava (Yang et al. 2019). Dále podání probiotik (Jabandžiev et al. 2019), prebiotik (Gibson et al. 2017), či postbiotik (Zólkiewicz et al. 2020).

Náplň této práce je zaměřena na rozvoj a způsoby modulace mikrobioty kojence. Po dobu jednoho roku byly kojenci chlapeckého pohlaví odebrány vzorky stolice a následně byla sledována změna diverzity a míra kolonizace s přihlédnutím na možné ovlivňující faktory. Celkem bylo analyzováno 42 vzorků.

Chlapec byl narozen přirozeným vaginálním porodem a mezi první kolonizátory jeho střev patřily klostridie, které byly izolovány z médií pro bifidobakterie. Detekovaná bakterie *Clostridium difficile* se u zdravých novorozenců či u mladších kojenců vyskytuje poměrně často, asi z 20 až 50 % (Hung et al. 2015), ale dle Jangi & Lamont (2010) i častěji. Na rozdíl od starších kojenců či dospělých, nemusí novorozenci vykazovat žádné příznaky onemocnění (nevolnosti, kolitida), které tato bakterie může způsobit. Tato rezistence vůči toxinům klostridií možná souvisí s absencí mechanismu, který by případné toxiny mohl vázat a zpracovávat, také s ochrannými složky mateřského mléka a dalšími faktory (Jangi & Lamont 2010; Hung et al. 2015). Přesto, že jsou klostridie často spojeny s porodem císařským řezem (Yang et al. 2019),

mohou být získávány i z vnějšího prostředí nemocnice, domova, či později školky (Jangi & Lamont 2010), anebo také z lidské kůže (Hung et al. 2015).

Jak již bylo naznačeno, bifidobakterie se objevily se zpožděním. Z důvodu kolik byl kojenci podán probiotický doplněk BioLac, v kterém byly obsaženy *B. breve* a *Lactobacillus plantarum* (syn. *Lactiplantibacillus plantarum*). Následně, kolem 32. dne, byly bifidobakterie poprvé detekovány a zůstaly přítomné po celou dobu sledování. Ve střevní mikrobiotě kojence dominoval v kapkách obsažený *B. breve*. Výskyt bifidobakterií byl oproti zbylým detekovaným mikroorganismům značně vyšší. V případě kultivace na BIF-MUP médiu byla průměrná zjištěná hodnota $10,26 \pm 0,60$ log KTJ/g a v případě selektivnějšího média obohaceného o norfloxacin $10,19 \pm 0,65$ log KTJ/g.

Bifidobakterie se řadí mezi nejčastější mikroorganismy vyskytující se v GITu kojence (Palmer et al. 2007) a díky svým kladným vlivům na celkové zdraví jedince jsou v posledních letech středem mnoha studií a výzkumů (Rutayisire et al. 2016). Po standartním vaginálním porodu se bifidobakterie detekují častěji, obecně asi u 60 % kojenců (Biasucci et al. 2010). Zachycenými zástupci u pozorovaného kojence jsou zejména *B. longum*, *B. breve*, které patří mezi nejběžnější vyskytující se bifidobakterie ve střevech kojenců (Biasucci et al. 2010). Po celou dobu sledování byl kojeneček kojen mateřským mlékem, což je též spjato s celkově vyšší četností bifidobakterií (Soto et al. 2014; Yang et al. 2019). Dále byly detekovány i *Bifidobacterium animalis* a *Bifidobacterium bifidum*, ale již ne tak četně. Jedna studie využila probiotikum *B. animalis* jako možnou cestu k léčbě dětské koliky. Uvádějí, že je v boji s tímto onemocněním pravděpodobně zapojena střevní mikrobiota kojence podporující potenciálně terapeutickou roli probiotik. Suplementace *B. animalis* se ukázala jako účinná cesta při léčbě tohoto onemocnění. Zjištěný účinek by mohl být odvozen z imunitních a neimunitních mechanismů spojených s modulací struktury a funkce střevní mikrobioty (Nocerino et al. 2020).

Laktobacily se na rozdíl od bifidobakterií objevovaly již od úplného počátku života kojence a jejich kompozice se v průběhu celého roku lehce měnila. Jejich průměrné množství bylo $7,12 \pm 1,09$ log KTJ/g. Tento druh mikroorganismů je mimo jiné i hlavním kolonizátorem vaginální mikrobioty (Witkin & Linhares 2016), také je pravděpodobně přítomen v plodové vodě matky (Rehbinder et al. 2018) a v placentě (Tuominen et al. 2018). Laktobacily se spolu s bifidobakteriemi vyskytují v mateřském mléce (Soto et al. 2014), které kromě těchto probiotických druhů mikroorganismů obsahuje i 200 známých struktur oligosacharidů, a tak se řadí mezi první prebiotika a zároveň probiotika kojence. Slouží k výživě jeho mikrobioty (Bode 2012), moduluje jeho imunitu (Triantis et al. 2018) a také se účastní na rozvoji mozku (Musilová & Rada 2015).

Nejhojněji byl detekován *Lactobacillus rhamnosus* (syn. *Lacticaseibacillus rhamnosus*) a *Lactobacillus reuteri* (syn. *Limosilactobacillus reuteri*). *L. reuteri* byl obsažen v kojenecké výživě BEBA COMFORT, která byla kojenci podávána po celou dobu sledování, a oba druhy jsou přirozeně vyskytující se mikroorganismy v mateřském mléce (Soto et al. 2014). Ve střevech kojence byl u prvních dvou odběrů dominantní *L. reuteri*, následně asi do 180. dne života převládal *L. rhamnosus* a posledních zhruba 130. dnů opět dominoval *L. reuteri*. To nasvědčuje faktu, že *L. rhamnosus* byl pravděpodobně přirozeným kolonizátorem kojence již od samého narození, nebo je zde možnost, že se do střev kojence dostal z mateřského mléka matky.

L. reuteri patří mezi nejčastější zástupce laktobacilů vyskytující se v gastrointestinálním traktu člověka a produkuje látku zvanou reuterin, která má antibakteriální vlastnosti, tj. dokáže inhibovat některé rody jiných bakterií (Lukáš 2015). Oba tyto druhy laktobacilů mají mnoho prokázaných pozitivních vlivů na kojence i dospělé jedince. Například jsou efektivní terapií při infekčních průjmech a dokážou zkrátit délku trvání samotného onemocnění (Rosenfeldt et al. 2002). Dále mají imunomodulační účinky a umí pomoci v boji s atopickým ekzémem (Kokešová 2009).

U dvou odběrů byl také zjištěn *Lactobacillus fermentum* (syn. *Limosilactobacillus fermentum*), který je také obsažen v mateřském mléce matky (Soto et al. 2014). Tato bakterie mléčného kvašení je lidského původu a k fermentaci potravin či v průmyslových procesech se využívá již velmi dlouho. Bylo prokázáno, že podporuje vývoj imunitního systému a spouští imunomodulační odpovědi při zánětlivých procesech, a dále například hraje roli i při odstraňování patogenů (Zhao et al 2019).

Dle Yang et al. (2019) se kmen Proteobacteria, kam se řadí i *Escherichia coli*, nejčastěji vyskytuje u kojenců krmených smíšenou stravou. Z výsledků vyplývá, že u kojence počala pravidelnější a vyšší kolonizace *E. coli* právě v období zařazení smíšené stravy, jednalo se o příkrm v podobě ovoce a zeleniny a byl uskutečněn okolo čtvrtého měsíce života. *E. coli* se běžně vyskytují ve střevech člověka a zahrnují jak patogenní, tak nepatogenní druhy. Většina je ale nepatogenní, jako příklad lze uvést *E. coli* Nissle 1917. Tento druh má příznivé probiotické účinky na zdraví novorozenců i dospělých, a tak ho lze využít při trávicích obtížích či k zabránění šíření patogenních druhů mikroorganismů (Jonkers et al. 2012). Některé jiné nepatogenní kmeny *E. coli* mohou pomoci při tvorbě vitamínů, například B₁₂. Naopak patogenní kmeny *E. coli* se řadí mezi nejčastější kontaminanty potravin, k rizikovým patří například tepelně neopracované maso a mléko nebo i ovoce a zelenina (Karpíšková 2015). *E. coli* byly u kojence zjištěny v průměrném množství $3,59 \pm 4,04$ log KTJ/g, což poukazuje na fakt, že byla míra kolonizace v traktu kojence velice různorodá.

7 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda podávání vhodných probiotických bakterií jako jsou zástupci rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* může pomoci eliminovat výskyt kojeneckých kolik a klostridií v mikrobiotě kojence. Již od narození kojeneček dostával probiotika v rámci kojenecké výživy (BEBA COMFORT; *Lactobacillus reuteri*), dále pak ve věku 30 dnů jako 15denní intervenci formou probiotických kapek BioLac obsahujících *Bifidobacterium breve* a *Lactobacillus plantarum*, a od 4. měsíce jeho jídelníček obsahoval různé příkrmy, nejčastěji s obsahem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

Hypotéza se potvrdila, neboť po podání probiotických kapek klostridie již nebyly více kultivačně detekovány, koliky vymizely, a podaný bifidobakteriální druh *B. breve* úspěšně kolonizoval trávicí trakt a byl detekován ve vysokých počtech v průběhu celého roku. Další probiotickou složkou kapek byl *L. plantarum*, který se z žádných testovaných vzorků stolice nepodařilo kultivačně detekovat. Pravděpodobně zde nedošlo ke kolonizaci. Nicméně od počátku rozborů byl ve vzorcích detekován v relativně vysokých počtech *Lactobacillus rhamnosus*, kdy se jednalo o přirozenou kolonizaci a s tímto druhem byl často detekovaný i *L. reuteri*, který byl součástí kojeneckého mléka. Během prvních dnů života tyto uvedené laktobacily však nedokázaly účinně potlačit detekované klostridie, na rozdíl od intervence bifidobakteriemi. Ve stravě dodávaný bifidobakteriální druh *B. animalis* subsp. *lactis* byl kultivačně detekován jen jednou, ale během vývoje došlo k přirozené kolonizaci *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum*.

8 Literatura

- Acheson DWK. 2009. Food and Waterborne Illnesses. Pages 365–381 in Schaechter M. Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, USA.
- Adámková V, Blechová Z. 2015. Antibiotika musí být používána s rozmyslem. *Pediatric pro Praxi* **16**(5):355-356.
- Aguilar-Toalá JE, García-Varela R, García H, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Córdoba B, Hernández-Mendoza A. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science and Technology* **75**:105-114.
- Antunes P, Novais C, Peixe L. 2020. Food-to-Humans Bacterial Transmission. *Microbiology spectrum* **8**(1):161-193.
- Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. 2014. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol* **5** (e427) DOI: 10.3389/fimmu.2014.00427.
- Arumugam M, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174–180.
- Austin B. 2017. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek* **110**:1247–1256.
- Azad MB, et al. 2015. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology* **123**(6):983–993.
- Bailey LC, Forrest CB, Zhang P, Richards TM, Livshits A, DeRusso PA. 2014. Association of antibiotics in infancy with early childhood obesity. *JAMA pediatrics* **168**(11):1063–1069.
- Behjati S, Tarpey PS. 2013. What is next generation sequencing?. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition* **98**(6):236–238.
- Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* **86**:13-15.
- Bejaoui S, Poulsen M. 2020. The impact of early life antibiotic use on atopic and metabolic disorders: Meta-analyses of recent insights. *Evolution, medicine, and public health* **2020**(1):279–289.
- Bode L, Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. 2012. *Glycobiology* **22** (9):1147–1162.
- Bunesova V, Killer J, Javurkova B, Vlkova E, Tejnecky V, Musilova S, Rada V. 2017. Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Anaerobe* **44**:40–47.
- Bursová Š, Karpíšková R, Dušková M, Necidová L. 2014. Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. *Obecná mikrobiologie. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.*
- Cani PD. 2018. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**(9):1716–1725.

- Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Newburg DS. 2001. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* **11**(5):365–372.
- Claesson MJ, et al. 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(1):4586–4591.
- Cox LM, Blaser MJ. 2015. Antibiotics in early life and obesity. *Nature reviews. Endocrinology* **11**(3): 182–190.
- Dinu M, Pagliai G, Casini A, Sofi F. 2018. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *European Journal of Clinical Nutrition* **72**:30–43.
- Dueñas M, Muñoz-González I, Cueva C, Jiménez-Girón A, Sánchez-Patán F, Santos-Buelga C, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. 2015. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMed research international* **2015**:1-15.
- Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. 2010. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **16**(11):1604–1613.
- Fairlie T, Zell ER, Schrag S. 2013. Effectiveness of intrapartum antibiotic prophylaxis for prevention of early-onset group B streptococcal disease. *Obstetrics and gynecology* **121**(3):570–577.
- Frič P. 2008. Probiotika, prebiotika a atopie. *Pediatric pro praxi* **9**(1):46-50.
- Frič P. 2010. Střevní mikroflóra, gastrointestinální ekosystém a probiotika. *Medicína pro praxi* **7** (11):408-414.
- Frühauf P. 2017. Střevní mikrobiota a možnosti ovlivnění. *Pediatric pro praxi* **18**(4):239-242.
- Gibson GR. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *The British journal of nutrition* **80**(4): S209–S212.
- Gibson GR, et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**(8):491-502.
- Gil A, et al. 2020. Is there evidence for bacterial transfer via the placenta and any role in the colonization of the infant gut? - a systematic review. *Critical reviews in microbiology* **46**(5):493–507.
- 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**(5778):1355-1359.

- Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa Ade A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S. 2010. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water research* **44**(15):4325-4339.
- Guinane CM, Tadrous A, Fouhy F, Ryan CA, Dempsey EM, Murphy B, Andrews E, Cotter PD, Stanton C, Ross RP. 2013. Microbial composition of human appendices from patients following appendectomy. *mBio* **4** (e00366-12) DOI: 10.1128/mBio.00366-12.
- Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E, Flint HJ. 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS microbiology ecology* **39**(1):33–39.
- Hopkins MJ, Macfarlane GT. 2002. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *Journal of medical microbiology* **51**(5): 448–454.
- Hung YP, Lee JC, Lin HJ, Liu HC, Wu YH, Tsai PJ, Ko WC. 2015. Clinical impact of *Clostridium difficile* colonization. *Journal of microbiology, immunology, and infection* **48**(3):241-248.
- Huong TT, Komínková M, Guráň R, Ruttkay-Nedecký B, Kopel P, Trnková L, Zítka O, Adam V, Kizek R. 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. Page 64 in Zítka O, Kizek R. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. Mendelova univerzita v Brně, Brno.
- Huttenhower C, et al. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**(7402):207-214.
- Ianiro G, Tilg H, Gasbarrini A. 2016. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut* **65**(11):1906–1915.
- Jabandžiev P, Papež J, Pinkasová T, Pecl J, Veverková M, Kunovský L. 2019. Postbiotika a jejich využití v pediatrii. *Pediatr. praxi* **20**(3):142-147.
- Jangi S, Lamont JT. 2010. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**(1):2-7.
- Jonkers D, Penders J, Masclee A, Pierik M. 2012. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs* **72**(6):803–823.
- Josephs-Spaulding J, Beeler E, Singh OV. 2016. Human microbiome versus food-borne pathogens: friend or foe. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 4845–4863.
- Karpíšková R. Máme se obávat bakterií *Escherchia coli*?. *Výživa a potraviny*. 2011. Available from <https://www.vyzivaspol.cz/mame-se-obavat-bakterii-escherchia-coli/> (accessed March 2021).
- Kim A. 2015. Dysbiosis: a review highlighting obesity and inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* **49**(1):S20–S24.

- Kokešová A. 2009. Imunomodulační účinky probiotik v klinické praxi. *Solen* **10**(3):169-174.
- Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *The British journal of nutrition* **87**(2):S193–S197.
- Lagier JC, et al. 2016. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature microbiology* **1**(e16203) DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.203
- Laitinen K, Kalliomäki M, Poussa T, Lagström H, Isolauri E. 2005. Evaluation of diet and growth in children with and without atopic eczema: follow-up study from birth to 4 years. *The British journal of nutrition* **94**(4):565–574.
- Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. 2016. The healthy human microbiome. *Genome Med* **8** (51) DOI: 10.1186/s13073-016-0307-y.
- Lukáš M, Klinické výzkumné centrum střevních zánětů, ISCARE as Lighthouse IVF. 2015. Prebiotika, probiotika a střevní mikroflora. *Interní medicína pro praxi* **17**(1):14-17.
- Malla MA, Dubey A, Kumar A, Yadav S, Hashem A, Abd Allah EF. 2019. Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment. *Frontiers in immunology* **9** (e2868) DOI 10.3389/fimmu.2018.02868.
- Matijašić M, Meštrović T, Paljetak HČ, Perić M, Barešić A, Verbanac D. 2020. Gut Microbiota beyond Bacteria-Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *International journal of molecular sciences* **21**(e2668) DOI:10.3390/ijms21082668.
- Merenstein D, Murphy M, Fokar A. et al. 2010. Use of a fermented dairy probiotic drink containing *Lactobacillus casei* (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study A patient-oriented, double-blind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Eur J Clin Nutr* **64**:669–677.
- Milani C, et al. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews* **81** (e00036-17) DOI: 10.1128/MMBR.00036-17.
- Mohammed S, Birhan G, Admassu B, Shite A, Yeneneh H. 2015. Review on Polymerase Chain Reaction and its Diagnostic Merit Over Conventional Techniques in Animal Disease. *African Journal of Basic & Applied Sciences* **7**(5): 262-281.
- Moossavi S, et al. 2019. Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe* **25**(2):324-335.
- Musilová Š, Rada V. 2015. Vliv oligosacharidů mateřského mléka na střevní mikrobiotu kojenců. *Pediatr. praxi* **16**(1):17-19.
- Nocerino R, et al. 2020. The therapeutic efficacy of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in infant colic: A randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* **51**(1):110-120.
- Olszak, T, et al. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* **336**(6080):489–493.

- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* 5 (e177) DOI 10.1371/journal.pbio.0050177.
- Pärty A, Luoto R, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. 2013. Effects of early prebiotic and probiotic supplementation on development of gut microbiota and fussing and crying in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of pediatrics* **163**(5):1272–1277.
- Ramos S & Martín M. 2021. Impact of diet on gut microbiota. *Current Opinion in Food Science* **37**:83-90.
- Rehbinder EM, Lødrup Carlsen KC, Staff AC, Angell IL, Landrø L, Hilde K, Gaustad P, Rudi K. 2018. Is amniotic fluid of women with uncomplicated term pregnancies free of bacteria? *American journal of obstetrics and gynecology* **219**(3):289e1-289.e12.
- Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology* **37**(2):105–118.
- Rinninella E, Cintoni M, Raoul P, Lopetuso LR, Scaldaferri F, Pulcini G, Miggiano G, Gasbarrini A, Mele MC. 2019. Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients* 11(e2393) DOI 10.3390/nu11102393.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano G, Gasbarrini A, Mele MC. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7(e14) DOI 10.3390/microorganisms7010014.
- Rosenfeldt V, et al. 2002. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **21**(5):411-416.
- Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. 2016. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC gastroenterology* **16**(86) DOI: 10.1186/s12876-016-0498-0.
- Sakkas H, Bozidis P, Touzios C, Kolios D, Athanasiou G, Athanasopoulou E, Gerou I, Gartzonika C. 2020. Nutritional Status and the Influence of the Vegan Diet on the Gut Microbiota and Human Health. *Medicina* 56 (e88) DOI 10.3390/medicina56020088.
- Santos-Marcos JA, Perez-Jimenez F, Camargo A. 2019. The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry* **70**:1–27.
- Selber-Hnatiw S, et al. 2017. Human Gut Microbiota: Toward an Ecology of Disease. *Frontiers in microbiology* 8 (e1265) DOI 10.3389/fmicb.2017.01265.
- Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* **341**(6145):569–573.

- Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg, JL. 2016. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* **529**(7585):212–215.
- Sonnenburgovi, Justin a Erica. 2016. Zdravá střeva: Poznejte tajemství mikrobioty a získejte dlouhodobou kontrolu nad svou váhou, náladou a zdravím. Jan Melvil Publishing, Brno.
- 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**(1):78-88.
- Spor A, Koren O, Ley R. 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature reviews. Microbiology* **9**(4):279–290.
- Stokholm J, et al. 2013. Prevalence and predictors of antibiotic administration during pregnancy and birth. *PloS one* **8**(e82932) DOI 10.1371/journal.pone.0082932.
- Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. 2004. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* **53**(1):1–4.
- Tauchi H, et al. 2019. Gut microbiota development of preterm infants hospitalised in intensive care units. *Beneficial microbes* **10**(6):641–651.
- Triantis V, Bode L, van Neerven R. 2018. Immunological Effects of Human Milk Oligosaccharides. *Frontiers in pediatrics* **6**(e190) DOI 10.3389/fped.2018.00190.
- Tomlinson MS, Lu K, Stewart JR, Marsit CJ, O'Shea TM, Fry RC. 2019. Microorganisms in the Placenta: Links to Early-Life Inflammation and Neurodevelopment in Children. *Clinical microbiology reviews* **32**(3) (e00103-18) DOI 10.1128/CMR.00103-18.
- Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, Yonas W, Alwarith J, Barnard ND, Kahleova H. 2019. The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Frontiers in nutrition* **6** (e47) DOI 10.3389/fnut.2019.00047.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2015. *Microbiology: An Introduction, Global Edition* 12. Pearson, USA.
- Tuominen H, et al. 2018. HPV infection and bacterial microbiota in the placenta, uterine cervix and oral mucosa. *Scientific Reports* **8**(9787) DOI 10.1038/s41598-018-27980-3.
- Turroni F, et al. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One* **7** (e36957) DOI: 10.1371/journal.pone.0036957.
- Ventura M, O'Flaherty S, Claesson MJ, Turroni F, Klaenhammer TR, van Sinderen D, O'Toole PW. 2009. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nature reviews. Microbiology* **7**(1):61–71.
- Vrancken G, et al. 2019. Synthetic ecology of the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* **17**:754–763.
- Wang J, Chen WF, Li QX. 2012. Rapid identification and classification of *Mycobacterium* spp. using whole-cell protein barcodes with matrix assisted laser desorption ionization time of

- flight mass spectrometry in comparison with multigene phylogenetic analysis. *Analytica chimica acta* **716**:133–137.
- Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. 1995. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American journal of clinical nutrition* **61**(6):1402S–1406S.
- Witkin SS, Linhares IM. 2017. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG* **124**:606–611.
- World Health Organization. 2020. Antibiotics resistance. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (accessed February 2021).
- Woodmansey EJ. 2007. Intestinal bacteria and ageing. *Journal of applied microbiology* **102**(5):1178–1186.
- 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(e3306) DOI 10.3390/ijms20133306.
- Yang Q, Liang Q, Balakrishnan B, Belobrajdic DP, Feng Q-J, Zhang W. 2020. Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients* 12(e381). DOI 10.3390/nu12020381.
- Yassour M, et al. 2018. Strain-Level Analysis of Mother-to-Child Bacterial Transmission during the First Few Months of Life. *Cell Host Microbe* **24**:146-154.
- Yatsunencko T, et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**(7402):222–227.
- Zhao Y, Hong K, Jianxin Z, Hao Z, Qixiao Z, Wei C. 2019. *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties. *Journal of Functional Foods* **56**:21-32.
- Zinöcker MK, Lindseth IA. 2018. The Western Diet-Microbiome-Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients* 10(e365) DOI 10.3390/nu10030365.
- Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. 2020. Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* 12 (e2189) DOI 10.3390/nu12082189.
- Zwiehler J, Liszt K, Handschur M, Lassl C, Lapin A, Haslberger AG. 2009. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of *Bacteroides*, *bifidobacteria* and *Clostridium cluster IV* in institutionalized elderly. *Experimental gerontology* **44**(6-7):440–446.

9 Samostatné přílohy

Věk		Vzorek	CP		WSP-MUP		WSP-NOR		Rogosa		TBX	
dny	týdny		log KTJ/g	log KTJ/g	MALDI identifikace izolátů		log KTJ/g	MALDI identifikace izolátů		log KTJ/g	log KTJ/g	
10	1,4	BN1	10,2	8,81	<i>Actinomyces neuii, Clostridium perfringens</i>		<10 ²	žádné izoláty		7,96	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<10 ³
20	2,9	BN2	10,11	6,62	<i>Clostridium difficile, C. perfringens</i>		<10 ²	žádné izoláty		8,37	<i>L. reuteri</i>	<10 ³
30	4,1	BN3	9,35	7,96	<i>A. neuii, C. perfringens</i>		4,95	<i>Clostridium butyricum, Ec. faecalis</i>		7,17	<i>Lactobacillus rhamnosus, L. reuteri</i>	4,32
32	4,4	BN4	9,31	8,91	<i>Bifidobacterium breve</i>		8,82	<i>B. breve</i>		7,11	<i>L. rhamnosus</i>	4,6
34	4,7	BN5	10,44	10,07	<i>B. breve</i>		10,37	<i>B. breve</i>		7,32	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
36	5,0	BN6	10,24	10,2	<i>B. breve</i>		10,04	<i>B. breve</i>		6,64	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
41	5,7	BN7	10,24	9,98	<i>B. breve</i>		9,79	<i>B. breve</i>		6,36	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
*41P	5,7	BN8	10,73	10,94	<i>B. breve</i>		10,68	<i>B. breve</i>		7,16	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
46	6,4	BN9	10,12	10,16	<i>B. breve</i>		10,26	<i>B. breve</i>		6,55	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
53	7,4	BN11	11,06	10,78	<i>B. breve</i>		10,85	<i>B. breve</i>		7,21	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
58	8,1	BN13	10,17	10,25	<i>B. breve</i>		9,92	<i>B. breve</i>		6,01	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
75	10,6	BN14	10,07	9,89	<i>B. breve</i>		9,8	<i>B. breve</i>		7,11	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
80	11,3	BN15	11,87	11,83	<i>B. breve, Bifidobacterium longum</i>		11,7	<i>B. breve</i>		9,63	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
88	12,4	BN16	11,96	11,19	<i>B. breve</i>		11,32	<i>B. breve, B. longum</i>		8,53	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
96	13,6	BN17	10,18	10,33	<i>B. breve</i>		10,38	<i>B. breve</i>		8,84	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
102	14,4	BN18	10,61	10,46	<i>B. breve</i>		10,39	<i>B. breve</i>		8,47	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
106	15,0	BN20	10,62	10,58	<i>B. breve</i>		10,53	<i>B. breve</i>		8,17	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
112	15,9	BN22	10,56	10,7	<i>B. breve</i>		10,51	<i>B. breve, B. longum</i>		8,17	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
119	16,9	BN23	10,75	10,68	<i>B. breve</i>		10,49	<i>B. breve</i>		8,91	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
125	17,7	BN24	9,71	10,13	<i>B. breve</i>		10,29	<i>B. breve</i>		6,62	<i>L. reuteri, L. rhamnosus</i>	<10 ³
131	18,6	BN26	9,61	9,6	<i>B. breve</i>		9,38	<i>B. breve</i>		4,74	<i>L. rhamnosus</i>	<10 ³
139	19,7	BN27	9,65	9,45	<i>B. breve</i>		9,33	<i>B. breve</i>		<10 ²	<i>L. reuteri, L. rhamnosus</i>	<10 ³
147	20,9	BN28	10,56	11,24	<i>B. bifidum, B. longum</i>		11,11	<i>B. longum, B. breve</i>		8,24	<i>L. reuteri, L. rhamnosus</i>	9,81
154	21,9	BN29	11,06	11,2	<i>B. breve</i>		11,75	<i>B. breve</i>		7,83	<i>L. rhamnosus</i>	10,08
161	22,9	BN30	10,04	10,04	<i>B. bifidum, B. breve</i>		10,03	<i>B. breve</i>		7,07	<i>L. rhamnosus</i>	6,28
168	23,9	BN31	11,09	10,89	<i>B. bifidum, B. breve</i>		<10 ²	<i>B. breve</i>		8,42	<i>L. rhamnosus</i>	9,24
175	24,9	BN32	10,75	10,59	<i>B. breve</i>		10,78	<i>B. breve</i>		7,47	<i>L. rhamnosus</i>	10,06
182	25,9	BN34	10,89	10,81	<i>B. bifidum, B. breve</i>		10,67	<i>B. breve</i>		8,48	<i>L. fermentum</i>	9,9
198	28,1	BN35	10,95	10,79	<i>B. bifidum, B. breve</i>		10,78	<i>B. breve, B. longum</i>		6,69	<i>L. fermentum</i>	8,1
212	30,1	BN36	10,5	10,18	<i>B. breve</i>		10,28	<i>B. bifidum, B. breve</i>		6,49	<i>L. reuteri, L. rhamnosus</i>	8,51
229	32,6	BN38	10,56	10,59	<i>B. breve</i>		10,38	<i>B. breve</i>		6,68	<i>L. reuteri</i>	9,68
230	32,7	BN39	10,28	10,3	<i>B. breve</i>		10,13	<i>B. breve, B. longum</i>		6,56	<i>L. reuteri</i>	7,7
*230P	32,7	BN40	9,72	9,82	<i>B. breve</i>		9,6	<i>B. breve</i>		5,46	<i>L. reuteri</i>	8,86
239	34,0	BN41	10,19	9,86	<i>B. bifidum, B. breve, B. longum</i>		9,85	<i>B. bifidum, B. breve</i>		6,14	<i>L. reuteri</i>	6,08
258	36,7	BN43	9,7	9,74	<i>B. breve, B. longum</i>		9,67	<i>B. breve, B. longum</i>		6,06	<i>L. reuteri</i>	5,7
272	38,7	BN45	9,69	9,72	<i>B. breve</i>		9,73	<i>B. animalis, B. breve, B. longum</i>		6,33	<i>L. reuteri</i>	8,07
289	41,1	BN46	9,54	9,65	<i>B. breve, B. longum</i>		9,6	<i>B. breve, B. longum</i>		6,37	<i>L. reuteri</i>	6,56
306	43,6	BN47	9,75	10,03	<i>B. bifidum, B. breve, B. longum</i>		9,96	<i>B. longum</i>		6,03	<i>L. reuteri</i>	<10 ³
318	45,3	BN48	9,86	9,85	<i>B. breve, B. longum</i>		9,66	<i>B. longum</i>		6,62	<i>L. reuteri</i>	5,7
335	47,7	BN49	9,56	9,37	<i>B. breve, B. longum</i>		9,41	<i>B. breve, B. longum</i>		6,14	<i>L. reuteri</i>	<10 ³
347	49,4	BN50	10,13	9,79	<i>B. breve, B. longum</i>		9,6	<i>B. breve, B. longum</i>		5,82	<i>L. reuteri</i>	6,72
365	52	BN66	9,85	9,68	<i>B. breve</i>		9,48	<i>B. longum</i>		5,81	<i>L. reuteri</i>	4,86

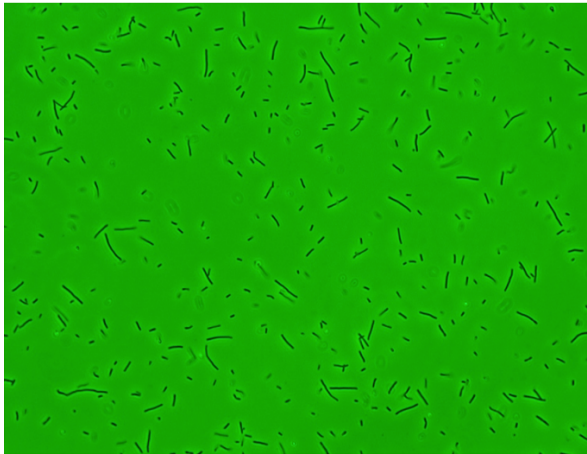
Příloha č. 1 – výsledky z analýzy vzorků pomocí MALDI-TOF

*Vzorky 41P a 230P jsou z průměrové stolice. Počty ani druhová diverzita se nelišila, a tak tyto vzorky nebyly zaneseny do grafu.

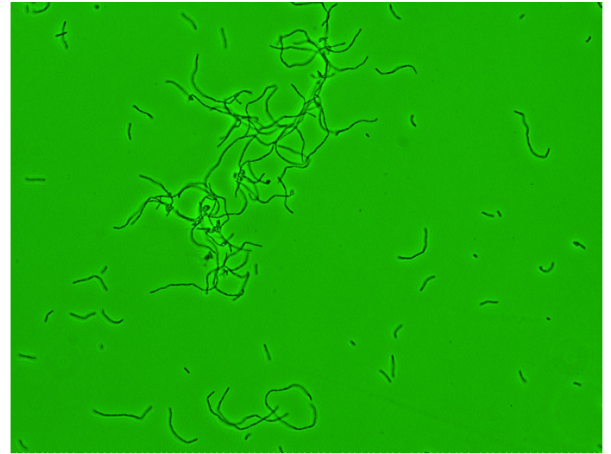
Stáří (dny)	Stáří (týdny)	Vzorek	CP	BIF-NOR	BIF - MUP	LBC	EC
10	1,4	BN1	10,2	<10 ²	8,81	7,96	<10 ³
20	2,9	BN2	10,11	<10 ²	6,62	8,37	<10 ³
30	4,1	BN3	9,35	4,95	7,96	7,17	4,32
32	4,4	BN4	9,31	8,82	8,91	7,11	4,6
34	4,7	BN5	10,44	10,37	10,07	7,32	<10 ³
36	5,0	BN6	10,24	10,04	10,2	6,64	<10 ³
41	5,7	BN7	10,24	9,79	9,98	6,36	<10 ³
*41P	5,7	BN8	10,73	10,68	10,94	7,16	<10 ³
46	6,4	BN9	10,12	10,26	10,16	6,55	<10 ³
53	7,4	BN11	11,06	10,85	10,78	7,21	<10 ³
58	8,1	BN13	10,17	9,92	10,25	6,01	<10 ³
75	10,6	BN14	10,07	9,8	9,89	7,11	<10 ³
80	11,3	BN15	11,87	11,7	11,83	9,63	<10 ³
88	12,4	BN16	11,96	11,32	11,19	8,53	<10 ³
96	13,6	BN17	10,18	10,38	10,33	8,84	<10 ³
102	14,4	BN18	10,61	10,39	10,46	8,47	<10 ³
106	15,0	BN20	10,62	10,53	10,58	8,17	<10 ³
112	15,9	BN22	10,56	10,51	10,7	8,17	<10 ³
119	16,9	BN23	10,75	10,49	10,68	8,91	<10 ³
125	17,7	BN24	9,71	10,29	10,13	6,62	<10 ³
131	18,6	BN26	9,61	9,38	9,6	4,74	<10 ³
139	19,7	BN27	9,65	9,33	9,45	<10 ²	<10 ³
147	20,9	BN28	10,56	11,11	11,24	8,24	9,81
154	21,9	BN29	11,06	11,75	11,2	7,83	10,08
161	22,9	BN30	10,04	10,03	10,04	7,07	6,28
168	23,9	BN31	11,09	<10 ²	10,89	8,42	9,24
175	24,9	BN32	10,75	10,78	10,59	7,47	10,06
182	25,9	BN34	10,89	10,67	10,81	8,48	9,9
198	28,1	BN35	10,95	10,78	10,79	6,69	8,1
212	30,1	BN36	10,5	10,28	10,18	6,49	8,51
229	32,6	BN38	10,56	10,38	10,59	6,68	9,68
230	32,7	BN39	10,28	10,13	10,3	6,56	7,7
*230P	32,7	BN40	9,72	9,6	9,82	5,46	8,86
239	34,0	BN41	10,19	9,85	9,86	6,14	6,08
258	36,7	BN43	9,7	9,67	9,74	6,06	5,7
272	38,7	BN45	9,69	9,73	9,72	6,33	8,07
289	41,1	BN46	9,54	9,6	9,65	6,37	6,56
306	43,6	BN47	9,75	9,96	10,03	6,03	<10 ³
318	45,3	BN48	9,86	9,66	9,85	6,62	5,7
335	47,7	BN49	9,56	9,41	9,37	6,14	<10 ³
347	49,4	BN50	10,13	9,6	9,79	5,82	6,72
365	52	BN66	9,85	9,48	9,68	5,81	4,86

Příloha č. 2 – počty narostlých kolonií u jednotlivých médií a vzorků

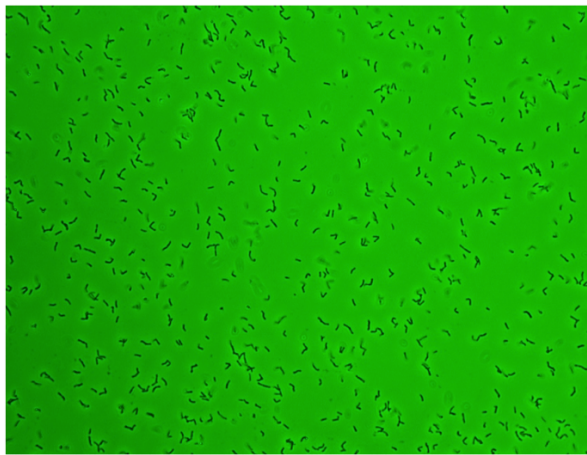
*Vzorky 41P a 230P jsou z průměrové stolice. Počty ani druhová diverzita se nelišila, a tak tyto vzorky nebyly zaneseny do grafu.



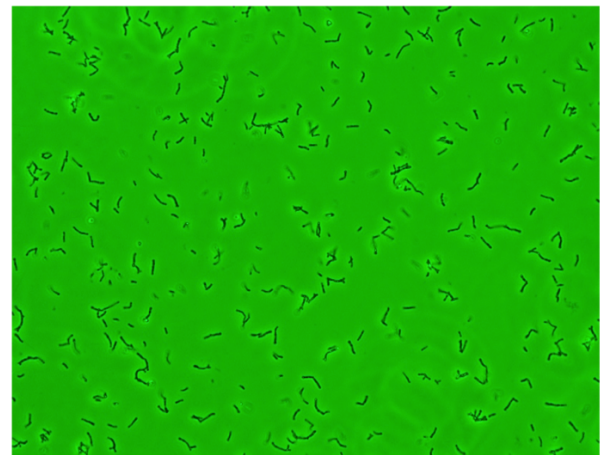
Lactobacillus reuteri



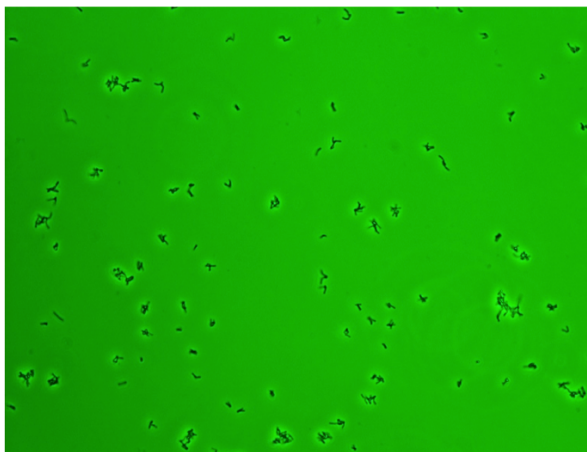
Lactobacillus rhamnosus



Bifidobacterium breve



Bifidobacterium longum



Bifidobacterium bifidum

Příloha č. 3 – příklady nejčastěji detekovaných laktobacilů a bifidobakterií