

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Charakterizace potenciálních probiotik s ochranným
efektem proti salmonelovým infekcím**

Bakalářská práce

Veronika Vanková

Výživa a potraviny (NUTRIB)

Ing. Kristýna Horváthová

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Charakterizace potenciálních probiotik s ochranným efektem proti salmonelovým infekcím" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.04.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Kristýně Horváthové za cenné rady, trpělivost, vstřícnost a odborné vedení, které mi poskytla v průběhu vypracování této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala kolektivu pracovníků v mikrobiologické laboratoři Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (ČZU v Praze) za poskytnutí pracovního prostoru a pomoc při práci v laboratoři.

Charakterizace potenciálních probiotik s ochranným efektem proti salmonelovým infekcím

Souhrn

V gastrointestinálním traktu (GIT) se nachází rozsáhlá populace mikroorganismů, která vytváří komplexní ekosystém. Tento ekosystém je známý jako střevní mikrobiota, která je ovlivněna širokou škálou faktorů, včetně stravovacích návyků, životního stylu, genetiky a užívání léků. Tyto faktory mohou narušit rovnováhu bakterií v těle a tím zásadně ovlivnit zdraví jedince, což může vést k různým zdravotním problémům včetně střevních onemocnění, metabolických poruch nebo syndromu dráždivého tračníku. Využití probiotických bakterií poskytuje rozsáhlé perspektivy k obnově rovnováhy střevních mikroorganismů, která může být narušena mnoha vlivy, jako je užívání antibiotik nebo špatné stravovací návyky. Probiotika mohou dále zlepšit imunitní funkce, podpořit trávení a slouží jako ochrana hostitele před škodlivými patogeny.

Cílem praktické části této práce bylo stanovení vlastností probiotických kmenů. Celkem bylo identifikováno 284 různých bakteriálních kmenů. Každý izolát byl podroben kontrole čistoty a morfologické analýze pod fázovým mikroskopem. Identifikovali jsme izoláty zahrnující 47 druhů bakterií patřících do 11 různých rodů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (MALDI-TOF MS). Následně byla provedena mikrobiologická analýza vybraných 30 kmenů z tlustého střeva a stolic divokých i domácích prasat a selat. Vybrané supernatanty ukázaly schopnost potlačit růst bakterií *Salmonella* s průměrnou velikostí inhibiční zóny $9,23 \pm 1,29$ mm. Nejúčinnější supernatanty pocházely z rodů *Lactobacillaceae*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* a *Clostridium*, přičemž nejúčinnější byl proti *Salmonelle* *Typhimurium* LT2 *Lactobacillus amylovorus* s inhibiční zónou $10,33 \pm 0,58$ mm a proti *Salmonelle* STM kmen *Bifidobacterium thermophilum* s inhibiční zónou $13,33 \pm 0,58$ mm. Testované bakterie nevykazovaly rezistenci vůči testovaným antibiotikům. Nejvyšší hodnoty a rychlost auto – agregace po 24 hodinách byly zaznamenávány u kmenů *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillaceae*, s rozsahem výskytu mezi 21,83 % a 78,00 %. Pro ověření ochranného účinku bakterií v reálném prostředí je nezbytné provést pokusy se selaty, která jsou chována buď ve sterilním prostředí, nebo za normálních podmínek.

Klíčová slova:

Střevní mikrobiota, střevní patogeny, *Salmonella*, probiotické vlastnosti, bakterie

Characterization of potential probiotics with a protective effect against salmonella infections

Summary

The gastrointestinal tract (GIT) contains a large population of microorganisms that form a complex ecosystem. This ecosystem is known as the gut microbiota, which is influenced by a wide range of factors including diet, lifestyle, genetics and medication use. These factors can disrupt the balance of bacteria in the body and thus fundamentally affect an individual's health, which can lead to a variety of health problems including intestinal diseases, metabolic disorders or irritable bowel syndrome. The use of probiotic bacteria provides extensive perspectives to restore the balance of intestinal microorganisms, which can be disturbed by many influences such as the use of antibiotics or poor dietary habits. Furthermore, probiotics can improve immune function, support digestion and serve as host protection against harmful pathogens.

The aim of the practical part of this work was to determine the characteristics of probiotic strains. A total of 284 different bacterial were identified. Each isolate was subjected to purity control and morphological analysis under a phase microscope. We identified isolates comprising 47 bacterial species belonging to 11 different genera by MALDI-TOF mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Subsequently, microbiological analysis of selected 30 strains from the colon and faeces of wild and domestic pigs and piglets was performed. The selected supernatants showed the ability to inhibit the growth of *Salmonella* bacteria with an average inhibition zone size of $9,23 \pm 1,29$ mm. The most effective supernatants were from the genera *Lactobacillaceae*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Clostridium*, with the most effective against *Salmonella Typhimurium* LT2 was *Lactobacillus amylovorus* with an inhibition zone of $10,33 \pm 0,58$ mm and against *Salmonella* STM was the strain *Bifidobacterium thermophilum* with an inhibition zone of $13,33 \pm 0,58$ mm. The tested bacteria did not show resistance to the tested antibiotics. The highest values and auto-aggregation rates after 24 hours were recorded for *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillaceae* strains, with a range of occurrence between 21,83 % and 78,00 %. To verify the protective effect of bacteria in a real environment, it is necessary to perform experiments with piglets reared either in a sterile environment or under normal conditions.

Keywords:

Gut microbiota, intestinal pathogens, *Salmonella*, probiotic properties, bacteria

Obsah

1 Úvod	8
Cíl práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Střevní mikrobiota.....	10
3.1.1 Složení střevní mikrobioty	10
3.1.2 Funkce střevní mikrobioty	11
3.1.3 Vývoj střevní mikrobioty	13
3.1.4 Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu	15
3.2 Probiotika	17
3.2.1 Historie probiotik	18
3.2.2 Zdravotní přínosy probiotik	19
3.2.3 Druhy probiotik.....	22
3.3 Salmonella.....	24
3.3.1 Salmonelové infekce	25
4 Metodika.....	28
4.1 Izolace a identifikace bakteriálních kmenů.....	28
4.2 Příprava médií	29
4.4 Identifikace metodou MALDI-TOF MS	30
4.5 Testování antimikrobiální aktivity	31
4.6 Testování bakterií k nízkému pH a žluči.....	31
4.7 Testování autoagregace.....	32
4.8 Výpočet CFU	33
5 Výsledky.....	34
5.1 Bakteriální izolace a identifikace.....	34

5.2	Kultivační stanovení počtů bakterií ve fekálních vzorcích	34
5.3	Charakterizace potenciálně probiotických vlastností	36
6	Diskuze	37
7	Závěr.....	41
8	Seznam použité literatury.....	42
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	56
10	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Střevní mikrobiota představuje komplexní ekosystém, který zásadně ovlivňuje procesy trávení, imunitní systém a metabolismus (Doré et al., 2013). Tato mikrobiota je tvořena různorodými organismy, včetně virů, parazitů, bakterií, archeí a hub, čímž vytváří širokou paletu ekosystémů (Hugon et al., 2017). Vývoj a složení střevní mikrobioty začíná již krátce po narození, což je ovlivněno porodem a látkami obsaženými v mateřském mléce. Složení střevní mikrobioty v raném věku mohou ovlivňovat faktory spojené s onemocněními v dospělosti (Milani et al., 2017). Mezi faktory, které ovlivňují mikrobiotu patří genetické predispozice, pohlaví, způsob narození, užívání léků, celkový zdravotní stav, lékařské zákroky a samozřejmě stravovací návyky nebo životní styl (Maukonen & Saarela 2015). Mikrobiota má mnoho funkcí a jakákoliv porucha rovnováhy může vést k imunitní nerovnováze a vzniku různých onemocnění. Udržování této rovnováhy mikrobiomu je klíčové pro zachování zdraví a poruchy mohou změnit interakce mezi mikroorganismy a hostitelem z přirozeně symbiotického vztahu na patogenní (Ihekweazu & Versalovic 2018). Změny, které mohou nastat, jsou spojeny s infekcí v trávicím traktu. Ty mohou být potlačeny pomocí probiotik (Hemarajata & Versalovic 2013). Střevní mikrobiota chrání střevo před pronikáním a invazí patogenních mikroorganismů (Zareef et al., 2020). Celosvětově jsou infekce způsobené *Salmonellou* významné riziko, zejména v zemích s nižším stupněm rozvoje (Smith et al., 2016). Tyto infekce přenášené potravinami způsobují úmrtnost a významné zdravotní komplikace po celém světě (Wang et al., 2020), přičemž nejčastěji se projevují gastroenteritidou, která může zahrnovat trávicí potíže, bolesti břicha a zvýšenou teplotu. Většina jedinců se obvykle zotaví do 4 až 7 dnů (Yin & Zhou 2018). Pro obnovení rovnováhy mikrobioty v trávicím traktu a podporu celkového zlepšení fyziologických funkcí a zdraví hostitele se často používají probiotika (Das et al., 2022). Ty mají řadu užitečných funkcí, včetně udržení složení mikroorganismů v trávicím systému. Tímto způsobem bakterie přispívají k udržení optimální rovnováhy mezi patogenními a prospěšnými mikroorganismy, které jsou nezbytné pro správné fungování těla (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Cíl práce

Cílem bakalářské práce bude zpracování přehledné literární rešerše se zaměřením na probiotické mikroorganismy, které budou v in vitro podmínkách inhibovat růst střevních patogenů, zejména bakterií *Salmonella*.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota

Každý jedinec je spojen s určitým společenstvím mikroorganismů, které se v závislosti na prostředí vyvíjí a vytváří s hostitelem jeden celistvý „superorganismus“, který dokáže komunikovat nejen se střevním epitelem, ale také s dalšími orgány. Střevní mikrobiota hraje klíčovou roli při procesech trávení, metabolismu, imunitních funkcích a má široký dopad i mimo gastrointestinální trakt (Doré et al., 2013).

3.1.1 Složení střevní mikrobioty

Střevní mikrobiota představuje komplexní ekosystém s ohromnou diverzitou, která je tvořena rozsáhlým souborem rozdílných organismů zahrnujícím viry, parazity, bakterie, archea a houby (Hugon et al., 2017). Mikroby, které se nacházejí v lidském těle, tvoří 100 bilionů buněk, což převyšuje počet lidských, somatických a zárodečných buněk. Střevní mikrobiota nese 150krát více genů než lidský genom (Qin et al., 2010), což umožňuje zpracovávat látky, které jsou pro člověka nestravitelné. Hustota bakterií se v různých částech trávicího traktu liší, přičemž nejvyšší koncentrace bakterií je obvykle přítomna ve střevech (Ruan et al., 2020). Zejména v tlustém střevě se vyskytuje výrazně větší množství bakteriálních druhů ve srovnání s tenkým střevem a žaludkem (Dwivedi et al., 2021). Od žaludku po lačnick se počet bakterií pohybuje přibližně 10^2 CFU/g v důsledku nízkého pH a přítomnosti trávicích enzymů, v ileu se zase počet bakterií zvyšuje na 10^9 CFU/g (Saarela et al., 2002). Největší četnost bakterií se nachází v tlustém střevě, kde jejich množství dosahuje až 10^{11} - 10^{12} CFU/g (Patterson et al., 2016).

Střevní mikrobiota se skládá z tří různých enterotypů, přičemž každý zahrnuje převahu jednoho rodu bakterií. Enterotyp lze chápat jako specifický typ živého organismu, jehož bakteriální ekosystém ovlivňuje mikrobiotu v souvislosti mezi jednotlivými společenstvy a stravou (Dwivedi et al., 2021). První enterotyp je charakterizován převažujícím rodem *Bacteroides* spp. (Wu et al., 2011), který je asociován s konzumací bílkovin živočišného původu, různými aminokyselinami a nasycenými tuky (Hajela et al., 2015). Ve druhém enterotypu dominuje rod *Prevotella* ssp. (Wu et al., 2011), který je spojován s vysokým příjmem sacharidů a jednoduchých cukrů (Hajela et al., 2015) a třetí enterotyp je spojen s rodem *Ruminococcus* ssp. (Wu et al., 2011). Střevní mikrobiota podléhá mnoha vnějším a vnitřním

faktorům a je složena z 1000 různých typů mikroorganismů (Xiao et al., 2015), které mají mnoho funkcí. Tyto funkce zahrnují rozklad nestravitelných zbytků, metabolismus cizorodých látek, tvorbu vitamínů, podporu imunitních reakcí a vytváření bariéry proti patogenním mikroorganismům. Mikroorganismy ve střevech ovlivňují fyzický stav hostitele a mohou přispívat k výskytu různých onemocnění. Mezi tyto nemoci patří například obezita, podvýživa (de Clercq et al., 2016), onemocnění jater, rakovina (Abu-Ghazaleh et al., 2020) a poruchy metabolismu glukózy. Jedním z příkladů je látka imidazolpropionát, která snižuje citlivost buněk reagovat na inzulin, a může tak vést k inzulinové rezistenci, což je faktor spojený s vývojem diabetes mellitus 2. typu (Cani 2019). K dalším onemocněním patří autistické poruchy (Iglesias-Vazquez et al., 2020), zánětlivé onemocnění střev (IBD), sepse a další (Milani et al., 2017).

3.1.2 Funkce střevní mikrobioty

Mikroorganismy, které se nacházejí v lidském trávicím traktu, vykonávají rozmanité funkce, které mohou být rozděleny do tří hlavních kategorií a to na metabolické, strukturní a ochranné (Jandhyala et al., 2015).

Metabolické funkce ovlivňují metabolické procesy těla, energetickou rovnováhu a zahrnují několik klíčových procesů. Mezi hlavní procesy patří rozklad nestrávených složek potravy na vstřebatelné metabolity, jako jsou například mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) (Heintz-Buschart & Wilmes 2018), produkce vitamínů K, E a látek s biologickým účinkem, syntéza aminokyselin a biotransformace žlučových kyselin (Gomaa 2020).

Mikroorganismy v trávicím traktu získávají většinu svých živin ze sacharidů obsažených v přijímané stravě (Jandhyala et al., 2015). Tato skupina mikroorganismů účinně metabolizuje nestravitelné sacharidy včetně celulózy, hemicelulózy, rezistentního škrobu, pektinu, oligosacharidů a ligninu (Gomaa 2020). Fermentace sacharidů, která probíhá v tlustém a tenkém střevě za pomoci mikroorganismů, jako jsou například *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobaacterium*, *Fecalibacterium* a *Enterhobacterium*. Tyto bakterie produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), jako je butyrát, propionát a acetát, které snižují pH střeva a jsou bohatým zdrojem energie pro hostitele (Jandhyala et al., 2015). Všechny SCFA dohromady mohou aktivovat receptory spojené s G-proteinem 41 a 43 (GPR41/43), které se nacházejí v enteroendokrinních buňkách, především v L-buňkách. Tato skupina receptorů je známá svým umístěním v tkáních s vysokou metabolickou aktivitou, jako jsou svaly, játra a tuková tkáň. Tento fakt naznačuje přímou účast SCFA na systémovém energetickém

metabolismu (Rahman et al., 2023). Střevní mikrobiota se dále pozitivně podílí na metabolismu lipidů a to tím, že ovlivňuje a potlačuje aktivitu lipoproteinové lipázy v buňkách a tukové tkáni (Jandhyala et al., 2015).

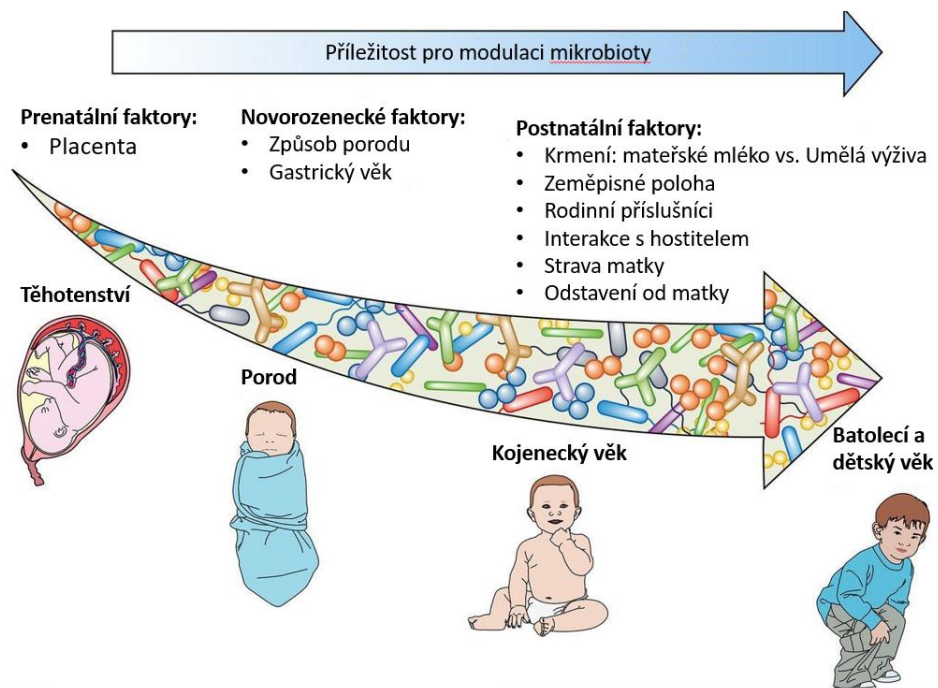
Integrita a správná funkce trávicího systému jsou závislé na harmonickém fungování komplexních mikrobiálních ekosystémů. Mikroorganismy ve střevech podporují formování struktury střevní sliznice prostřednictvím aktivace transkripčních faktorů angiogenin-3, který se podílí na vývoji mikrovaskulatury střev. Střevní mikrobiota má schopnost ovlivňovat složení glykosylačních vzorců v sliznicích, což ovlivňuje místa, kde se mikroorganismy připojují k povrchu buněk nebo na subceluární úrovni (Jandhyala et al., 2015).

Důležitou roli zastává také při ochraně střeva tím, že kolonizuje jeho povrch a vytváří stabilní prostředí, které zabraňuje pronikání patogenních mikroorganismů (Gomaa 2020). Zároveň aktivně působí na odstranění toxických sloučenin a podílí se na stimulaci a regulaci imunitního systému (Heintz-Buschart & Wilmes 2018). Střevní mikrobiota produkuje antimikrobiální látky, které chrání jedince před vnějšími patogeny a také aktivně přispívá k formování sliznice a imunitního systému (Hou et al., 2022). Úzký vztah mezi imunitním systémem a střevním mikrobiomem je klíčový pro udržení rovnováhy, která je nezbytná pro celkovou stabilitu a ochranu organismu (Shi et al., 2017). Mikrobiota poskytuje podporu rozvoje imunitního systému prostřednictvím různých mechanismů, jako je napomáhání rozvoje lymfatických tkání ve střevech nebo ovlivnění produkce IgA protilátek, což omezuje aktivitu přirozené imunitní odpovědi tím, že potlačuje vyjádření určitých genů bakterií (Zareef et al., 2020). Jedním z hlavních způsobů, jak je jedinec schopný udržet rovnováhu mikrobioty, v homeostatickém stavu, je omezování kontaktu mikroorganismů s povrchem epitelových buněk. Tím lze minimalizovat zánět tkání a předejít translokaci mikrobů (Belkaid & Hand 2014).

Normální a zdravá mikrobiota hraje pozitivní roli při formování střevních lymfatických tkání (GALT), které jsou klíčové pro spuštění imunitní odpovědi. Navíc ovlivňuje vylučování některých IgA protilátek, které snižují aktivitu vrozené imunitní odpovědi tím, že potlačuje projevení některých bakteriálních genů. Jeden z dalších způsobů, kterými bakterie ovlivňují imunitní systém, jsou metabolity, které produkují (Zareef et al., 2020). Střevní mikrobiota také hraje roli v zamezení průniku a invazi patogenních mikroorganismů do střeva (Zareef et al., 2020).

3.1.3 Vývoj střevní mikrobioty

Kolonizace trávicího traktu novorozenců hraje důležitou roli ve správném fungování jejich imunitního systému a regulaci fyziologie střev. Tento proces zahrnuje vytvoření mikrobiálního ekosystému, který ovlivňuje imunitní odpověď a poskytuje ochranu proti patogenům a snižuje riziko vzniku nemocí po celý život (Collado et al., 2012). Zatímco střevo novorozence je téměř bez mikroorganismů, mikrobiota dospělého člověka je mimořádně složitá a významně ovlivňuje zdraví a nemoci (Hajela et al., 2015). Střevní mikrobiota kojenců prochází rychlým vývojem a během prvních 2 až 3 let života se postupně podobá mikrobiotě dospělého člověka. Složení této mikrobioty je ovlivněno faktory, jako je způsob porodu (vaginální porod nebo císařský řez), způsob výživy (kojení nebo umělá výživa), geografická lokalita a vystavení antibiotikům (Quigley 2017) viz. **obrázek č. 1**.



Obrázek č. 1: Příležitost pro modulaci mikrobioty od těhotenství po dětství (upraveno podle Milani et al., 2017)

Během porodu probíhá formování střevní mikrobioty, kdy dochází k masivní kolonizaci trávicího traktu mikroorganismy. Trávicí trakt dítěte je masivně kolonizován buď mikrobiotou matky (v případě vaginálního porodu) (Power et al., 2014), kdy dominují organismy z rodů *Lactobacillus* a *Prevotella* (Jandhyala et al., 2015), nebo mikroorganismy z prostředí (císařský řez). Děti narozené vaginálně mají v prvních týdnech života vyšší počet

střevních bakterií než děti narozené císařským řezem (Belkaid & Hand 2014). U kojenců narozených císařským řezem převažují mikroorganismy z nemocničního prostředí a z kůže matky a hlavním zástupcem je *Staphylococcus* (Novakovic et al., 2020) V počátečních dnech života dítěte dominují rody *Proteobacteria* a *Firmicutes*. U dětí narozených císařským řezem se *Actinobacteria* objevuje ve stolici mezi 7. a 15. dnem života po narození. Kojenci narození císařským řezem prokazují nižší komplexnost střevní mikrobioty a jsou méně často osídleny mikroorganismy, jako jsou *Bifidobacterium* a *Bacteroides*, zatímco vykazují vyšší výskyt zástupců skupiny *Clostridium difficile*. Rozdíly mezi dětmi narozenými vaginálně a císařským řezem se postupně snižuje, nicméně různorodost u dětí narozených císařským řezem přetrvává až do 12. měsíce života (Milani et al., 2017).

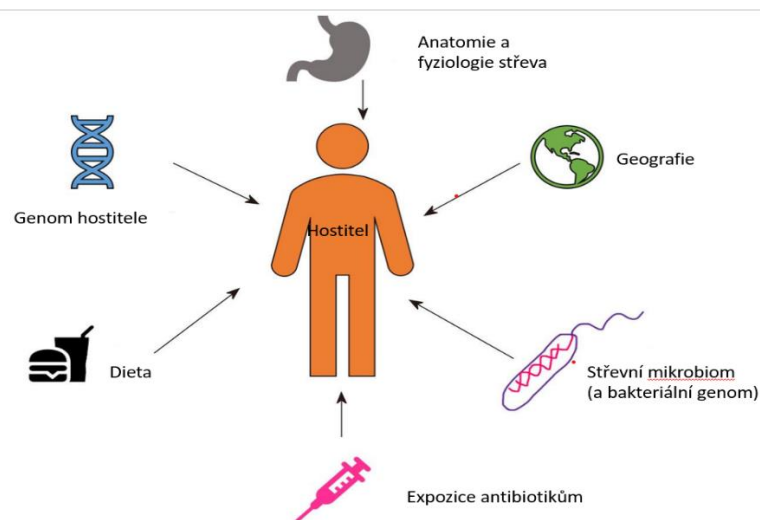
Délka těhotenství neboli gestační věk, hraje klíčovou roli při formování střevní mikrobioty u novorozenců. Označení „předčasně narození“ se používá pro novorozence narozené před dosažením 37. týdne těhotenství (Milani et al., 2017). U dětí narozených předčasně jsou *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* hlavní bakterie, které osidlují střevo. Tyto mikroorganismy jsou obecně ovlivněny druhem stravy, kterou dítě přijímá (Jandhyala et al., 2015). Obsah stolice předčasně narozených dětí vykazuje výrazně vyšší množství *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* a dalších potenciálně patogenních mikroorganismů ve srovnání s novorozenci, kteří jsou narozeni v plné délce těhotenství (Milani et al., 2017).

Kojení je důležitým faktorem, který přispívá k správnému vývoji střevní mikrobioty novorozenců. Mateřské mléko a kolostrum jsou obohaceny o živé mikroby, metabolity, IgA, imunitní buňky a cytokiny (Belkaid & Hand 2014). U kojených dětí dominují ve střevech bakterie *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. V mateřském mléce se nacházejí specifické nestravitelné sacharidy známé jako oligosacharidy lidského mléka (HMO), které tyto bakterie mají schopnost snadno štěpit. Mikrobiota kojených dětí bývá výrazně méně kolonizovaná *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, bakteriemi skupinou *Bacteroides fragilis* a laktobacily než u dětí s umělou výživou. U kojenců krmených umělou výživou, se ve střevech vyskytují převážně *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridium* a *Streptococcus* (Jandhyala et al., 2015). Během období kojení se mikrobiota kojence dynamicky mění. Tento proces je označován jako bakteriální sukcese, která postupně rozvíjí různorodost mikroorganismů a pokračuje až do doby odstavení. Po ukončení kojení se dětská mikrobiota začíná podobat mikrobiotě dospělého člověka. Během této proměny dochází mezi 6-7 měsícem k zavedení příkrmů a mikrobiota kojenců se tak stává stabilnější a složitější. Během tohoto procesu dochází k postupnému přechodu od bakterií z rodů *Proteobacteria* a *Actinobacteria* k mikroorganismům z rodů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, které se stávají hlavními složkami

mikrobioty u kojenců (Milani et al., 2017). Přibližně ve věku tří let se dětská mikrobiota stabilizuje a formuje na tzv. dospělé mikrobiotu. Z pohledu změn druhů mikroorganismů prochází mikrobiota kojenců postupným vývojem a převažující *Bifidobacterium* nakonec ustoupí mikrobiotě dospělého, kde dominují *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. U dospělých jedinců je složení střevní mikrobioty ovlivněno hlavně vnějším prostředím, zejména životním stylem, stravovacími návyky, fyzickou aktivitou, spánkovými vzory a užíváním léků (Cresci & Bawden 2015). S přibývajícím věkem dochází k výrazným změnám ve složení střevní mikrobioty a to v důsledku zhoršení fyziologických funkcí, jako jsou například omezená střevní funkce, obtíž se žvýkáním a oslabený imunitní systém. U mikrobioty starších jedinců dochází k snížení počtu některých prospěšných rodů, jako jsou *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, a zároveň dochází k výraznému nárůstu počtu bakterií, které se v populaci mohou vyskytovat (Li et al., 2021). V jejich mikrobiotě dominuje bakterie *Bacteroidetes*, zatímco u mladší populace převažuje skupina bakterií *Firmicutes* (Cresci & Bawden 2015). Změny, které probíhají ve střevní mikrobiotě starších osob, odrážejí jejich horšící se zdravotní stav, léky a výživa, což zvyšuje sklon k nemocem a infekcím (Hajela et al., 2015).

3.1.4 Faktory ovlivňující střevní mikrobiotu

Střevní mikrobiotu může ovlivňovat několik faktorů. Mezi tyto faktory patří genetika, pohlaví, způsob porodu, užívání léků, zdravotní stav jedince, lékařské zákroky a v neposlední řadě dieta a životní styl (Maukonen & Saarela 2015) viz. **Obrázek č. 2**.



Obrázek č. 2: Faktory ovlivňující vývoj střevního mikrobiomu (upraveno podle Novakovic et al., 2020)

Udržování rovnováhy mikrobiomu je klíčové pro zachování zdraví. Porušení této rovnováhy může přeměnit vztah mezi mikroorganismy a hostitelem ze symbiotického na patogenní (Ihekweazu & Versalovis 2018). Jakékoliv narušení normálního a zdravého mikrobiálního profilu je označován jako dysbióza. Tato nerovnováha může ovlivnit složení, rozmanitost a funkce mikroorganismů, které běžně obývají určité prostředí nebo organismus (Sankararaman et al., 2023). Dysbióza je nejčastěji spojována s nepříznivými vlivy a může mít dlouhodobý dopad vedoucí k poruchám nebo onemocněním. Mezi tyto onemocnění patří především obezita, diabetes, zánětlivé onemocnění střev (IBD) (Milani et al., 2017), alergie, astma, podvýživa (de Clercq et al., 2016), onemocnění jater, rakovina (Abu-Ghazaleh et al., 2021), metabolické onemocnění (Cani et al., 2019), poruchy autistického spektra, sepse a další (Igesias-Vázquez et al., 2020).

Výživa je jedna z klíčových hledisek ovlivňujících složení mikroorganismů v trávicím traktu (Cresci & Bawden 2015). Znalosti, ohledně vlivu stravy a nutričního stavu na složení a funkci střevní mikrobioty a následně na zdraví trávicího traktu, se objevují jak v základním, tak klinickém výzkumu (Aziz et al., 2013). Nedávno bylo například prokázáno spojení mezi stravou, mikrobiotou, celkovým zdravím, procesem stárnutí a zánětlivými reakcemi. V této konkrétní studii bylo zjištěno, že složení střevní mikrobioty u starší populace úzce souvisí s křehkostí kostí, výskytem onemocnění nutričního stavu, zánětlivými markery a metabolity v trávicím traktu (Claesson et al., 2012). V nedávné významné studii, která porovnávala mikrobiotu evropských dětí a dětí z venkovských oblastí v Africe, bylo zjištěno, že strava výrazně ovlivňuje složení a funkce mikroorganismů (Aziz et al., 2013).

Strava spojená s vysokým obsahem ovoce, zeleniny a vlákniny byla spojena s mikrobiálním obohacením, na rozdíl od západní stravy bohaté na tuky, cukry a živočišné bílkoviny a chudé na vlákninu (Cresci & Bawden 2015). Výzkum prokázal, že strava, která má vysoký obsah vlákniny, je klíčová pro posílení mikrobioty obsahující *Bacteroidetes* a bakterie, které jsou známy svými geny pro rozklad celulózy a xylanu (Aziz et al., 2013). Mikroorganismy v trávicím traktu vegetariánů a veganů vykazovaly výrazně menší počty druhů mikrobů, konkrétně *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *E. coli* a *Enterobacteriaceae*, a měly nižší pH stolice v porovnání s všežravci. Na rozdíl od stravy všežravců, vegetariánská/veganská strava obsahuje vyšší množství sacharidů a vlákniny, což umožňuje střevní mikrobiotě fermentovat nestravitelné polysacharidy na krátké řetězce (Cresci & Bawden 2015).

Stárnutí představuje postupný proces, kdy dochází k postupné ztrátě rovnováhy v tělesné funkci, zhoršení celkového zdraví. Součástí tohoto procesu jsou i onemocnění spojená s věkem,

zahrnující infekční, nádorová, metabolická a degenerativní onemocnění, provázená křehkostí kostí a úbytkem kognitivních funkcí. Variabilita změn v mikrobiomu spojených s věkem je výrazná a je ovlivňována jak osobními faktory, tak vnějším prostředím. (Ghosh et al., 2022).

Antibiotika se běžně využívají k odstranění nebo prevenci bakteriální kolonizace v lidském těle, a to bez zaměření na určité druhy bakterií (Angelucci et al., 2019). Léčba antibiotiky není zaměřena pouze na škodlivé mikroorganismy, ale také na mikrobiální komunity v trávicím traktu spojené s hostitelem (Cresci & Bawden 2015). Účinky antibiotik na složení mikrobioty mohou být výrazné a obvykle dochází k obnově většiny (i když ne všech) mikroorganismů ve střevech do jejich běžných hodnot během několika týdnů po ukončení léčby (Dethlefsen et al., 2007). Bylo prokázáno, že geny bakterií, které jsou odolné vůči různým lékům se šíří již tisíce let před vynálezem antibiotik. Toto svědčí o vlivu expozice malých molekul s inhibičními vlastnosti růstu, které byly přítomny v okolním prostředí (Jandhyala et al., 2015). Antibiotika přispívají k rozšiřování populace kmenů odolných vůči antibiotikům, která mohou fungovat jako místo, kde jsou uchovány geny rezistence v mikroprostředí střeva. Po ukončení léčby dochází obvykle ke snížení rozmanitosti mikrobiomu (Cresci & Bawden 2015). Podávání antibiotik snižuje celkovou rozmanitost druhů ve střevní mikrobiotě, což vede ke ztrátě některých zásadních skupin bakterií. Tato změna vede k metabolickým změnám, které zlepšují schopnost střeva kolonizovat bakterie, které podporují vývoj bakteriální rezistence vůči antibiotikům (Ramirez et al., 2020).

I když dochází k postupné obnově většiny bakterií, některé druhy mohou být ze společenstva trvale vyloučeny (Cresci & Bawden 2015). Zlepšení funkcí současných mikrobiálních společenstev, ovlivnění bohatství a rozmanitosti střevního mikrobiomu, obnovu rovnováhy a změny ve složení střevního mikrobiomu, které jsou spojovány s infekcemi v trávicím traktu, mohou být potlačeny podáním probiotik (Hemarajata & Versalovic 2013). U dětí je uváděno, že obnovení mikrobiální rozmanitosti po užívání antibiotik trvá přibližně jeden měsíc. U dospělých pak podání kombinace meropenemu, gentamicinu a vankomycinu vedlo k zvýšení výskytu *Enterobacteriaceae* a dalších patobiontů, zatímco se současně snížil počet druhů *Bifidobacterium* a druhů produkujících butyrát (Ramirez et al., 2020).

3.2 Probiotika

Probiotika představují živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v optimálním množství, přinášejí hostiteli řadu zdravotních výhod. Tyto mikroorganismy pomáhají obnovit

mikrobiální rovnováhu trávicího systému a podporovat celkové zlepšení fyziologických funkcí a zdraví hostitele (Das et al., 2022). Pro dosažení maximálních účinků je důležité užívat probiotika pravidelně a v doporučeném množství jak prostřednictvím potravy, tak pomocí specifických doplňků stravy (Sanders et al., 2018). Mezi probiotika patří různé druhy bakterií, jako jsou *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, některé *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, a také kvasinky, například *Saccharomyces* (Oniszczyk et al., 2021).

3.2.1 Historie probiotik

Užívání probiotik se prakticovalo již před objevením mikrobů (McFarland 2015). Informace o pozitivních dopadech fermentace kyseliny mléčné na lidské zdraví jsou známy již od starověku (Markowiak & Śliżewska 2017). Elie Metchnikoff byl průkopníkem v oblasti medicíny, který představil myšlenku, že ovlivnění střevního mikrobiomu prostřednictvím prospěšných bakterií obsažených v jogurtu může pozitivně ovlivnit lidské zdraví. Tato myšlenka se stala základem pro koncept probiotik v oblasti medicíny (Yadav et al., 2022). Některé lékařské a oblíbené informační zdroje tvrdí, že první využití probiotik v průběhu lidské historie se odehrálo již v roce 2000 př. n. l., kdy byl poprvé objeven způsob, jak dlouhodobě uchovat mléko. První výrobci potravin vytvořili fermentované mléčné výrobky tím, že použili bakterie a kvasinky, aniž by věděli o jejich přítomnosti. Lidé v minulosti využívali fermentované produkty jako prostředek k léčení některých onemocnění. Tyto produkty byly ceněny pro svůj bohatý obsah živin a přítomnost aktivních mikroorganismů, které mohou účinně bojovat proti určitým infekcím (Ozen & Dinleyici, 2015).

V rámci vývojové fáze byl poprvé navržen probiotický přípravek s cílem léčit infekce způsobené bakterií *E. coli* u prasat. Tuto inovaci představila studie od Orrhage et al., 1994. Stejně tak Mann a Spoerig (1974) zjistili, že jedinci, kteří pravidelně konzumovali jogurty fermentované pomocí bakterií *Lactobacillus spp.*, vykazovali sníženou hladinu cholesterolu v krvi (Yadav et al., 2022).

Původní probiotika obsahovala pouze jeden druh mikroorganismu, zejména *Saccharomyces* nebo *Lactobacillus*. Následné studie byly souhrnně analyzovány v metaanalýzách, prokázaly přínos použití těchto probiotik při prevenci infekčního průjmu a průjmu vyvolaného užíváním antibiotik, jako je například kolitida způsobená bakterií *Clostridium difficile*. Další generace probiotik obsahovala širší spektrum mikroorganismů s počtem od 10^8 do více než 10^{10} organismů (Wieërs et al., 2020).

Dříve, než byl objeven mikroskop, měli lidé znalosti o přípravě různorodých mléčných výrobků s odlišnou chutí a strukturou. Tato rozmanitost vznikla v důsledku různých mikrobiálních reakcí, jež byly vyvolány různými mikroorganismy (Amara & Shibl 2015). Již na začátku 20. století projevil výrazný zájem o proces mléčného kvašení ruský vědec a imunolog Ilja Mečnikov, který pracoval pro Pasteurův ústav v Paříži a byl oceněn Nobelovou cenou v medicíně za své práce v oblasti imunologie v roce 1907 (Markowiak & Śliżewska 2017).

3.2.2 Zdravotní přínosy probiotik

Probiotika plní v lidském těle řadu užitečných funkcí, z nichž klíčovým přínosem je jejich schopnost ovlivnit vývoj mikroorganismů v lidském trávicím systému. Tímto způsobem se bakterie snaží udržet optimální rovnováhu mezi škodlivými patogeny a prospěšnými bakteriemi, které jsou nezbytné pro správné fungování lidského těla (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Mikroorganismy, které vyhovují stanoveným kritériím, jsou využívány při vytváření funkčních potravin a při zachování potravinářských produktů (Markowiak & Śliżewska 2017). V potravinářském fermentačním průmyslu jsou často využívány mikrobiální kmeny, zejména laktobacily. Bakterie rodu *Lactobacillus* mají schopnost vytvářet nízké pH prostřednictvím produkce kyselin, především kyseliny mléčné, a zároveň produkují primární a sekundární antimikrobiální látky, jako jsou bakteriociny, peroxid vodíku, diacetyl a CO₂ (Dahiya & Nigam 2022).

Pro dosažení pozitivních účinků probiotik je klíčové, aby aktivně využívaly imunitní, hormonální a neurologické mechanismy k chemickému či fyzikálnímu potlačení růstu patogenních bakterií, jako jsou například *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp *Enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *E. coli* (Oniszczyk et al., 2021). Probiotika obsahující zejména *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* a *Streptococcus* byla zkoumána jako potenciální terapeutická alternativa pro zmírnění některých neurologických a psychiatrických onemocnění. Výsledky této studie naznačují, že tyto specifické kmeny probiotik výrazně přispěly ke zlepšení psychologických příznaků, včetně deprese, stresu a úzkosti (Gomaa 2020).

Mechanismus účinku probiotik pravděpodobně spočívá v redukci zánětlivých cytokinů a interakcí s mozkem prostřednictvím specifických nervových drah. Tato interakce následně v konečném důsledku indukuje změny ve funkci neurotransmiterů (Gomaa 2020). Funkční

potraviny s aktivní živou populací probiotik a samotná probiotika získávají stále větší popularitu a uznání v oblasti zdraví. Konzumace potravin obsahujících probiotické kultury přispívá k udržení rovnováhy mikroorganismů v trávicím systému hostitele. Řada výzkumů potvrdila pozitivní účinky probiotik v prevenci střevních potíží, ochraně před rakovinou, posílení imunitních funkcí, zmírnění příznaků syndromu dráždivého tračníku (IBS), snížení hladiny cholesterolu a dalších procesech, jak je popsáno v **tabulce č. 1** (Dahiya & Nigam 2022).

Tabulka č. 1: Úloha střevní mikrobioty ve zdraví a nemoci (upraveno podle Dahiya & Nigam 2022)

POZITIVNÍ ÚČINKY	ŠKODLIVÉ ÚČINKY
Důležitá role při trávení	Gastrointestinální poruchy, zvýšené riziko průjmu
Dodávání živin syntézou vitaminů a antioxidantů	Metabolické poruchy
Degradace xenobiotik	Onemocnění ledvin
Budování a stimulace imunitního systému snížením zánětu ve střevech	Rakovina tlustého střeva, syndrom dráždivého tračníku (IBS), zánětlivé onemocnění střev
	Onemocnění střev (IBD)
Vývoj kognitivních schopností, osa střevo-mozek	Pokles kognitivních schopností
Zlepšení metabolismu lipidů	Zánět jater
Ochrana před patogeny, ochrana epitelových buněk střeva	Obezita
Inaktivace útočnicků a oportunních mikrobů	Vznik a průběh infekčního onemocnění
Citlivost na inzulín	Inzulínová rezistence, Diabetes mellitus
Prevence kardiovaskulárních onemocnění	zvýšené riziko CVD

Probiotika mohou být také účinným prostředkem k prevenci dysbiózy, která může nastat při náročných podmínkách, jako jsou dlouhodobá antibiotická léčba, vysoký fyzický nebo psychický stres a chronická onemocnění. Optimální využití probiotik závisí na přesné dávce, délce podávání, vhodně vybraném kmenu a udržení těchto mikroorganismů v trávicím systému. Při výběru probiotických kmenů je nezbytné dodržovat normy bezpečnosti, účinnosti a technologické vhodnosti stanovené směrnicemi WHO, FAO a EFSA jak je uvedeno v **tabulce č.2** (Markowiak & Śliżewska, 2017)

Tabulka č. 2: Výběrová kritéria probiotických kmenů (upraveno podle Markowiak & Śliżewska 2017).

KRITÉRIUM	POŽADOVANÁ VLASTNOST
BEZPEČNOST	Lidský nebo zvířecí původ
	Izolováno z gastrointestinálního traktu zdravých jedinců
	Historie bezpečného použití
	Přesná diagnostická identifikace (fenotypové a genotypové znaky)
	Absence údajů o souvislosti s infekčním onemocněním
	Absence schopnosti štěpit soli žlučových kyselin
	Žádné nežádoucí účinky
	Nepřítomnost genů odpovědných za rezistenci k antibiotikům lokalizovaných v nestabilních prvcích
FUNKČNOST	Konkurenceschopnost vůči mikrobiotě obývající střevní ekosystém
	Schopnost přežít a udržovat metabolickou aktivitu a růst v cílovém místě
	Odolnost vůči žlučovým solím a enzymům
	Odolnost vůči nízkému pH v žaludku
	Konkurenceschopnost vůči mikrobiálním druhům obývajícím střevní ekosystém (včetně blízké příbuzných rodů)
	Antagonistická aktivita vůči patogenům (e.g., <i>H. pylori</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium difficile</i>).
	Rezistence vůči bakteriocinům a kyselinám produkovaným endogenní střevní mikrobiotou
	Adherence a schopnost kolonizovat některé konkrétní místa v hostitelském organismu a odpovídající míra přežití v gastrointestinálním systému
TECHNOLOGICKÁ POUŽITELNOST	Snadná produkce velkého množství biomasy a vysoká produktivita kultur
	Životaschopnost a stabilita požadovaných vlastností probiotických bakterií během procesu fixace (zmrazení, lyofilizace), přípravy a distribuce probiotických produktů
	Vysoká míra přežití při skladování v hotových výrobcích (v aerobních a mikroaerobních podmínkách)
	Zaručení požadovaných sensorických vlastností hotových výrobků (v případné potravinářského průmyslu)
	Genetická stabilita
	Odolnost vůči bakteriofágům

Existuje několik identifikovaných mechanismů, které objasňují, jak probiotika působí proti onemocněním střevního traktu. Kolonizace představuje jednu z neefektivnějších metod, jak probiotické bakterie jsou schopné potlačit růst patogenních mikroorganismů pomocí produkce různých inhibičních látek, jako jsou organické kyseliny, krátké mastné kyseliny, oxid uhličitý, peroxid vodíku, acetaldehyd, acetoin, diacetyl, bakteriociny a látky s inhibičním účinkem podobným bakteriocinům (Yadav et al., 2022).

Bakteriociny jsou peptidy nebo proteiny, které vznikají v ribozomech bakterií a mají schopnost působit jako antimikrobiální látky. Tyto látky jsou produkovány několika druhy bakterií, které vykazují schopnost účinkovat proti různým patogenním bakteriím, včetně *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* a *Bacillus* (Yadav et al., 2022).

Několik studií potvrdilo, že úprava střevní mikrobioty pomocí probiotik a transplantace fekální mikrobioty může mít vliv na metabolismus hostitele. Tyto výzkumy se zaměřují na širokou škálu mikroorganismů, včetně tradičních probiotik jako jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, kvasinky *Saccharomyces boulardii*, a nověji zkoumané kmeny jako je *A. muciniphila* a *Faecalibacterium prausnitzii*, které jsou považovány za prospěšné bakterie nové generace. Všechny tyto mikroorganismy podpořily zlepšení integrity střevní bariéry, snížení zánětu, a nakonec zlepšení rovnováhy glukózy. Kvasinky *S. boulardii* byly podrobně zkoumány v souvislosti s poruchami a zánětem střevní bariéry. Vedlejší pozitivní účinky těchto kvasinek jsou především spojovány s antimikrobiálními a antitoxickými vlastnostmi a také s jejich schopností podporovat růst střevní sliznice. Bakterie a kvasinky posilují střevní bariéru prostřednictvím různých mechanismů, včetně uvolňování mastných kyselin s krátkým řetězcem, jako jsou butyrát a propionát. Tyto mastné kyseliny hrají klíčovou roli při regulaci mnoha funkcí, včetně exprese genů skrze Histon deacetylázy a interakci s receptory spojenými s G proteiny, například GPR-43 a GPR-41 (Wieërs et al., 2020).

3.2.3 Druhy probiotik

Různorodé bakterie a houby vykazují probiotické vlastnosti, přičemž často využívaná probiotika patří do skupin *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Tyto kmeny jsou součástí běžného lidského mikrobiomu, jsou považovány za bezpečné, nepředstavují riziko nemocí a jsou hlavními typy bakterií mléčného kvašení (BMK). Kromě těchto skupin sem také patří bakterie *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* a *Saccharomyces*. Mezi běžné identifikované druhy patří *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium infantis* (Zawistowska-rojek & Tyski 2018). Bakteriální kmeny nebo druhy s probiotickými vlastnostmi jsou schopné vykonávat prospěšné nebo terapeutické účinky, včetně posílení obranných mechanismů hostitele a redukce zánětu způsobeného patogenními organismy (Here et al. 2022).

Bakterie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis* a *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, přirozeně syntetizují vitaminy skupiny B (B1, B2, B3, B6, B8, B9, B12) v lidském těle. Tyto bakterie rovněž přispívají k posílení imunitního systému,

podporují absorpci vitaminů a minerálů a podněcují tvorbu organických kyselin a aminokyselin (Markowiak & Ślizewska 2017). Výjimečné výsledky byly zaznamenány při využívání určitých typů laktobacilů a bifidobakterií, které prokázaly mimořádnou efektivitu při léčbě průjmů u novorozenců. Bylo ověřeno, že probiotický produkt VSL#3, obsahující kombinaci osmi bakterií, zahrnující laktobacily a bifidobakterie, projevuje protizánětlivé vlastnosti a má ochranný účinek modelu střevního zánětu u myši. V klinických studiích byly prokázány terapeutické účinky vybraných probiotických kmenů při léčbě zánětlivých střevních onemocnění (IBD). Zvláště u pacientů s pouchitidou byl pozorován pozitivní efekt užívání VSL#3, u ulcerózní kolitidy byl účinný *Escherichia coli* Nissle 1917 a u syndromu dráždivého tračníku (IBD) byly přínosné kmeny *Lactobacillus salivarius* UCC4331 a *Bifidobacterium infantis* 35624. Perorální aplikace kmenu *Lactobacillus plantarum* myším s deficitem interleukinu (IL)-10 snižuje závažnost přirozené kolitidy. Novější studie na laboratorních myších modelech také naznačují, že *Lactobacillus casei* BL23 může posilovat systémovou imunitu a chránit před střevním zánětem a kolorektálním karcinomem. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CNCM I-2494, probiotický kmen s dlouhou historií využití ve fermentovaných mléčných výrobcích, byl schopen obnovit integrity střevní bariéry během střevního zánětu. Kromě toho bylo zjištěno, že *L. casei* může posilovat imunitní odpověď u dětí, které dostávají orální vakcínu proti rotavirům, vedoucí k akutním průjmům u kojenců a malých dětí v rozvojových zemích (Bermúdez-Humarán & Langella 2017).

Enterococcus je třetím nejrozšířenějším rodem bakterií, který produkuje kyselinu mléčnou. Ačkoliv není tolik využíván jako probiotikum ve srovnání s *Lactobacillus* a *Streptococcus*, existují osvědčené formy enterokokových bakterií s probiotickými vlastnostmi. Mezi ně patří *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 a *Enterococcus faecium* SF68, které jsou úspěšně využívány při léčbě opakujících se případů sinusitidy, bronchitidy, faryngitidy a průjmů. Dalším kmenem bakterií je *Enterococcus lactis*, která byla identifikována v mléčných výrobcích poprvé v roce 2012. A i přesto, že se v současné době běžně nevyužívá jako komerční produkt její probiotické vlastnosti byly předmětem několika výzkumných studií (Fu et al., 2022).

Escherichia coli je přirozenou součástí lidské mikrobioty a představuje perspektivní nástroj pro aplikace v oblasti medicínského inženýrství. Zvláště se vyzdvihuje *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), která patří mezi nejvyužívanější kmeny, díky své schopnosti k jednoduché genetické manipulaci a probiotickým vlastnostem (Yan et al. 2021). Bylo prokázáno, že (EcN) podporuje tvorbu antimikrobiálních peptidů, zvyšuje schopnost obranné bariéry a posiluje imunitní reakce v tkáních hostitele. Tato bakterie je schopna produkovat různé antimikrobiální

látky a enzymy včetně sideroforů, které vážou železo baktericidních mikrocinů a proteáz. Tato schopnost umožňuje probiotickému kmenu EcN konkurovat jiným kmenům *E. coli* a příbuzným enterobakteriím (Here et al., 2022). Tento určitý typ bakterií, identifikovaný sérotypem O6:K5:H1, je bezpečný a prokazuje schopnost potlačovat růst nebezpečných mikrobů v lidském střevě, včetně bakterií jako *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* a invazivní formy bakterie *E. coli*. Navíc existuje dostatek nástrojů molekulární biologie pro genetické inženýrství tohoto kmene EcN (Yan et al., 2021). Další probiotický kmen, který prokázal pozitivní účinky na lidské zdraví, je kvasinka *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) CNCM I-745. Tento nebakteriální mikroorganismus představuje první kvasinku, která podporuje zdraví hostitele. Mezi její účinky patří snižování zánětů, omezení nadměrné střevní sekrece, neutralizace toxinů, posílení imunitního systému a schopnost potlačit nadměrný růst bakterií (Buts & De Keyser, 2010). Podávání kvasinky *S. boulardii* může přispět k léčbě infekcí jako jsou *Helicobacter pylori*, průjmů (včetně infekcí *Clostridium difficile*, průjmů spojených s užíváním antibiotik a cestovatelských průjmů), zánětlivé střevní onemocnění (IBD), syndromu dráždivého tračníku (IBS), kandidózou, dyslipidemie a rovněž ke gastrointestinálním symptomům spojeným s bakteriálním přerůstáním tenkého střeva (SIBO) u pacientů s roztroušenou sklerózou (Kaźmierczak-Siedlecka et al., 2020).

3.3 Salmonella

Bakterie rodu *Salmonella* patří do čeledi *Enterobacteriaceae* (McQuiston et al., 2008). Jedná se o bičíkaté tyčinkovité gramnegativní fakultativní anaeroby, jejichž primárním výskytem je trávicí trakt (Wang et al., 2020). Tato bakterie je adaptabilní a dokáže přežít a rozmnožovat se v různých vnějších prostředích jako jsou potraviny, voda, půda a vodní toky (McQuiston et al., 2008). Dále je schopna růst při teplotách mezi 8 a 45 stupňů Celsia, snáší pH v rozmezí od 0,4 do 9,0 a je schopna přežít i při nízké aktivitě vody (Rönnqvist et al., 2018). *Salmonella* patří mezi hlavní zdroje potravinově přenosných infekcí, které způsobují onemocnění, mortalitu a významné zdravotní problémy ve všech částech světa (Wang et al., 2020). *Salmonella* se dělí na dva druhy, a to *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* se dále dělí do šesti poddruhů (Smith et al., 2016) (*enterica* I, *salamae* II, *arizonae* IIIa, *diarizonae* IIIb, *houtenae* IV a *indica* VI) (Sánchez-Vargas et al., 2011), přičemž každý poddruh se odlišuje biochemickými vlastnostmi a citlivostí k bakteriofágům (Smith et

al., 2016). *Salmonella enterica* se obvykle šíří kontaminovanými potravinami nebo vodou pomocí fekálně-orální cesty. Při vstupu do těla se *Salmonella* usazuje v tenkém střevě, kde upřednostňuje přichycení na sliznici a následně napadá epiteální buňky v terminálním ileu. Po překonání ochranné vrstvy epitelu interaguje s fagocyty jako jsou dendritické buňky a makrofágy (Wang et al., 2018). Bakterie *Salmonella enterica* je citlivá na kyseliny a musí překonat bariéru žaludečních kyselin, aby se úspěšně usadila v konečném úseku tenkého střeva. Během akutní střevní horečky bylo prokázáno potlačení sekrece žaludeční kyseliny, která se později obnovuje a toto potlačení je spojeno s vážností infekce. Schopnost organismu snášet kyselinu může být klíčovým faktorem určujícím jeho schopnost přechodu do tenkého střeva a může se lišit v závažnosti na konkrétním sérovaru, který organismus infikuje (Crump et al., 2015).

Na rozdíl od *Salmonella enterica* nemá *Salmonella bongori* žádné poddruhy (Sánchez-Vargas et al., 2011) a je považována za samostatný druh díky svým charakteristickým klinickým vlastnostem (Yin & Zhou, 2018).

3.3.1 Salmonelové infekce

Salmonelové infekce jsou celosvětovou hrozbou pro veřejné zdraví, zejména v rozvojových zemích (Smith et al., 2016). Každoročně se 1 z 10 lidí nakazí onemocněním přenášeným potravinami (Zha et al., 2019). Tato onemocnění vyvolávají různé typy infekčních onemocnění jak u lidí, tak u zvířat, přičemž nejčastějším projevem je gastroenteritida. Příznaky infekce NTS (Netyfoidní salmonelózy) jsou způsobeny rozmnožováním bakterií ve střevním epitelu, což vyvolává průjem prostřednictvím zánětlivých procesů a působení toxinů (Smith et al., 2016). Symptomy gastroenteritidy mohou zahrnovat střevní potíže, křeče a horečku. Většina pacientů se obvykle uzdraví do 4-7 dnů (Yin & Zhou 2018).

Podle virulence lze salmonely rozdělit na dvě kategorie: tyfoidní a netyfoidní sérotypy známé jako NTS (Zha et al., 2019). Sérotypy s omezeným hostitelským spektrem nebo specifické pro určité hostitele obvykle dominují ve svém jediném hostiteli. Mezi ně patří *Salmonella Typhi*, která způsobuje břišní tyfus u lidí, *Salmonella Abortusovis* u ovcí, *Salmonella Gallinarum* u kuřat a dalších druhů ptáků s dlouhými zobáky, *Salmonella Choleraesuis* u prasat a *Salmonella Dublin* u skotu. V průmyslově rozvinutých zemích jsou non-tyfoidní salmonely (NTS), včetně *S. Typhimurium* a *S. Enteritidis*, hlavní příčinou salmonelového průjmu u zdravých jedinců a odpovídají za více než polovinu všech zaznamenaných případů salmonelózy (Mkangara 2023). *S. Typhimurium* je obvykle způsobena

požitím syrových nebo kontaminovaných drůbežích výrobků, které se šíří fekálně-orální cestou. U osob s oslabeným imunitním systémem může *S. Typhimurium* způsobit závažné onemocnění, které vyžaduje léčbu antibiotiky nebo dokonce hospitalizaci (Wemyss & Pearson 2019).

Infekce způsobené bakterií *Salmonella enterica* mohou v oblastech s omezenými zdravotními zdroji často vyvolat onemocnění krevního oběhu. Diagnóza těchto infekcí je obvykle velmi obtížná a je spojena s vysokou úmrtností (Crump et al., 2015). Sérotypy *Salmonella enterica* (*S. enterica*) Typhi (Zha et al., 2019), Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C (Crump et al., 2015) obvykle způsobují u lidí onemocnění známé jako břišní tyfus, který se projevuje celkovou infekcí organismu, horečkou a trávicími problémy, včetně průjmu (Zha et al., 2019).

Tyfoidní salmonely, zejména *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Paratyphi A, jsou bakterie, které infikují lidi a způsobují onemocnění známé jako střevní horečka. *Salmonella* Paratyphi B a C jsou specializované na infekci zvířat, především vyšších primátů, a vyvolávají symptomy, které jsou podobné břišnímu tyfu (Mkangara 2023). Břišní tyfus se šíří především kontaminovanou vodou nebo potravinami, které byly znečištěny lidskými výkaly (Crump et al., 2015). Během akutní fáze břišního tyfu mohou *S. Typhi*, které se vylučují v moči a výkalech infikovaných jedinců, přenášet na blízké kontakty pomocí kontaminovaných potravin během jejich přípravy nebo manipulace. Tento krátkodobý přenos se obvykle děje u jedinců, kteří mohou být dočasnými nebo chronickými nositeli s nedostatečnými hygienickými návyky. Naopak, dlouhodobý přenos často nastává prostřednictvím konzumace vody znečištěné lidskými výkaly nebo plodin zavlažovaných nečistými odpadními vodami (Hoffman et al., 2023). Infikovaní pacienti často zažívají přecházející symptomy jako jsou bolesti hlavy, břicha a gastrointestinální potíže (včetně průjmů nebo zácpy). Tyto příznaky jsou následovány horečkou, která se může objevit až po inkubační době trvající jeden týden nebo déle. Bylo identifikováno několik faktorů, které ovlivňují riziko a ochranu hostitele před infekcí salmonelovým tyfem (Crump et al., 2015).

Netyfoidní salmonelóza (NTS) zahrnuje všechna onemocnění způsobená různými sérotypy bakterie *Salmonella* u lidí, která jsou, s výjimkou specifických sérotypů spojených s tyfoidní horečkou: Typhi a Paratyphi A-C. Salmonelóza, představuje akutní gastroenteritidu, která se obvykle šíří ústy. (Kurtz et al., 2017). Frekvence výskytu invazivního onemocnění je ovlivněna imunitní odpovědí hostitele (Mkangara 2023). Akutní enterokolitida je charakteristickým stavem salmonelózy projevujícím se zánětlivým průjmem. Tento symptomatický jev je vzácný u jedinců infikovaných invazivními sérotypy, jako je *Salmonella* Typhi. K infekci obvykle dochází po konzumaci více než 50 000 bakterií, které jsou obsažené

v kontaminované potravě nebo vodě. Symptomy se nejčastěji projevují do 6 až 72 hodin po nakažení (Kurtz et al., 2017). Krevní infekce je zjištěna u přibližně 6 % pacientů trpících průjemovou enterokolitidou. Nejvíce ohrožení jsou kojenci, malé děti, starší jedinci a osoby s oslabeným imunitním systémem (Crump et al., 2015).

Většinou jde o střevní zánět, který obvykle samovolně ustupuje do 5-7 dnů, nicméně u dětí mohou být příznaky často závažnější a trvat mnohem déle. Pokud dochází k významné ztrátě tekutin, může být nezbytná rehydratace prostřednictvím tekutin podávaných ústy nebo intravenózně (Kurtz et al., 2017). U kojenců a jedinců s oslabeným imunitním systémem nebo základním onemocněním, jako jsou chronická onemocnění (diabetes, srdeční choroby nebo respirační onemocnění a další), může dojít k onemocnění i při menším množství bakterií, což zvyšuje možnost přímého přenosu mezi lidmi, i když je to vzácné. Z toho důvodu jsou infekce netyfoidními salmonelami častější u dětí, zejména u těch mladších než 2 roky (Chen et al., 2013).

I přes rostoucí počet případů infekcí způsobených netyfoidními salmonelami (NTS) je úmrtnost z gastroenteritidy způsobené salmonelami především omezena na rozvojové země. Důvodem je nedostatek čisté vody a nedostatečné hygienické podmínky a také nedostatečnou zdravotní infrastrukturou. Tento nedostatek může vést k opožděné diagnóze a kmeny bakterií odolné vůči antibiotikům mohou zůstat nepoznané. V současné době neexistují vakcíny proti netyfoidním kmenům salmonel, a to pravděpodobně kvůli vysoké variabilitě mezi těmito kmeny a nedostatečnému poznání ochranných antigenů (Kurtz et al., 2017).

4 Metodika

Práce je zpracována formou literární rešerše se zaměřením na probiotika s ochranným efektem proti salmonelovým infekcím. Zabývat se bude podrobným popisem různých typů probiotik, včetně užitečnosti ke střevní mikrobiotě. Práce bude obsahovat laboratorní pokus zaměřený na stanovení probiotických vlastností.

4.1 Izolace a identifikace bakteriálních kmenů

Různé typy komenzálních bakteriálních kmenů byly izolovány z tlustého střeva a výkalů divokých a domestikovaných prasat a prasniček. Odebrané vzorky byly přeneseny do zkumavek, které obsahovaly trypton (5 g/l), živý bujón č. 2 (5 g/l), kvasnicový extrakt (2,5 g/l) (vše Oxid, Basingstoke, UK), L-cystein (0,5 g/l), tween 80 (1 ml/l) (oba produkty od Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a glycerol (30 %) (V.W.R., Radnor, PA, USA). Po odebrání vzorků a jejich přenesení do laboratoře pro analýzu byly probiotické kmeny inkubovány a kultivovány během noci při teplotě 37 °C. Následně byla provedena sériová ředění vzorků v logaritmickém měření 10. Tato ředění byla aplikována na různá média pro kultivaci při různých kultivačních podmínkách (**tabulka č. 3**).

Tabulka č. 3: Kultivační média a podmínky použité pro izolaci bakterií ze vzorků prasat

Cílové skupiny bakterií	Kultivační médium	Podmínky kultivace
Bifidobakterie	WSP agar, norfloxacin (100 mg/), mupirocin (100 mg/l (obojí Oxid), ledová kyselina octová (1 ml/l) (Sigma-Aldrich)	37 °C, 48 h, anaerobióza
Laktobacily	Rogosa agar (Oxid), kyselina octová (1,32 ml/l) (Sigma-Aldrich)	37 °C, 72 h, mikroaerobní podmínky
Sporuláty	WSP agar/Tryptone Soya agar (Oxid)	37 °C, 48 h anaerobióza/aerobióza; 80 °C po dobu 10 min před kultivací
Koliformní bakterie	TBX agar (Oxid)	37 °C, 24 h, aerobióza
Celkové anaeroby	Wilkins-Chalgrenův agar, sojový pepton (5 g/l) (obojí Oxid), L-cystein (0,5 g/l) tween 80 (1 ml/l) (obojí Sigma-Aldrich), WSP agar	37 °C, 48 h, anaerobióza

Bakteriální kmeny byly získány na základě rozdílných charakteristik kolonií pozorovaných na všech použitých médiích. Pro následující fáze kultivace byly splněny požadavky na dostupnost kyslíku, udržení požadované teploty a přítomnost vhodného média. Bifidobakterie byly umístěny na Wilkins–Chalgren agar (Oxid) doplněném cysteinem (0,5 g/l),

sojovým peptonem (5 g/l) a tweenem 80 (1 ml/l), zatímco *Lactobacilly* byly kultivovány v MRS broth (Oxid). Poté byly u těchto probiotických kmenů mikroskopicky zkoumány jejich morfologické vlastnosti, ověřena jejich čistota a následně byly analyzovány ribozomální bílkoviny pomocí metody MALDI-TOF-MS.

4.2 Příprava médií

Pro provedení mikrobiologického rozboru byly přichystány ředící řady (**Tabulka 4**).

Tabulka č. 4: Složení ředící řady

Materiál	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Nutrient broth	5 g
Trypton	5 g
Tween 80	0,5 ml
Yeast extract	2,5 g
Cystein	0,25 g

Anaerobní podmínky těchto roztoků byly zajištěny pomocí metody roll-tube metody podle Hungateho (1969). Během této metody dojde k zamezení bakterií a kultivačního média s kyslíkem tím, že se vzduch v kultivační nádobě vymění za bezkyslíkatý plyn, jako je například oxid uhličitý, vodík, dusík nebo jejich směs. Odstranění kyslíku probíhalo v koloně orientované vertikálně obsahující měď (v podobě hrubých měděných pilin). Kolona byla ohřívána na 350 °C pomocí cívky. Redukce mědi byla provedena prouděním plynného vodíku kolonou odspodu nahoru. Aby se předešlo možnému výbuchu, bylo nezbytné kolonu naplnit oxidem uhličitým, což zajistilo odstranění veškerého kyslíku. Oxid uhličitý nebo v případě potřeby dusík byly do kolony přidány postupně a pomalu – prostřednictvím bublání roztoku. Po odstranění kyslíku následovala sterilizace média.

4.3 Mikrobiologický rozbor

Pro provedení mikrobiologické analýzy fekálních vzorků bylo nejprve nezbytné zvážit a přesně odměřit množství vzorků pro další zředění. Poté byl vzorek důkladně homogenizován pomocí vortexu a injekční stříkačkou přenesen 1 ml do dalšího zředění. Postupně byl vzorek zředěn až do koncentrace 10^9 pomocí desítkového ředění. Samotná mikrobiologická analýza

probíhala deskovou metodou. Do velkých Petriho misek o průměru 35 mm bylo aplikováno 0,5 ml inokula, které bylo následně zalito odpovídajícím agarem. Tyto misky byly uzavřeny a kultivovány v anaerostatu za anaerobních podmínek vytvořených AnaeroGenem po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí 48 hodin byl proveden počet kolonií na každé počítatelné Petriho misce, který byl poté zdvojnásoben. Následně byl vypočten dekadický logaritmus počtu kolonií tvořících jednotku na gram (\log_{10} KTJ/g). Před samotnou analýzou byly izoláty narostlých kolonií odebrány do selektivních médií. Za aseptických podmínek byly z každého vzorku odebrány mikrobiologickou kličkou čtyři odlišné kolonie, které byly přeneseny do zkumavek s připraveným anaerobním prostředím s neselektivním médiem pro kultivaci odebraných izolátů při 37 °C po dobu 24 hodin.

4.4 Identifikace metodou MALDI-TOF MS

Pro identifikaci na druhovou úroveň byla využita hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Jedná se o šetrnou ionizační techniku, při které dochází k tvorbě iontů bez fragmentace molekul. Z narostlé čisté kultury byl pomocí sterilní jehly odebrán objem 1 ml, který byl přenesen do sterilních 1,5 ml ependorfeek. Ty byly následně odstředěny po dobu 2 minut při rychlosti 14 000 otáček. Po odstředění byl supernatant odstraněn. K peletu, který sedimentoval na dně zkumavky, bylo přidáno 500 μ l 70 % ethanolu. Tento vytvořený roztok byl následně opět centrifugován při 14 000 otáčkách po dobu 2 minut. Supernatan byl znovu smíchán a zbylý ethanol byl opatrně odstraněn pipetováním, aby nedošlo k porušení sedimentu. Poté bylo k peletu přidáno 15 μ l 70 % kyseliny mravenčí (CH_2O_2) a 15 μ l 100 % acetonitrilu ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), což vede k narušení buňky a uvolnění ribozomálního proteinu. Pro promíchání CH_2O_2 a $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ byla využita třepačka (Vortex) po dobu 30 sekund a poté byly vzorky znovu umístěny do centrifugy a centrifugovány po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách.

Hotový supernatan byl aplikován na MALDI destičku ve dvou kopiích o objemu 1 μ l. Po uschnutí byla na vzorky aplikována matrice MATRIX v množství 1 μ l. Po zaschnutí destičky v pokojové teplotě byla připravena k analýze. Pro analýzu byl využit přístroj MALDI-TOF Autoflex Speed od společnosti Bruker a získaná spektra byla vyhodnocena pomocí softwaru Bruker MALDI Biotyper. Analyzovaný vzorek se porovnává s databází spektrálních informací, aby byl identifikován rod, druh, poddruh nebo kmen zkoumaného mikroorganismu. Vyhodnocení výsledků MALDI-TOF MS vysvětluje **tabulka 5**.

Tabulka 5: Vyhodnocení výsledků MALDI-TOF MS

Rozsah	Vyhodnocení	Barva
2,00 – 3, 00	Identifikace druhu s vysokou mírou jistoty	Zelená
1,70 – 1,99	Identifikace s nízkou mírou jistoty – jistá rodová příslušnost	Žlutá
0,00 – 1,69	Identifikace organismu nelze provést	Červená

4.5 Testování antimikrobiální aktivity

Pro určení antimikrobiální aktivity byla použita metoda difúzního testu. Do celkového počtu bylo zařazeno a podrobena testování 200 potencionálních probiotických kmenů z exkrementů divokých a domácích prasat. Tyto kmeny byly testovány na působení proti *E. Coli* 045, *E. Coli* 055, *Salmonelle* LT2 a *Salmonelle* STM. Pro hodnocení antimikrobiální aktivity bylo nejprve nezbytné získat supernatant z kmenů, které vykazovaly potenciální probiotické vlastnosti. Tento krok byl proveden pomocí centrifugace bakterií při 12 000 otáčkách po dobu 5 minut. Na Petriho misku byl nanesen 1 ml přes noc narostlého patogenního kmene, který byl přelit příslušným 20 ml kultivačním médiem. Pro růst *E. Coli* a *Salmonelly* byl použit agar Wilkins-Chalgren (Oxid) doplněný o cystein (0,5 g/l), sojový pepton (5 g/l) a tween 80 (1 ml/l). Po ztuhnutí agaru byly následně vytvořeny triplikáty o průměru 7 mm za pomoci sterilního korkovrtu a přebytečný agar byl odstraněn sterilní jehlou. Do vyhloubených jamek bylo následně pomocí automatické pipety aplikováno 60 µl supernatantu z potenciálně probiotických kmenu. Před kultivací byly Petriho misky s agarem umístěny do lednice pro lepší absorpci a rozptýlení supernatantu do médií. Po této fázi byly misky kultivovány 48 hodin při anaerobním prostředí v termostatu při 37 °C. Po kultivaci byly sledovány vzniklé inhibiční zóny v okolí jamek a průměr vzniklé zóny byl měřen v milimetrech.

4.6 Testování bakterií k nízkému pH a žluči

Na odolnost vůči žluči a nízkému pH byly vybrány izoláty kmenů, které byly identifikovány jako potencionální probiotika, která zároveň vykazovala schopnost inhibovat růst bakterií.

Před vlastním testováním byly potencionální probiotické bakterie kultivovány v WSP bujónu (Wilkins-Chalgren a sója pepton) 24 h při 37 °C. v anaerobních podmínkách. Čistota těchto kmenů byla ověřena mikroskopicky. Následně byla bakteriální suspenze přenesena za

aseptických podmínek do sterilních plastových zkumavek a umístěna do centrifugy. Centrifugace probíhala po dobu 7 minut při teplotě 20 °C a rychlosti 12 000 otáček za minutu. Supernatant byl ze zkumavek slit a pelet, který zůstal na dně zkumavky byl rozpuštěn ve 2,5 ml fosfátového pufru. Pro úplné odstranění všech zbývajících látek z původního média byl tento postup opakován ještě jednou. Předpřipravená buňková suspenze byla zočkováána do připraveného anaerobního prostředí. Pro posouzení tolerance vůči nízkému pH byl použit fosfátový pufr, do kterého byla přidána zředěná kyselina chlorovodíková, pH bylo upraveno na hodnotu pH 3. Medium, které sloužilo k testování odolnosti vůči žlučovým kyselinám, obsahovalo 1,5 % žlučových kyselin s pufrém. Jako kontrolní vzorek byl použit fosfátový pufr s pH 7,2. Do takto připravených prostředí byla zaočkováána buňková suspenze 0,5 ml a inkubována při teplotě 37 °C. Z připravené suspenze bylo odebráno 0,5 ml do různých ředících řad, které byly připraveny v různých časových intervalech. Pro testování tolerance vůči nízkému pH byly stanoveny intervaly jedné a dvou hodin, zatímco pro snášenlivost vůči žlučovým solím byly intervaly stanoveny na dvě a tři hodiny a pro kontrolu byl zvolen interval 0 až 3 hodiny. Z každého ředění bylo odebráno 0,5 ml suspenze na Petriho misku. Kultivace probíhala za anaerobních podmínek 48 hodin. Ze stanových hodnot byl vypočítán úbytek buněk během inkubace v testovaných prostředích.

4.7 Testování autoagregace

Pro hodnocení autoagregačních vlastností byly vybrány izoláty s potenciálními probiotickými vlastnostmi. Buňky jednotlivých izolátů, které projevovaly schopnost autoagregace Agg (Agg⁺), se shlukovaly do viditelných částic a gravitovaly ke dnu zkumavek, což vedlo k čirému roztoku média. Naopak izoláty bez schopnosti Agg (Agg⁻) produkovaly pouze konstantní zákal. Narostlé izoláty v penicilínkách byly přeneseny do sterilních zkumavek, které byly důkladně promíchány a poté nechány v klidu při pokojové teplotě. V každém jednotlivém intervalu (0, 1, 2, 3, 4, 5) byla odebrána povrchová vrstva suspenze a poté byl změřen zákal při vlnové délce 620 nm. Procentuální schopnost autoagregace (Agg) byla vypočtena pomocí následujícího vztahu, kde O.D. představuje zákal na konci měření a O.D.0 představuje zákal na začátku měření.

4.8 Výpočet CFU

Stabilita a životaschopnost bakteriální směsi (CFU Colony Forming Units) je označení pro množství kolonií bakterií, které mohou vzniknout z jednoho vzorku. Tento počet se stanovuje pomocí metody, kdy se vzorek aplikuje na pevné médium v Petriho misce a po inkubaci se počítají vzniklé kolonie. Tato analýza je důležitá při různých biochemických a genetických experimentech. Výsledný počet mikroorganismů se obvykle uvádí v určitém objemu a poté se přepočítává na 1 ml původního vzorku pomocí vhodného vzorce.

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

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

F – převrácená hodnota vyššího ředění

celé číslo je nutno zlogaritmovat dekadických log

5 Výsledky

5.1 Bakteriální izolace a identifikace

Z analýzy vzorků tlustého střeva a stolice divokých i domácích prasat a selat bylo celkem identifikováno 284 různých bakteriálních kmenů. Každý izolát byl podroben kontrole čistoty a morfologické analýze pod fázovým mikroskopem. Tyto izoláty byly klasifikovány do 47 druhů patřících do 11 různých rodů, pomocí identifikace MALDI-TOF MS (Tabulka 6).

Tabulka 6: Druhy bakterií izolované ze vzorků tlustého střeva a stolice prasat a selat

Cílené skupiny bakterií	Izolované bakterie (počet izolátů)
Bifidobakterie	<i>Bifidobacterium animalis</i> (12) <i>Bifidobacterium apri</i> (3) <i>Bifidobacterium boum</i> (9) <i>Bifidobacterium porcinum</i> (12) <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> (8) <i>Bifidobacterium thermophilum</i> (9) <i>Mitsuokella mulracida</i> (6)
Laktobacily	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (5) <i>Lactobacillus amylovorus</i> (17) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (2) <i>Lactobacillus antri</i> (2) <i>Lactobacillus fermentum</i> (2) <i>Lactobacillus johnsonii</i> (5) <i>Lactobacillus kitasatonis</i> (2) <i>Lactobacillus porci</i> (8) <i>Ligilactobacillus agilis</i> (2) <i>Ligilactobacillus ruminis</i> (10) <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (3) <i>Limosilactobacillus mucosae</i> (4) <i>Limosilactobacillus reuteri</i> (18)
Sporuláty	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (2) <i>Bacillus cereus</i> (2) <i>Bacillus licheniformis</i> (7) <i>Bacillus mycoides</i> (8) <i>Bacillus paramycoides</i> (5) <i>Bacillus subtilis</i> (8) <i>Bacillus thuringiensis</i> (1) <i>Bacillus vallismortis</i> (2) <i>Clostridium cochlearium</i> (3) <i>Clostridium perfringens</i> (10) <i>Clostridium sporogenes</i> (12) <i>Paeniclostridium sordellii</i> (8) <i>Paraclostridium bif fermentans</i> (4) <i>Terrisporobacter glycolicus</i> (1)
Koliformní bakterie	<i>Escherichia fergusonii</i> (3) <i>Escherichia coli</i> (11) <i>Shigella flexneri</i> (4)
Celkové anaeroby	<i>Acidaminococcus fermentans</i> (5) <i>Bacteroides uniformis</i> (9) <i>Enterococcus durans</i> (5) <i>Enterococcus faecalis</i> (9) <i>Enterococcus faecium</i> (7) <i>Eubacterium tenue</i> (3) <i>Mitsuokella mulracida</i> (5) <i>Staphylococcus aureus</i> (6) <i>Staphylococcus warneri</i> (3) <i>Streptococcus alactolyticus</i> (2)

5.2 Kultivační stanovení počtů bakterií ve fekálních vzorcích

Byla provedena mikrobiologická analýza vybraných 30 různých bakteriálních kmenů z tlustého střeva a stolice divokých, domácích prasat a selat. Průměrné celkové počty kultivovatelných anaerobních bakterií (CP) dosahovaly $9,10 \pm 0,66$ log KTJ/g. Pro stanovení bifidobakterií byla použita dvě selektivní média. Průměrné množství bifidobakterií v médiu

WSP s mupirocinem a kyselinou octovou (WSP-MUP) činilo $7,96 \pm 0,40$ log KTJ/g, zatímco v médiu WSP s norfloxacinem, mupirocinem a kyselinou octovou (WSP-NORF) bylo $7,76 \pm 0,36$ log KTJ/g. Pro stanovení sporulátů byl použit WSP agar – Tryptone Soya agar, kde průměrná hodnota dosáhla $6,70 \pm 0,40$ log KTJ/g, a pro koliformní bakterie bylo naměřeno $6,27 \pm 0,63$ log KTJ/g. **Tabulka 7.** Z Petriho misek byly odebrány počitatelné bakteriální kolonie, které byly následně znovu izolovány a kultivovány pro další analýzy.

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

Vzorek	CP	LBC	WSP-MUP	WSP-NORF	CLOS	KOL
1	9,41	9,05	7,61	6,45	6,79	9,43
2	9,43	8,57	7,07	8,19	5,77	9,37
3	8,74	8,16	9,16	7,27	7,7	8,75
4	10,18	9,26	9,18	7,62	7,59	7,86
5	7,7	7,27	6,08	6,83	4,3	8,72
6	10,18	9,87	8,28	6,83	5,06	7,53
7	8,13	7,87	7,7	6,82	7,04	7,21
8	10,07	9,82	8,36	9,08	5,93	6,98
9	9,68	8,86	7,88	6,42	6,11	6
10	9,74	9,26	8,54	7,43	5,06	9,11
11	8,42	7,99	6,78	6,53	7,23	4,23
12	9,16	8,67	9,09	6,79	7,32	5,32
13	9,68	8,86	6,43	7,8	3,3	5,49
14	9,74	9,2	7,95	9,13	4,21	6,13
15	8,42	8,03	6,52	7,39	4,48	5,69
16	9,16	8,67	7,41	9,24	4,68	4,46
17	8,81	7,69	7,88	7,61	4,34	7,65
18	9,22	8,05	9,14	8,59	4,57	6,08
19	9,08	7,3	7,49	7,08	4,51	8,8
20	9,74	8,11	9,25	9,11	4,79	4,49
21	8,1	9,47	7,78	7,41	4,51	4,85
22	8,6	7,69	8,58	8,42	4,79	6,15
23	9,65	7,83	7,13	7,35	5,67	4,89
24	9,56	7,45	9,13	8,74	3,56	5,68
25	7,63	7,6	7,33	7,36	4,49	6,54
26	8,04	7,63	8,63	8,67	4,77	3,79
27	8,62	7,85	7,04	7,68	4	5,11
28	7,77	7,61	9,02	9,17	4,18	4
29	9,33	9,03	7,48	7,15	4,21	4,78
30	8,33	7,61	9	8,75	4,48	3,2
Průměr	9,10 ± 0,66	8,34 ± 0,43	7,96 ± 0,40	7,76 ± 0,36	6,70 ± 0,40	6,27 ± 0,63
CP – Celkový počet						
LBC – Laktobacily						
WSP-MUP – WSP s mupirocinem a kyselinou octovou						
WSP-NORF – WSP s norfloxacinem, mupirocinem a kyselinou octovou						
CLOS – WSP agar – Tryptone Soya agar						
KOL – Koliformní bakterie						

5.3 Charakterizace potenciálně probiotických vlastností

Vybraných třicet supernatantů, obsahujících látky uvolněné z buněk, vykazovalo schopnost potlačit růst bakterií *Salmonella*. Velikost inhibičních zón se pohybovala v rozmezí od 7,00 do 13,33 mm s průměrnou hodnotou $9,23 \pm 1,29$ mm. Naopak u kmenů *E. coli* 045, *E. coli* 055 nebyl tento účinek pozorován. Nejúčinnější supernatanty proti *Salmonelle* pocházely z rodů bakterií *Lactobacillaceae*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* a *Clostridium*. Přičemž nejúčinnější supernatant byl proti *Salmonelle Typhimurium* LT2 *Lactobacillus amylovorus* s velikostí inhibiční zóny $10,33 \pm 0,58$ mm a proti *Salmonelle* STM kmen *Bifidobacterium thermophilum* s velikostí inhibiční zóny $13,33 \pm 0,58$ mm. Naopak bakterie z rodů *Acidaminococcus*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Paeniclostridium*, *Paraclostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Terrisporobacter* neprojevovaly žádnou antibakteriální aktivitu vůči *Salmonelle*. Hodnoty (pH) aktivních supernatantů se pohybovaly mezi 3,5 a 4,1. Po neutralizaci těchto supernatantů jejich schopnost inhibovat růst *Salmonelly* ztratila a pH neaktivních supernatantů bylo blízké neutrální hodnotě nebo mírně kyselé. Obecně byly testované bakterie citlivější na žlučové kyseliny než na nízké pH a při expozici nedocházelo k poklesu o více než jeden řád. Antibiotická citlivost testovaných bakterií byla stanovena podle příslušných kritérií EUCAST a žádný kmen nevykazoval rezistenci vůči testovaným antibiotikům. Na agaru obsahující krev nebyly zjištěny žádné zóny ani čirá, ani zelená barva, což naznačuje, že kmeny bakterií *Bacillus* spp. nevykazovaly žádnou hemolytickou aktivitu. Auto-agregace byla měřena po dobu 24 hodin u 30 kmenů (viz. příloha č. 1). Nejvyšší hodnotu auto-agregace po 24 hodinách a zároveň také nejvyšší rychlost auto-agregace vykazovaly kmeny *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillaceae*, s rozsahem výskytu mezi 21,83 % a 78,00 %.

6 Diskuze

Střevní mikrobiota představuje složitým ekosystém mikroorganismů, který obývají náš trávicí trakt. Složení této mikrobioty je ovlivněno různými faktory, jako je strava, životní styl, užívání léků nebo genetika (Maukonen & Saarela 2015). Změny v jejím složení vedou k různým onemocněním včetně střevních zánětů, syndromu dráždivého tračníku nebo dokonce metabolických poruch (Milani et al., 2017). Manipulace střevní mikrobiotou pomocí probiotických bakterií nabízí široký potenciál pro bezpečnou a účinnou léčebnou metodou (Das et al., 2022). Probiotické bakterie nabízí široké možnosti v oblasti obnovy rovnováhy střevní mikrobioty, která může být narušena různými faktory, včetně užívání antibiotik nebo nevhodné stravy. Probiotika mohou nejen pomoci obnovit rovnováhu mikroorganismů, ale také podporují trávení, zlepšují imunitní funkci a chrání hostitele před škodlivými patogeny (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Střevní mikrobiota je velmi složitý ekosystém, který se u každého člověka liší. Tato rozmanitost činí studium jednotlivých bakterií a jejich vliv na fyziologické funkce a nemoci obtížnými. Proto se v laboratořích vytváří definovaná minimální mikrobiota, která obsahuje omezený počet známých mikroorganismů. Tyto mikroby spolu interagují a simulují střevní mikrobiotu (Vázquez-Castellanos et al., 2019). Vícekmenová definovaná mikrobiota zahrnuje různé druhy bakterií a poskytuje tak komplexnější pohled na střevní mikrobiotu (Kwoji et al., 2021). Tato mikrobiota se skládá z různých druhů mikrobů, kteří společně interagují, tvoří kombinace více druhů a provádějí různorodé biologické procesy. Na rozdíl od tradičního přístupu, který se zaměřuje na zkoumání jednotlivých mikroorganismů a jejich izolovaných účinků, se očekává, že vícekmenová mikrobiota bude mít komplexnější vliv na hostitele (Dominik et al., 2011; Roselli et al., 2017). Definovaná mikrobiota může sloužit jako model pro zkoumání ochranného účinku střevní mikrobioty při infekčních onemocněních trávicího traktu (Elzinga et al., 2019). Tato mikrobiota bývá přenášena na myši, krysy nebo prasata, která jsou gnotobiotická (Brugiroux et al., 2016). Gnotobiotická experimentální zvířata jsou speciálně odchovávaná v sterilním prostředí a lze je osidlovat vybranými mikrobiálními kmeny. Tímto způsobem lze systematicky studovat, jak tato kolonizace ovlivňuje fyziologický vývoj a přispívá k vzniku patologických změn. V mnoha studiích jsou gnotobiotická bezmikrobní zvířata spojována s jednoduchou definovanou mikrobiotou, kterou tvoří jeden nebo více druhů mikrobů (Tlaskalova-Hogenova et al., 2015).

Existují léčebné metody založené na střevní mikrobiotě, včetně transplantace fekální mikrobioty, diety, užívání probiotik, syntézy mikrobioty a využití bioaktivních látek

izolovaných z mikrobioty (Sorbara & Pamer 2022). Bylo zjištěno, že gnotobiotická selata s jednodruhovou, která neobsahují nepatogenní mikroorganismy (Splichalova et al., 2018), ve spojení bifidobakteriemi (Splichalova et al., 2011; Splichalova et al., 2020) a laktobacily (Splichal et al., 2019), mírně snížila symptomy enterokolitidy způsobené bakterií *Salmonella*. Porovnáním účinku tří známých probiotik, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Splichalova et al., 2021), *Lactobacillus rhamnosus* GG (Splichalova et al., 2019) a *Escherichia coli* Nissle 1917 (Splichalova et al., 2011; Splichal et al., 2019), také vedlo ke snížení následné infekce bakterií *Salmonella Typhimurium*. Nicméně ochrana byla významná pouze u *Escherichia coli* Nissle 1917 (Splichal et al., 2019). Je pravděpodobné, že přítomnost různých druhů bakterií v mikrobiotě bude mít složitější dopad na hostitele (Dominici et al., 2011; Roselli et al., 2017). Proto jsou běžné probiotické produkty často kombinací několika druhů nebo kmenů bakterií.

Je všeobecně známo, že spojení gastrointestinálního traktu s mikrobiotou, která je přizpůsobená pro konkrétní druh, je účinnější než mikrobiota složená z různých druhů (McCracken & Lorenzo 2001). Je politováníhodné, že současná komerční probiotika, která jsou využívána k úpravě střevní mikrobioty, vykazují nejednoznačné účinky na hostitele a jejich schopnost kolonizace střeva je omezená. Tyto přídatné látky proto nemusí vykazovat očekávaný zdravotní efekt (Zmora et al., 2018). Je velmi důležité zajistit udržení životaschopnosti produktu během jeho podávání za předepsaných podmínek (Barbar-Vidal et al., 2019).

Experimenty prováděné na hospodářských zvířatech často zahrnují podávání probiotických kmenů a následné monitorování jejich vlivu na výkonnost zvířat (Anadón et al., 2019). Tato práce měla přesně cílený přístup. Náš cíl spočíval v rozvoji specifických probiotických mikroorganismů získaných z prasečích kmenů, které by měly potenciál chránit selata před infekcí *Salmonella Typhimurium*.

V nedávné době byla představena sbírka bakteriálních komenzálů, které byly nalezeny v trávicím traktu prasat. Tato sbírka obsahuje 110 různých druhů z 40 různých čeledí a devíti fylů (Wylenskek et al., 2020). Kolekce ukazuje na přítomnost mnoha taxonomických skupin s unikátními metabolickými funkcemi a potenciálem k využitím jako probiotika pro prasat. Stejně jako výše zmíněný případ, jsme kultivovali různé bakteriální kmeny a zkoumali jejich potenciální probiotické vlastnosti a schopnost ovlivnit bakterii *Salmonella*. V naší studii bylo získáno 284 různých izolátů z tlustého střeva a vzorků výkalů divokých i domácích prasat a selat. Tyto izoláty patřily do 47 různých druhů a byly rozděleny do 11 rodů. Komenzály, které

se jevíly vhodné pro vytvoření DPM (definovaná prasečí mikrobiota) s možným ochranným účinkem proti střevním infekcím, byly vybrány převážně na základě jejich schopnosti potlačit růst kmenů *Salmonella Typhimurium* a jejich schopnosti se úspěšně usadit ve střevě. Během kultivace v laboratorních podmínkách bylo zjištěno, že některé kmeny potenciálně probiotických rodů *Acidiminococcus*, *Eubacterium* a *Mitsuokella* nejsou schopny přežít. To znamená, že další analýzy s těmito izoláty nebyly možné provést. Výsledky prokázaly, že bezbuněčný supernatant, který produkuje téměř polovina testovaných bakterií, včetně kmenů *Lactobacillaceae*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* a *Clostridium*, vykazuje antimikrobiální účinky proti *Salmonelle* LT2 a jejímu mutantu rezistentnímu vůči streptomycinu. Jelikož neutralizovaný supernatant bez buněčné přítomnosti nevykazoval inhibiční účinky na kmeny *Salmonella*, lze předpokládat, že antimikrobiální aktivita je převážně způsobena snížením pH v důsledku produkce organických kyselin (Yamano et al., 2006).

V kombinaci s tvorbou antimikrobiálních látek je odolnost vůči kolonizaci důležitým faktorem v ochraně hostitele (Ducarmon et al., 2019). Bakteriální skupina musí být schopna přilnout ke střevní sliznici a osídlit střeva (Thakur et al., 2019). Kmeny s vysokou schopností přilnutí mohou také hrát úlohu, při osídlování střev enteropatogeny prostřednictvím konkurenčních a vazebných míst na střevním epitelu, což přináší zdravotní výhody. To může být zdůrazněno místním účinkem určitých látek, které jsou vytvářeny probiotickými bakteriemi (Monteagudo-Mera et al., 2019). Některé výzkumy naznačují, že schopnost přilnutí může úzce souviset s vlastností autoagregace (MacKenzie et al., 2010). Naše studie však tuto souvislost zcela nepotvrdila. Některé kmeny s výrazným autoagregačním chováním nebyly schopny přilnout k prasečí buněčné linii. Naopak, některé izoláty, které neměly žádnou schopnost autoagregace, se silně přichytily k epitelu. Schopnost přežití při průchodu horními částmi trávicího traktu hostitele je předpokladem úspěšné kolonizace střeva (Shi et al., 2016). V naší práci mnoho kmenů prokázalo vysokou odolnost vůči nízkému pH a žluči, přičemž jejich životaschopnost klesla o méně než 0,25 log CFU/ml. Podobné výsledky byly zaznamenány v dalších studiích (Feng et al., 2017; Tulumoglu et al., 2013). Kmeny prasečího původu, které jsme testovali, vykazovaly obecně vyšší citlivost na žlučový extrakt než na nízké pH (Vlková et al., 2009).

Probiotika se často podávají v neaktivní podobě například sprejově sušená, zmrazená nebo lyofilizovaná. Všechny tyto možnosti byly také potvrzeny jako vhodné formy pro jejich dlouhodobé uchování a distribuci (Carvalho et al., 2004). Některé studie prokázaly, že způsob konzervace probiotik nemá vliv na jejich schopnost kolonizovat střeva, podobně jako výše

zmíněné studie (Darnaud et al., 2021) jsme požili mrazení jako metodu konzervace pro jeho jednoduchost a schopnost dlouhodobého přežití všech kmenů nově vytvořené směsi DPM.

Existuje mnoho výzkumů, které využívají minimálně definovanou mikrobiotu v modelech s pečlivě kontrolovaným složením mikroorganismu (Brugiroux et al., 2016; Eberl et al., 2020). Často jsou používány pečlivě charakterizované kmeny, ale bez předchozího testování jejich interakce (Darnaud et al., 2021). V naší studii jsme bakterie vybírali na základě jejich funkcí a kladli jsme důraz na jejich vzájemné vztahy. Tento přístup zvyšuje šance na úspěšnost kolonizaci všech bakterií ve skupině.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo seznámit čtenáře o funkci, vývoji a vlivu střevní mikrobioty na zdraví hostitele. Dále přiblížit výskyt a vliv patogenních infekcí se střevní mikrobiotě a to zejména přítomnost bakterie rodu *Salmonella*. V poslední části literární rešerše jsme rozebírali běžně používaná probiotika jejich funkce.

Na základě výsledků provedených in vitro byla vytvořena kombinace komenzálních bakterií s antibakteriální aktivitou proti *Salmonelle*, která může být aplikována na selata. Byly vybrány bakterie, které prokazovaly schopnost přilnout k povrchu epiteliálních buněk, odolnost vůči žluči a kyselinám. Tyto bakterie byly označeny jako neškodné bez přítomnosti patogenních vlastností a rezistence vůči antibiotikům, nevykazovaly negativní interakce mezi sebou a měly pozitivní vlastnosti z hlediska aplikace technologických procesů. Pro ověření ochranného účinku kombinace bakterií v reálném organismu je nezbytné provést experimenty se selaty, která žijí buď ve sterilním prostředí, nebo v běžných podmínkách.

8 Seznam použité literatury

1. AMARA, A. A. a SHIBL, A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. Online. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015, roč. 23, č. 2, s. 107-114. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.001>. [cit. 2023-12-12].
2. ANADÓN, Arturo; ARES, Irma; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, Maria Rosa a MARTÍNEZ, Maria Afanzazu. Prebiotics and Probiotics in Feed and Animal Health. Online. *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*. 2019, s. 261-285. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8_19. [cit. 2024-04-24].
3. ANGELUCCI, Francesco; CECHOVA, Katerina; AMLEROVA, Jana a HORT, Jakub. Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer's disease. Online. *Neuroinflammation*. 2019, roč. 16, č. 1, s. 108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1494-4>. [cit. 2023-12-05].
4. AZIZ, Q.; DORÉ, J.; EMMANUEL, A.; GUARNER, F. a QUIGLEY, E. M. M. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. Online. *Neurogastroenterology & Motility*. 2013, roč. 25, č. 1, s. 4-15. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nmo.12046>. [cit. 2023-11-24].
5. BARBAR-VIDAL, Emili; MARTÍN-ORÚE, Susana M. a CASTILLEJOS, Lorena. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. Online. *Livestock Science*. 2019, roč. 223, s. 84-96. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.02.017> Get rights and content. [cit. 2024-04-24].
6. BELKAID, Yasmine a HAND, Timothy W. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. Online. *Cell*. 2014, roč. 157, č. 1, s. 121-141. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>. [cit. 2023-10-31].
7. BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G. a LANGELLA, Philippe. Use of Traditional and Genetically Modified Probiotics in Human Health: What Does the Future Hold? Online. *Microbiology Spectrum*. 2017, roč. 5, č. 5. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bad-0016-2016>. [cit. 2023-12-14].
8. BRUGIROUX, Sandrine; BEUTLER, Markus; PFANN, Carina; GARZETTI, Debora; RUSCHEWEYH, Hans-Joachim et al. Genome-guided design of a

- defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Online. *Nature Microbiology*. 2016, roč. 2, č. 2, s. 16215. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.215>. [cit. 2024-04-23].
9. BUTS, Jean-Paul a DE KEYSER, Nadine. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with intestinal brush border membranes: key to probiotic effects? Online. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2010, roč. 51, č. 4, s. 532-533. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181e23271>. [cit. 2024-03-04].
 10. CANI, Patrice D. Microbiota and metabolites in metabolic diseases. Online. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019, roč. 15, č. 2, s. 69-70. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0143-9>. [cit. 2024-02-19].
 11. CANI, Patrice D. Microbiota and metabolites in metabolic diseases. Online. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019, roč. 15, č. 2, s. 69-70. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0143-9>. [cit. 2024-04-19].
 12. CARVALHO, Ana S.; SILVA, Joana; HO, Peter; TEIXEIRA, Paula; MALCATA, F. Xavier et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. Online. *International Dairy Journal*. 2004, roč. 14, č. 10, s. 835-8447. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.001>. [cit. 2024-04-24].
 13. CLAEISSON, Marcus J.; JEFFERY, Ian B.; CONDE, Susana; POWER, Susan E.; O'CONNOR, Eibhlís M. et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. Online. *Nature*. 2012, roč. 488, č. 7410, s. 178-184. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature11319>. [cit. 2024-04-22].
 14. CRESCI, Gail A. a BAWDEN, Emmy. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. Online. *Nutrition in Clinical Practice*. 2015, roč. 30, č. 6, s. 734-746. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>. [cit. 2023-12-04].
 15. CRUMP, John A.; SJÖLUND-KARLSSON, Maria; GORDON, Melita A. a PERRY, Christopher M. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. Online. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015,

- roč. 28, č. 4, s. 901-937. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>. [cit. 2024-03-08].
16. DAHIYA, Divakar a NIGAM, Poonam Singh. The Gut Microbiota Influenced by the Intake of Probiotics and Functional Foods with Prebiotics Can Sustain Wellness and Alleviate Certain Ailments like Gut-Inflammation and Colon-Cancer. Online. *Microorganisms*. 2022, roč. 10, č. 3, s. 665. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030665>. [cit. 2023-12-11].
 17. DARNAUD, Marion; DE VADDER, Filipe; BOGEAT, Pascaline; BOUCINHA, Lilia; BULTEAU, Anne-Laure et al. A standardized gnotobiotic mouse model harboring a minimal 15-member mouse gut microbiota recapitulates SOPF/SPF phenotypes. Online. *Nature Communications*. 2021, roč. 12, č. 1, s. 6686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26963-9>. [cit. 2024-04-24].
 18. DAS, Tridip K.; PRADHAN, Shrabani; CHAKRABARTI, Sudipta; MONDAL, Keshab Chandra a GHOSH, Kuntal. Current status of probiotic and related health benefits. Online. *Applied Food Research*. 2022, roč. 2, č. 2, s. 100185. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100185>. [cit. 2024-02-22].
 19. DE CLERCQ, Nicolien C; GROEN, Albert K; ROMIJIN, Johannes A a NIEUWDORP, Max. Gut Microbiota in Obesity and Undernutrition. Online. *Advances in Nutrition*. 2016, roč. 7, č. 6, s. 1080-1089. Dostupné z: <https://doi.org/10.3945/an.116.012914>. [cit. 2024-04-24].
 20. DETHLEFSEN, Les; MCFALL-NGAI, Margaret a RELMAN, David A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. Online. *Nature*. 2007, roč. 449, č. 7164, s. 811-818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature06245>. [cit. 2024-04-20].
 21. DOMINICI, Luca; MORETTI, Massimo; VILLARINI, Milena; VANNINI, Samuele; CENCI, Giovanni et al. IN VIVO ANTIGENOTOXIC PROPERTIES OF A COMMERCIAL PROBIOTIC SUPPLEMENT CONTAINING BIFIDOBACTERIA. Online. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 2011, roč. 6, č. 4. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Samuele-Vannini/publication/272654025_In_vivo_antigenotoxic_properties_of_a_commercial_probiotic_supplement_containing_Bifidobacteria/links/54eae520c

- [f27a6de11528b0/In-vivo-antigenotoxic-properties-of-a-commercial-probiotic-supplement-containing-Bifidobacteria.pdf](https://doi.org/10.1111/1528-8501.12880). [cit. 2024-04-23].
22. DORÉ, Joël, Magnus SIMRÉN, Lisa BUTTLE a Francisco GUARNER. Hot topics in gut microbiota. *United European Gastroenterology Journal* [online]. 2013, 5(1), 311-318 [cit. 2022-12-29]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1177/2050640613502477>
 23. DUCARMON, Q. R.; ZWITTINK, R. D.; HORNUNG, B. V. H.; VAN SCHAIK, W.; YOUNG, V. B. et al. Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection. Online. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2019, roč. 83, č. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-19>. [cit. 2024-04-24].
 24. DWIVEDI, M.; POWALI, S.; RASTOGI, S.; SINGH, A. a GUPTA, D.K. Microbial community in human gut: a therapeutic prospect and implication in health and diseases. Online. *Letters in Applied Microbiology*. 2021, roč. 73, č. 5, s. 553-568. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/lam.13549>. [cit. 2024-04-24].
 25. EBERL, Claudia; RING, Diana; MÜNCH, Philipp C.; BEUTLER, Markus; BASIC, Marijana et al. Reproducible Colonization of Germ-Free Mice With the Oligo-Mouse-Microbiota in Different Animal Facilities. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2020, roč. 10. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02999>. [cit. 2024-04-24].
 26. ELZINGA, Janneke; VAN DER OOST, John; DE VOS, Willem M. a SMIDT, Hauke. The Use of Defined Microbial Communities To Model Host-Microbe Interactions in the Human Gut. Online. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2019, roč. 83, č. 2. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mmbr.00054-18>. [cit. 2024-04-23].
 27. FENG, Yuanyuan; QIAO, Lin; LIU, Rui; YAO, Hongming a GAO, Changbin. Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal mucosa of healthy piglets. Online. *Annals of Microbiology*. 2017, roč. 67, č. 3, s. 239-253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1254-6>. [cit. 2024-04-24].
 28. FU, Xiaomei; LYU, Lin; WANG, Yue; ZHANG, Yan; GUO, Xiaokui et al. Safety assessment and probiotic characteristics of *Enterococcus lactis* JDM1.

- Online. *Microbial Pathogenesis*. 2022, roč. 163, s. 105380. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105380>. [cit. 2023-12-15].
29. GHOSH, Tarini Shankar; SHANAHAN, Fergus a O'TOOLE, Paul W. The gut microbiome as a modulator of healthy ageing. Online. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2022, roč. 19, č. 9, s. 565-584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00605-x>. [cit. 2023-12-05].
30. GOMAA, Eman Zakaria. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. Online. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2020, roč. 113, č. 12, s. 2019-2040. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>. [cit. 2023-12-11].
31. HAJELA, Neerja; RAMAKRISHNA, B. S.; NAIR, G. Balakrish; ABRAHAM, Philip; GOPALAN, Sarath et al. Gut microbiome, gut function, and probiotics: Implications for health. Online. *Indian Journal of Gastroenterology*. 2015, roč. 34, č. 2, s. 93-107. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12664-015-0547-6>. [cit. 2023-11-19].
32. HAJELA, Neerja; RAMAKRISHNA, B.S.; NAIR, G. Balakrish; ABRAHAM, Philip; GOPALAN, Sarath et al. Gut microbiome, gut function, and probiotics: Implications for health. Online. *Indian Journal of Gastroenterology*. 2015, roč. 34, č. 2, s. 93-107. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12664-015-0547-6>. [cit. 2024-04-24].
33. HEINTZ-BUSCHART, Anna a WILMES, Paul. Human Gut Microbiome: Function Matters. Online. *Trends in Microbiology*. 2018, roč. 26, č. 7, s. 563-574. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>. [cit. 2023-11-10].
34. HEMARAJATA, Peera a VERSALOVIC, James. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. Online. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2013, roč. 6, č. 1, s. 39-51. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1756283X12459294>. [cit. 2024-02-23].
35. HERE, Patricia J.; ENGLANDER, Hanna E. a MOK, Wendy W. K. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits bacterial persisters that survive fluoroquinolone treatment. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2022, roč. 132, č. 6, s. 4020-4032. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.15541> [Free PMC article](#). [cit. 2023-12-17].

36. HOFFMAN, Seth A.; SIKORSKI, Michael J. a LEVINE, Myron M. Chronic Salmonella Typhi carriage at sites other than the gallbladder. Online. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2023, roč. 17, č. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011168>. [cit. 2024-03-25].
37. HOU, Kaijian; WU, Zhuo-Xun; CHEN, Xuan-Yu; WANG, Jing-Quan; ZHANG, Dongya et al. Microbiota in health and diseases. Online. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022, roč. 7, č. 1, s. 135 - to. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>. [cit. 2023-11-13].
38. HUGON, Perrine, Jean-Christophe LAGIER, Philippe COLSON, Fadi BITTAR a Didier RAOULT. Repertoire of human gut microbes. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2017, **106**(1), 103–112 [cit. 2022-12-11]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.020>
39. HUGON, Perrine; LEGIER, Jean-Christophe; COLSON, Philippe; BITTAR, Fadi a RAOULT, Didier. Repertoire of human gut microbes. Online. *Microbial Pathogenesis*. 2017, roč. 106, s. 103-112. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.020>. [cit. 2024-04-24].
40. CHEN, Hung-Ming; WANG, Yue; SU, Lin-Hui a CHIU, Cheng-Hsun. Nontyphoid salmonella infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. Online. *Pediatrics & Neonatology*. 2013, roč. 54, č. 3, s. 147-152. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>. [cit. 2023-12-18].
41. IGLESIAS-VÁZQUEZ, Lucía; RIBA, Georgette Van Ginkel; ARIJA, Victoria a CANALS, Josefa. Composition of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. Online. *Nutrients*. 2020, roč. 12, č. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu12030792>. [cit. 2024-04-19].
42. IHEKWEAZU, Faith D. a VERSALOVIC, James. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. Online. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2018, roč. 356, č. 5, s. 413–423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.08.005>. [cit. 2023-10-31].
43. JANDHYALA, Sai Manasa; TALUKDAR, Rupjyoti; SUBRAMANYAM, Chivkula; VUYYURU, Harish; SASIKALA, Mitnala et al. Role of the normal gut microbiota. Online. *World J Gastroenterol*. 2015, roč. 21, č. 29, s. 8787–

8803. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4528021/>. [cit. 2023-09-08].
44. KAŻMIERCZAK-SIEDLECKA, Karolina; RUSZKOWSKI, Jakub; FIC, Mateusz; FOLWARSKI, Marcin a MAKAREWICZ, Wojciech. Saccharomyces boulardii CNCM I-745: A Non-bacterial Microorganism Used as Probiotic Agent in Supporting Treatment of Selected Diseases. Online. *Current Microbiology*. 2020, roč. 77, č. 9, s. 1987-1996. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02053-9>. [cit. 2023-12-17].
 45. KURTZ, Jonathan R.; GOGGINS, J. Alan a MCLACHLAN, Jaames B. Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. Online. *Immunology Letters*. 2017, roč. 190, s. 42-50. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>. [cit. 2023-12-17].
 46. KWOJI, Iliya D.; AIYEGORO, Olayinka A.; OKPEKU, Moses a ADELEKE, Matthew A. Multi-Strain Probiotics: Synergy among Isolates Enhances Biological Activities. Online. *Biology*. 2021, roč. 10, č. 4, s. 322. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology10040322>. [cit. 2024-04-23].
 47. LI, Hui; NI, Junjun a QING, Hong. Gut Microbiota: Critical Controller and Intervention Target in Brain Aging and Cognitive Impairment. Online. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2021, roč. 13, č. 6. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.671142>. [cit. 2023-11-06].
 48. MACKENZIE, Donald A.; JEFFERS, Faye; PARKER, Mary L.; VIBERT-VALLET, Amandine; BONGAERTS, Roy J. et al. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of Lactobacillus reuteri. Online. *Microbiology*. 2010, roč. 156, č. 11, s. 3368-3378. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/mic.0.043265-0>. [cit. 2024-04-24].
 49. MARKOWIAK, Paulina a ŚLIŻEWSKA, Katarzyna. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. Online. *Nutrients*. 2017, roč. 9, č. 9, s. 1021. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu9091021>. [cit. 2023-12-13].
 50. MAUKONEN, Johanna a SAARELA, Maria. Human gut microbiota: does diet matter? Online. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2015, roč. 74, č. 1, s. 23–36. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0029665114000688>. [cit. 2023-11-23].

51. MCCRACKEN, Vance J. a LORENZO, Robin G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. Microreview. Online. *Cellular Microbiology*. 2001, roč. 3, č. 1, s. 1-11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00090.x>. [cit. 2024-04-24].
52. MCFARLAND, Lynne V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. Online. *Clinical Infectious Diseases*. 2015, roč. 60, č. 2, s. 85-90. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/cid/civ054>. [cit. 2023-12-12].
53. MCQUISTON, John R.; FIELDS, Patricia I.; TAUXE, Robert V. a LOGSDON JR., John M. Do Salmonella carry spare tyres? Online. *Trends in Microbiology*. 2008, roč. 16, č. 4, s. 142-148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.009>. [cit. 2024-03-09].
54. MILANI, Christian; DURANTI, Sabrina; BOTTACINI, Francesca; CASEY, Eoghan; TURRONI, Francesca et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. Online. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Roč. 2017, č. 4. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>. [cit. 2023-10-26].
55. MKANGARA, Mwanaisha. Prevention and Control of Human Salmonella enterica Infections: An Implication in Food Safety. Online. *International Journal of Food Science*. 2023, s. 1-26. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2023/8899596>. [cit. 2024-03-19].
56. MONTEAGUDO-MERA, Andrea; RASTALL, Robert A.; GIBSON, Glenn R.; CHARALAMPOPOULOS, Dimitris a CHATZIFRAGKOU, Afroditi. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, roč. 103, č. 16, s. 6463-6472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>. [cit. 2024-04-24].
57. NOVAKOVIC, Marko; ROUT, Amit; KINGSLEY, Thomas; KIRCHOFF, Robert; SINGH, Amteshwar et al. Role of gut microbiota in cardiovascular diseases. Online. *World Journal of Cardiology*. 2020, roč. 12, č. 4, s. 110-122. Dostupné z: <https://www.wjgnet.com/1949-8462/full/v12/i4/110.htm>. [cit. 2024-01-14].

58. ONISZCZUK, Anna; ONISZCZUK, Tomasz; GANCARZ, Marek a SZYMAŃSKA, Jolanta. Role of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics in the Cardiovascular Diseases. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 4, s. 1172. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26041172>. [cit. 2023-12-08].
59. OZEN, M. a DINLEYICI, E. C. The history of probiotics: the untold story. Online. *Beneficial Microbes*. 2015, roč. 6, č. 2, s. 159-165. Dostupné z: <https://doi.org/10.3920/BM2014.0103>. [cit. 2023-12-13].
60. POWER, Susan E., Paul W. O'TOOLE, Catherine STANTON a Gerald F. FITZGERALD. Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*. 2014, **111**(3), 387–402. Dostupné také z: doi:10.1017/S0007114513002560
61. QIN, Junjie, Ruiqiang LI, Jeroen RAES, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* [online]. 2010, **464**(1), 59-65 [cit. 2022-12-29]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1038/nature08821>
62. QUIGLEY, Eamonn M. M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. Online. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2017, roč. 17, č. 12, s. 94-to. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0802-6>. [cit. 2024-01-14].
63. RAHMAN, Shahrose; O'CONNOR, Amber L.; BECKER, Sarah L.; PATEL, Ranish K.; MARTINDALE, Robert G. et al. Gut microbial metabolites and its impact on human health. Online. *Annals of Gastroenterology*. 2023, roč. 36, s. 1-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.20524/aog.2023.0809>. [cit. 2023-11-27].
64. RAMIREZ, Jaime; GUARNER, Francisco; BUSTOS FERNANDEZ, Luis; MARUY, Aldo; SDEPANIAN, Vera Lucia et al. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020, roč. 10, č. 11. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572912>. [cit. 2023-12-06].
65. RÖNNQVIST, M.; VÄLTILÄ, V.; RANTA, J. a TUOMINEN, P. Salmonella risk to consumers via pork is related to the Salmonella prevalence in pig feed. Online. *Food Microbiology*. 2018, roč. 71, s. 93-97. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.017>. [cit. 2024-03-13].
66. ROSELLI, Marianna; PIEPER, Robert; ROGEL-GAILLARD, Claire; DE VRIES, Hugo; BAILEY, Mick et al. Immunomodulating effects of probiotics

- for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. Online. *Animal Feed Science and Technology*. 2017, roč. 233, s. 104-119. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.07.011>. [cit. 2024-04-23].
67. RUAN, Wenly; ENGEVIK, Melinda A.; SPUNKLER, Jennifer K. a VERSALOVIC, James. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. Online. *Digestive Diseases and Sciences*. 2020, roč. 65, č. 3, s. 695-705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06118-4>. [cit. 2024-04-24].
68. SAARELA, M.; LÄHTEENMÄKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S. a MATTILA-SANDHOLM, T. Gut bacteria and health foods—the European perspective. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, roč. 78, č. 1-2, s. 99-117. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00235-0). [cit. 2024-04-24].
69. SANDERS, M. E.; MERENSTEIN, D.; MERRIFIELD, C. A. a HUTKINS, R. Probiotics for human use. Online. *Nutrition Bulletin*. 2018, roč. 43, č. 3, s. 212-225. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>. [cit. 2024-02-22].
70. SANDERS, Mary Ellen. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. Online. *Clinical Infectious Diseases*. 2008, roč. 46, č. 2, s. 58-61. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/523341>. [cit. 2023-12-13].
71. SÁNCHEZ-VARGAS, Flor M.; ABU-EL-HAIJA, Maisam A. a GÓMEZ-DUARTE, Oscar G. Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. Online. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2011, roč. 9, č. 6, s. 263-277. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2011.11.001>. [cit. 2023-12-18].
72. SANKARARAMAN, Senthilkumar; NORIEGA, Kimberly; VELAYUTHAN, Sujithra; SFERRA, Thomas a MARTINDALE, Robert. Gut Microbiome and Its Impact on Obesity and Obesity-Related Disorders. Online. *Current Gastroenterology Reports*. 2023, roč. 25, č. 2, s. 31-44. Dostupné z: <https://doi.org/https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-022-00859-0>. [cit. 2024-01-17].
73. SHI, Lye Huey; KUNASUNDARI, Balakrishnan; KOKILA, Thiagarajah; NOR, Ismaliza Mohd Ismail a OOI SHAO, Yin. Beneficial Properties of

- Probiotics. Online. *Tropical Life Sciences Research*. 2016, roč. 27, č. 2, s. 73-90. Dostupné z: <https://doi.org/10.21315/tlsr2016.27.2.6>. [cit. 2024-04-24].
74. SHI, Na; LI, Na; DUAN, Xinwang a NIU, Haitao. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. Online. *Military Medical Research*. 2017, roč. 4, č. 1, s. 14 - to. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>. [cit. 2023-11-15].
75. SMITH, S. I.; SERIKI, A. a AJAYI, A. Typhoidal and non-typhoidal Salmonella infections in Africa. Online. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016, roč. 35, č. 12, s. 1913-1922. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2760-3>. [cit. 2023-12-17].
76. SORBARA, Matthew T. a PAMER, Eric G. Microbiome-based therapeutics. Online. *Nature Reviews Microbiology*. 2022, roč. 20, č. 6, s. 365-380. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00667-9>. [cit. 2024-04-23].
77. SPLICHAL, Igor; DONOVAN, Sharon M.; JENISTOVA, Vera; SPLICHALOVA, Iva; SALMONOVA, Hana et al. High Mobility Group Box 1 and TLR4 Signaling Pathway in Gnotobiotic Piglets Colonized/Infected with *L. amylovorus*, *L. mucosae*, *E. coli* Nissle 1917 and *S. Typhimurium*. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 24, s. 6294. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20246294>. [cit. 2024-04-23].
78. SPLICHALOVA, A.; JENISTOVA, V.; SPLICHALOVA, Z. a SPLICHAL, I. Colonization of preterm gnotobiotic piglets with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and its interference with *Salmonella Typhimurium*. Online. *Clin Exp Immunol*. 2019, roč. 195, č. 3, s. 381-394. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cei.13236>. [cit. 2024-04-23].
79. SPLICHALOVA, A.; TREBICHAVSKY, I.; RADA, V.; VLKOVA, E.; SONNENBORN, U. et al. Interference of *Bifidobacterium choerinum* or *Escherichia coli* Nissle 1917 with *Salmonella Typhimurium* in gnotobiotic piglets correlates with cytokine patterns in blood and intestine. Online. *Clinical and Experimental Immunology*. 2011, roč. 163, č. 2, s. 242-249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04283.x>. [cit. 2024-04-23].
80. SPLICHALOVA, Alla; DONOVAN, Sharon M.; TLASKALOVA-HOGENOVA, Helena; STRANAK, Zbynek; SPLICHALOVA, Zdislava et al. Monoassociation of Preterm Germ-Free Piglets with *Bifidobacterium animalis* Subsp. *lactis* BB-12 and Its Impact on Infection with *Salmonella Typhimurium*.

- Online. *Biomedicines*. 2021, roč. 9, č. 2, s. 183. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020183>. [cit. 2024-04-23].
81. SPLICHALOVA, Alla; PECHAR, Radko; KILLER, Jiri; SPLICHALOVA, Zdislava; NEUZIL BUNESOVA, Vera et al. Colonization of Germ-Free Piglets with Mucinolytic and Non-Mucinolytic Bifidobacterium boum Strains Isolated from the Intestine of Wild Boar and Their Interference with Salmonella Typhimurium. Online. *Microorganisms*. 2020, roč. 8, č. 12. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122002> [Full text linksCite](#). [cit. 2024-04-23].
82. SPLICHALOVA, Alla; SLAVIKOVA, Vera; SPLICHALOVA, Zdislava a SPLICHAL, Igor. Preterm Life in Sterile Conditions: A Study on Preterm, Germ-Free Piglets. Online. *Frontiers in Immunology*. 2018, roč. 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00220>. [cit. 2024-04-23].
83. THAKUR, Nishchal; NAMITA, Rokana a PANWAR, Harsh. Probiotics: Selection criteria, safety and role in health and disease. Online. *Journal of Innovative Biology*. 2016, roč. 3, č. 1, s. 259-270. Dostupné z: https://scholar.google.cz/scholar?q=Probiotics,+Selection+Criteria,+Safety+and+Role+in+Health+And.+J.+Innov&hl=cs&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar. [cit. 2024-04-24].
84. TLASKALOVA-HOGENOVA, Helena; KVERKA, Miloslav; VERDU, Elena F. a WELLS, Jerry M. Gnotobiology and the Study of Complex Interactions between the Intestinal Microbiota, Probiotics, and the Host. Online. *Mucosal Immunology*. 2015, s. 109-133. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00008-2>. [cit. 2024-04-23].
85. TULUMOGLU, Sener; YUKSEKDAG, Zehra Nur; BEYATLI, Yavuz; SIMSEK, Omer; CINAR, Berat et al. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. Online. *Anaerobe*. 2013, roč. 24, s. 36-42. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.006>. [cit. 2024-04-24].
86. VÁZQUEZ-CASTELLANOS, Jorge F.; BICLOT, Anaïs; VRANCKEN, Gino; HUYS, Geert RB a RAES, Jeroen. Design of synthetic microbial consortia for gut microbiota modulation. Online. *Current Opinion in Pharmacology*. 2019, roč. 49, s. 52-59. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.07.005>. [cit. 2024-04-23].

87. VLKOVÁ, E.; GRMANOVÁ, M.; RADA, V.; HOMUTOVÁ, I. a DUBNÁ, S. Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. Online. *Czech J. Anim. Sci.* 2009, roč. 54, č. 12, s. 552-565. Dostupné z: <https://doi.org/DOI:10.17221/151/2009-CJAS>. [cit. 2024-04-24].
88. WANG, Lidan; YAN, Jing; NIU, Hua; HUANG, Rui a WU, Shuyan. Autophagy and Ubiquitination in Salmonella Infection and the Related Inflammatory Responses. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018, roč. 8, č. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00078>. [cit. 2024-03-11].
89. WEMYSS, Madeleine A. a PEARSON, Jaclyn S. Host Cell Death Responses to Non-typhoidal Salmonella Infection. Online. *Frontiers in Immunology*. 2019, roč. 10. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01758>. [cit. 2024-03-25].
90. WIEËRS, Grégoire; BELKHIR, Leila; ENAUD, Raphaël; LECLERCQ, Sophie; PHILIPPART DE FOY, Jean-Michel et al. How Probiotics Affect the Microbiota. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020, roč. 9, č. 454. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>. [cit. 2024-03-05].
91. WU, Gary D.; CHEN, Jun; HOFFMANN, Christian; BITTINGER, Kyle; CHEN, Ying-Yu et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. Online. *Science*. 2011, roč. 334, č. 6052, s. 105-108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1208344>. [cit. 2024-04-24].
92. WYLENSKEK, David; HITCH, Thomas C. A.; RIEDEL, Thomas; AFRIZAL, Afrizal; KUMAR, Neeraj et al. A collection of bacterial isolates from the pig intestine reveals functional and taxonomic diversity. Online. *Nature Communications*. 2020, roč. 11, č. 1, s. 6389. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19929-w>. [cit. 2024-04-24].
93. YADAV, Manoj Kumar; KUMARI, Indu; SHINGH, Bijender; SHARMA, Krishna Kant a TIWARI, Santosh Kumar. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022, roč. 106, č. 2, s. 505-521. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>. [cit. 2023-12-14].
94. YAMANO, Toshihiko; IINO, Hisakazu; TAKADA, Mamiko; BLUM, Stephanie; ROCHAT, Florence et al. Improvement of the human intestinal

- flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. Online. *British Journal of Nutrition*. 2006, roč. 95, č. 2, s. 303-312. Dostupné z: <https://doi.org/10.1079/bjn20051507>. [cit. 2024-04-24].
95. YAN, Xu; LIU, Xin-Yi; ZHANG, Dian; ZHANG, Yu-Dian; LI, Zi-Hua et al. Construction of a sustainable 3-hydroxybutyrate-producing probiotic *Escherichia coli* for treatment of colitis. Online. *Cellular & Molecular Immunology*. 2021, roč. 18, č. 10, s. 2344-2357. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00760-2>. [cit. 2023-12-17].
 96. YIN, Yuebang a ZHOU, Daoguo. Organoid and Enteroid Modeling of *Salmonella* Infection. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018, roč. 8, č. 4. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00102>. [cit. 2024-03-10].
 97. ZAREEF, Rana; YOUNIS, Nour a MAHFOUZ, Rami. Inflammatory bowel disease: A key role for microbiota? Online. *Meta Gene*. 2020, roč. 25. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2020.100713>. [cit. 2023-11-20].
 98. ZAWISTOWSKA-ROJEK, Anna a TYSKI, Stefan. Are Probiotic Really Safe for Humans? Online. *Polish Journal of Microbiology*. 2018, roč. 67, č. 3, s. 251-258. Dostupné z: <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-044>. [cit. 2023-12-13].
 99. ZHA, Lang; GARRETT, Shari a SUN, Jun. *Salmonella* Infection in Chronic Inflammation and Gastrointestinal Cancer. Online. *Diseases*. 2019, roč. 7, č. 1, s. 28. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diseases7010028>. [cit. 2024-03-23].
 100. ZMORA, Niv; ZILBERMAN-SCHAPIRA, Gili; JOTHAM, Suez; MOR, Uria; DORI-BACHASH, Mally et al. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. Online. *Cell*. 2018, roč. 174, č. 6, s. 1388-1405.e21. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041>. [cit. 2024-04-24].

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

GIT – gastrointestinální trakt
CFU – Colony Forming Units (Jednotka tvořící kolonie)
IBD – střevní zánětlivé onemocnění
SCFA – mastné kyseliny s krátkým řetězcem
IgA – Imunoglobulin A
GALT – střevní lymfatická tkáň
HMO – oligosacharidy lidského mléka
LAB – laktobacily
BMK – bakterie mléčného kvašení
IBS – syndrom dráždivého tračníku
CVD – kardiovaskulární onemocnění
WHO – Světová zdravotnická organizace
FAO – Organizace pro výživu a zemědělství
EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin
IL – Interleukin
EcN – *Escherichia coli* Nissle
SIBO – Syndrom bakteriálního přerůstání
NTS – Netyfoidní salmonela
WSP – Wilkins-Chalgren a sója pepton
TBX – Tryptone-Bile-X-Glucuronate Agar
MRS – De Man-Rogosa-Sharpe bujón
Agg – autoagregace
CP – celkové počty
KTL – kolonii tvořící jednotka
WSP + MUP – Wilkins-Chalgren a sója pepton + Mupirocin
WSP + NORF – Wilkins-Chalgren a sója pepton + Norfloxacin
KOL – koliformní bakterie
CLOS – *Clostridium*
EUCAST – Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivost
DPM – definovaná prasečí mikrobiota

10 Samostatné přílohy

Příloha č. 1: Identifikace a funkční vlastnosti k bakterií izolovaných ze vzorku tlustého střeva prasete a selat a vzorku stolice

Kmen	Identifikace pomocí MALDI-TOF MS	Skóre	Původ	Delta log CFU/ml pokles po inkubaci v				Inhibiční zóny (mm)*					
				pH 3		1.5% žluč		E. coli 055	E. coli 045	S. Typhimurium LT2	S. Typhimurium STM	Agg	Agg%**
				1 h	2 h	2 h	3 h						
1	<i>Acidomanococcus fermentans</i>	1,73	tlusté střevo selátka domácího	0,52	0,58	0,52	0,54	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,95	tlusté střevo selátka domácího	0,75	0,97	0,26	0,44	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,83	tlusté střevo prasete domácího	0,5	36161	0	0,24	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
4	<i>Bacteroides uniformis</i>	2,01	tlusté střevo prasete domácího	0,11	0,14	0,07	0,11	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
5	<i>Bacteroides uniformis</i>	2,23	tlusté střevo selátka domácího	0,11	0,14	0,07	0,11	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
6	<i>Bifidobacterium boum</i>	2,24	tlusté střevo divokých prasat	0,11	0,14	0,11	0,07	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	+	73,79 ± 1,35
7	<i>Bifidobacterium boum</i>	2,15	tlusté střevo selátka domácího	0,11	0,14	0,11	0,07	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	-	netestováno
8	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	2,06	výkaly domácího selátka	0,00	0	0	0,02	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	7,67 ± 0,58	-	netestováno
9	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	2,04	tlusté střevo divokých prasat	0,11	0,13	0,11	0,27	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	7,33 ± 0,58	7,00 ± 0,00	-	netestováno
10	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	2,08	výkaly domácích selat	0,33	45352	24838	36161	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	7,67 ± 0,58	13,33 ± 0,58	+	netestováno
11	<i>Clostridium sporogenes</i>	2,12	tlusté střevo prasete domácího	0,41	23377	12451	24139	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	8,33 ± 0,58	-	netestováno
12	<i>Enterococcus durans</i>	2,20	tlusté střevo prasete domácího	0,89	1,16	2,11	2,89	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
13	<i>Enterococcus faecium</i>	1,89	tlusté střevo divokých prasat	0,25	0,33	0,64	0,99	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	8,67 ± 0,00	-	netestováno
14	<i>Escherichia coli</i>	2,00	tlusté střevo prasete domácího	0,01	0,32	0,05	0,08	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
15	<i>Escherichia coli</i>	2,03	tlusté střevo prasete domácího	0,02	0,06	0,44	16072	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno

16	<i>Escherichia fergusonii</i>	1,86	tlusté střevo selátka domácího	0,96	18994	45505	27760	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
17	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	2,35	tlusté střevo selátka domácího	0,01	0,05	0,11	0,18	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	+	23,70 %
18	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	2,46	tlusté střevo selátka domácího	0,19	0,23	0,45	0,79	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,02	6,00 ± 0,02	+	22,00 %
19	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	2,32	tlusté střevo selátka domácího	0,35	0,36	0,39	0,43	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,03	6,00 ± 0,03		47,94 %
20	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	2,22	tlusté střevo selátka domácího	0,03	0,23	45413	45293	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	10,33 ± 0,58	7,00 ± 0,00	+	41,90 ± 2,05
21	<i>Lactobacillus porci</i>	1,70	tlusté střevo divokých prasat	1,19	1,25	1,11	1,31	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	+	77,13 ± 3,35
22	<i>Ligilactobacillus ruminis</i>	2,00	tlusté střevo divokých prasat	0,69	0,74	13881	25263	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno
23	<i>Ligilactobacillus ruminis</i>	2,01	výkaly prasete domácího	0,26	0,33	0,69	0,95	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	+	78,00 ± 2,95
24	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	2,18	tlusté střevo divokých prasat	0,09	0,1	0,1	0,1	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	8,33 ± 0,58	8,67 ± 0,58	-	netestováno
25	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	2,19	tlusté střevo divokých prasat	0,19	0,23	0,45	0,79	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	8,67 ± 0,58	+	22,10 ± 0,79
26	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	2,06	tlusté střevo divokých prasat	0,57	1,03	1,96	2,85	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	9,67 ± 0,58	8,00 ± 0,00	+	73,83 ± 4,62
27	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	2,36	tlusté střevo divokých prasat	0,00	0	0	0	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	-	netestováno
28	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	2,00	tlusté střevo divokých prasat	0,90	0,94	0,4	0,05	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	7,67 ± 0,00	7,00 ± 0,00	+	73,84 ± 4,62
29	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	2,01	výkaly prasete domácího	0,03	0,13	0,01	0,01	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	-	netestováno
30	<i>Paeniclostridium sordellii</i>	2,23	tlusté střevo selátka domácího	1,15	1,68	2,36	2,98	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	-	netestováno

*citlivost kmenů *Salmonell* na bezbuněčný supernatant kmenů prasčího původu (průměry jsou průměry tří stanovení, průměr jamky = 6,00 mm)

Agg - auto agregace (pozitivní, pokud se vytvořily jasně viditelné částice podobné písku)

A% - % autoagregace