

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Výskyt a význam sporulujících bakterií v mikrobiotě  
kojenců**

**Bakalářská práce**

**Blanka Krausová  
Výživa a potraviny**

**doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Výskyt a význam sporulujících bakterií v mikrobiotě kojenců" jsem vypracoval(a) 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 autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.04.2022

---

## **Poděkování**

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Věře Neuzil Buněšové, Ph. D. za její rady, odbornost, trpělivost a její ochotu pomoci mi při každé nesnazi. Další část poděkování bych chtěla věnovat Eugeniu Ingribelli, MSc za jeho výborné vedení v laboratoři a bezbřehou trpělivost a rovněž Ing. Nikol Modráčkové, Ph.D. za její pomoc a rady při zpracování této bakalářské práce. Mé díky patří zároveň všem členům Katedry mikrobiologie výživy a dietetiky, kteří mi během laboratorní praxe pomáhali. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mému příteli za jeho nekonečnou podporu.

# Výskyt a význam sporulujících bakterií v mikrobiotě kojenců

## Souhrn

Nemalou část střevní mikrobioty člověka tvoří sporulující bakterie, které se pro svou schopnost tvořit stresu odolné endospory snadno šíří v prostředí a mezi populací. V kojeneckém věku dochází ke kolonizaci střevního prostředí sporulujícími bakteriemi, především klostridii, které jsou známé spíše pro svůj negativní vliv na zdraví.

Cílem této práce bylo vytvořit komplexní přehled o výskytu a významu sporulujících bakterií ve střevní mikrobiotě kojence. Praktická část práce byla zaměřena na využití různých kultivačních metod vedoucích k oživení endospor bakterií přítomných ve stolici kojence. Vzorky stolice kojence byly tepelně či chemicky ošetřeny (60 °C, 80 °C, etanol) a anaerobně kultivovány na neselektivních médiích určených pro anaeroby s krokem subkultivace nebo bez. Identifikace izolátů byla provedena pomocí metody MALDI TOF MS.

Vzorky stolice byly od dítěte odebírány v měsíčních intervalech po dobu jeho prvních dvanácti měsíců života. Dítě bylo porozeno vaginálně v řádném termínu, během prvního roku života bylo kojeno mateřským mlékem a částečně dokrmováno kojeneckou stravou a od 4. měsíce byla do jeho jídelníčku zahrnuta rovněž pevná strava. Ve věku šesti měsíců začal kojeneček přicházet do pravidelného kontaktu se psem a také lézt, čímž se dostával do častějšího kontaktu s cizími předměty.

Ve vzorcích stolice odebraných během prvního měsíce života kojence byly identifikovány bakterie druhu *Clostridium butyricum* a *C. perfringens*. Během následujících měsíců docházelo k nárůstu diverzity sporulujících bakterií, kdy do 3. měsíce byly ve stolici identifikovány klostridiální druhy bakterií *C. paraputrificum*, *C. difficile*, *C. tertium* a *C. jeddahense* a od 6. měsíce života kojence byla ve vzorcích detekována bakterie *C. ramosum*. Mezi ostatní sporulující bakterie, které se podařilo identifikovat, se řadily *Enterocloster aldensis*, *Paeniclostridium sordellii*, *Bacillus cereus* či *B. licheniformis*. Díky různým metodám ošetření se podařilo izolovat variabilní druhy klostridií a jiných taxonů. Nicméně jako nejvhodnější postup hodnotíme ošetření etanolem a metodu přímé kultivace. Většinu získaných izolátů lze označit jako patobionty střevní mikrobioty kojence, jejichž přítomnost představuje možné riziko v případě dysbiózy, ale zároveň je jejich prezence důležitá pro formování slizniční imunity a produkci butyrátu.

**Klíčová slova:** kojeneček, klostridie, kultivace, sporulace, butyrát



# Occurrence and importance of spore forming bacteria in the microbiota of infants

## Summary

A large part of human intestinal microbiota is made up of sporulating bacteria, which are easily spread in the environment and among the population due to their ability to form resistant endospore forms. In infancy, the intestinal environment is colonized by sporulating bacteria, especially clostridia, which are rather infamous in terms of their health effects.

The aim of this work was to create a comprehensive overview of the occurrence and importance of sporulating bacteria in the infant gut microbiota. The practical part of the work was focused on the use of various cultivation methods leading to the revitalization of endospores of bacteria present in the stool of an infant. Infant stool samples were heated or chemically treated (60 ° C, 80 ° C, ethanol) and anaerobically cultured on non-selective media for anaerobics with or without a subculture step. Isolates were identified using the MALDI TOF MS method.

Stool samples were taken from the child at monthly intervals for the first twelve months of life. The baby was born vaginally in full time, breastfed and partially fed infant formula during the first year of life, and from the 4th month a solid food was also included in his diet. At the age of six months, the infant began to come into regular contact with a dog and also began to crawl, thus coming into frequent contact with foreign objects.

*C. butyricum* and *C. perfringens* bacteria were identified in samples taken during the first month of the infant's life. During the following months there was an increase in the diversity of sporulating bacteria, when by the 3rd month the clostridial species of *C. paraputrificum*, *C. difficile*, *C. tertium* and *C. jeddahense* were identified in the stool and from the 6th month of the infant's life *C. ramosum* were detected in the samples. Other sporulating bacteria that were identified included *Enterocloster aldensis*, *Paeniclostridium sordellii*, *Bacillus cereus* and *B. licheniformis*. Thanks to various treatment methods, it was possible to isolate variable species of clostridia and other taxa. However, we consider ethanol treatment and direct cultivation to be the most appropriate procedure. Most of the isolates obtained can be classified as patobionts of the infant gut microbiota. While their presence represents a possible risk in case of dysbiosis, it is, on the other hand, important for the formation of mucosal immunity and butyrate production.

**Keywords:** infant, clostridia, cultivation, sporulation, butyrate

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2 Hypotéza a cíl práce</b>	<b>9</b>
2.1 Hypotéza	9
2.2 Cíl práce	10
<b>3 Literární rešerše</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Střevní mikrobiota</b>	<b>11</b>
3.1.1 Charakteristika střevní mikrobioty	11
3.1.2 Složení střevní mikrobioty	12
3.1.3 Střevní mikrobiota kojence	12
<b>3.2 Vývoj střevní mikrobioty kojence</b>	<b>13</b>
3.2.1 Prenatální vývoj kojence	13
3.2.2 Vliv mateřské mikrobioty	14
3.2.3 Gestační věk dítěte	14
3.2.4 Způsob porodu	15
3.2.5 Výživa	15
3.2.5.1 Mateřské mléko	15
3.2.5.2 Kojenecká výživa	17
3.2.5.3 Přejít na pevnou stravu	17
3.2.6 Vlivy vnějšího prostředí	18
<b>3.3 Střevní sporobiota</b>	<b>18</b>
3.3.1 Čeleď <i>Lachnospiraceae</i>	19
3.3.2 Čeleď <i>Bacillaceae</i>	19
3.3.3 Čeleď <i>Clostridiaceae</i>	20
3.3.4 <i>Clostridium</i> spp.	20
3.3.5 Kolonizace <i>Clostridium</i> spp.	21
3.3.6 Pozitivní vliv <i>Clostridium</i> spp. na zdraví	21
3.3.6.1 Přímý vliv na buňky imunitního systému	21
3.3.6.2 Vliv produktů metabolismu	22
3.3.7 Patogenní klostridie	23
3.3.8 Způsoby identifikace sporulujících bakterií	24
<b>4 Metodika</b>	<b>25</b>
4.1 Cíl metodiky	25
4.2 Metodika odběru vzorků a informace o kojenci	25
4.3 Příprava vzorků	25
4.3.1 Tepelné ošetření (60 °C, 80 °C)	26
4.3.2 Chemické ošetření (70% ethanol)	26

4.4	Kultivační média .....	26
4.5	Plotnová kultivační metoda.....	27
4.6	Izolace kolonií.....	27
4.7	Vyhodnocení plotnové kultivační metody .....	28
4.8	Kontrola čistoty a popis morfologie.....	28
4.9	Příprava vzorků pro MALDI TOF MS identifikaci .....	28
4.10	Statistické vyhodnocení.....	29
5	Výsledky .....	30
5.1	Počty detekovaných mikroorganismů v závislosti na metodě ošetření, aplikaci přímé kultivace či subkultivace a použitém médiu.....	30
5.2	Identifikované bakteriální druhy a jejich výskyt ve vzorcích .....	31
5.3	Identifikované druhy bakterií a jejich četnost v závislosti na použité metodě, způsobu kultivace a zvoleném kultivačním médiu .....	33
5.4	Statistické vyhodnocení metod ošetření vzorku .....	34
6	Diskuze .....	36
7	Závěr .....	40
8	Literatura.....	41
9	Samostatné přílohy .....	I

# 1 Úvod

Lidský organismus je kolonizován bilióny mikrobiálních buněk, které přímo i nepřímo ovlivňují jeho fungování, a to v negativním i pozitivním slova smyslu. Střevní mikrobiální komunita přináší při určitém složení, které je pro každého člověka individuální, svému hostiteli nemálo zdravotních benefitů, především skrze své produkty metabolismu či svou schopností konkurovat patogenním mikroorganismům. Nicméně při dysbalanci tohoto ideálního složení mohou mikroorganismy naopak vykazovat negativní vliv na zdraví jedince, což může vyústit až ve vznik řady akutních či chronických onemocnění.

Předpokládá se, že k procesu kolonizace lidského organismu mikroorganismy by mohlo docházet již během prenatalního vývoje jedince, nicméně střízlivější studie usuzují, že tento proces osidlování začíná až během samotného porodu. Kromě způsobu porodu má na vývoj střevní mikrobioty vliv také gestační věk dítěte při narození. Postnatální vývoj střevní mikrobioty je ovlivněn mnoha faktory, mezi které se řadí například způsob výživy kojence, zda je kojen mateřským mlékem či krmen kojeneckou výživou. Složení střevní mikrobioty může být rovněž ovlivněno rodinou a blízkými příbuznými či geografickými faktory.

S postupným vývojem pohybových schopností dítěte a jeho zvyšujícím se zájmem objevovat svět kolem sebe přichází kojenec do přímého kontaktu nejen s novými předměty a prostředím, ale zároveň i s rozmanitým množstvím mikroorganismů, mezi které se rovněž řadí sporulující bakterie. Tento druh bakterií má schopnost vytvářet tzv. endospory, což jsou metabolicky utlumené a vysoce odolné formy umožňující bakteriím přežít nepříznivé životní podmínky. Schopností sporulace disponuje řada bakteriálních druhů napříč mnoha čeleděmi, přičemž významnou část z nich tvoří bakterie druhu *Clostridium* spp.. Někteří zástupci klostridií, především představitelé klostridiálních klastrů XIVa a IV, vykazují pozitivní vliv na zdraví člověka, ať už bezprostředně, tedy drážděním buněk imunitního systému, anebo skrze své produkty metabolismu, především butyrátem. Je však známa i řada patogenních druhů klostridií, jež mají za následek různá závažná onemocnění.

## **2 Hypotéza a cíl práce**

### **2.1 Hypotéza**

Očekáváme, že zdrojem bakterií tvořících endospory, jako jsou klostridie, je hlavně prostředí, ve kterém dítě žije, a výskyt klostridií se bude lišit s ohledem na věk, dietu, zvyky, kontakty a frekvenci odběru vzorků.

## 2.2 Cíl práce

Teoretickým cílem práce bylo vytvořit ucelený přehled o výskytu a významu sporulujících bakterií v mikrobiotě kojenců. Cílem experimentální práce bylo podílet se na projektu zaměřeném na sledování výskytu kultivovatelných klostridií ve vzorcích stolice dítěte odebraných během jeho prvních 12 měsíců života. Výsledky byly analyzovány spolu se záznamy o stravě, kontaktu s domácími zvířaty a pokroku ve vývoji vedoucího ke kontaktu s cizími předměty a materiály v prostředí.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Střevní mikrobiota

#### 3.1.1 Charakteristika střevní mikrobioty

Termín mikrobiota můžeme definovat jako uskupení mikroorganismů žijících v určitém biotopu (Ishiguro et al. 2018). Jedná se o komunity komenzálních mikroorganismů osidlujících především sliznice lidského těla, mezi které se řadí zástupci bakterií, hub, virů, protozoi a archei (Ignacio et al. 2019), jenž koexistují se svým hostitelem v mutualistickém vztahu (Parker et al. 2020). Seznam jejich genů je označován výrazem mikrobiom (Ursell et al. 2012). Odhaduje se, že pouze samostatná doména bakterií převyšuje svým počtem počet buněk člověka jako individua (Mathé et al. 2012). Celkový počet bakteriálních buněk v lidském těle byl odhadnut na  $3,8 \times 10^{13}$ , zatímco předpokládaný počet buněk tělu vlastních je  $3,0 \times 10^{13}$  (Sender et al. 2016).

Mikroorganismy kolonizují téměř všechny povrchy lidského těla, které jsou vystaveny vnějšímu okolí. Okupují nejen naši kůži, močopohlavní a dýchací systém, ale především gastrointestinální trakt (GIT) (Serikov et al. 2010). Osídlení GITu mikroorganismy začíná v dutině ústní, kde se počty bakterií pohybují kolem  $10^8$ - $10^{10}$  KJT/g slin, pokračuje v žaludku, v němž je jejich množství redukováno na  $10^3$  KJT/g žaludečních šťáv, následuje duodenum a jejunum s rozmezím  $10^2$ - $10^4$  KJT/g obsahu a končí v ileu následovaného tlustým střevem, kde počet bakterií vzroste na hodnoty  $10^{10}$ - $10^{12}$  KJT/g obsahu (Hakansson & Molin 2011). Více než 70 % mikroorganismů obývajících lidské tělo se nachází v tlustém střevě (Serikov et al. 2010). Plocha povrchu sliznice tlustého střeva se v průměru odhaduje na  $1,9 \text{ m}^2$ , což z něj činí prostředí s nejvyšší zaznamenanou mikrobiální akumulací (Loo et al. 2020).

Soužití člověka s mikroorganismy vyústilo v tlustém střevě ve vznik vztahů komenzálních (vztah ve kterém ani jeden z partnerů není znevýhodněn) a symbiotických (vztah prospěšný pro oba partnery), které plynou především z jejich metabolických aktivit (Ventura et al. 2009). Mikrobiota hraje zásadní roli ve fungování imunitního systému, rovněž má významný vliv na trávení a metabolismus živin, ovlivňuje komunikační spoj mezi mozkem a střevy jedince a je zásadní pro normální fyziologii a zdraví střev (Aziz et al. 2013). Jedná se převážně o nepatogenní mikroorganismy žijící společně s enterocyty v symbiotickém vztahu, ve kterém převážně vypomáhají s metabolismem živin a léků, zabraňují kolonizaci patogenními mikroorganismy a také podporují správné fungování střevní bariéry (Jandhyala et al. 2015). Na druhou stranu mají mikroorganismy v rámci našich střev zajištěn volný přístup k živinám společně s kontrolovanou teplotou (Ignacio et al. 2019). Střevní homeostáza může být narušena kvantitativními či kvalitativními změnami ve složení mikrobioty, neboli dysbiózou, což může vést k rozvoji rozličných nemocí, jimiž jsou například obezita, diabetes, alergie či onemocnění autoimunitního systému, neurologické poruchy a zánětlivé či infekční choroby (Bibbó et al. 2016; Wang & Roy 2017).

### 3.1.2 Složení střevní mikrobioty

V lidské střevní mikrobiotě převažuje doména bakterie (Chen 2020) v rámci které, je odhadnuto na více než 35000 bakteriálních druhů (Jandhyala et al. 2015). Přes 99 % přítomných bakterií jsou anaerobové, což je v souladu s nízkým obsahem kyslíku ve střevním prostředí. Zástupci střevní mikrobioty se nachází nejen v lumenu, ale rovněž na hlenové vrstvě a epitelárních buňkách střev. Nejvíce informací ohledně složení střevní mikrobioty pochází ze vzorků stolice, které reflektují především složení mikrobiálního společenství lumenu distální části tlustého střeva. K posouzení druhové diverzity bakteriálních společenstev v rámci střeva jako stanoviště se používá alfa diverzita hodnotící druhovou bohatost každého vzorku a beta diverzita udávající rozdíl ve složení mezi odlišnými vzorky (Chen 2020).

Zdravá střevní mikrobiota je převážně tvořena kmenem Firmicutes, Bacteroides, zatímco kmeny Actinobacteria, Proteobacteria a Verrucomicrobia jsou zastoupeny v menším počtu (Flint et al. 2012). Složení střevní mikrobioty se dynamicky mění. Kompozice mikrobiální komunity u sledovaného jedince bude ve dvou rozdílných časových bodech odlišná. Je ovlivňována mnoha endogenními a exogenními faktory mezi které se řadí například způsob porodu, státnutí, geografie a také dietetika. Vzhledem k důležitosti a složitosti střevního ekosystému vzrostl zájem o identifikaci kompozičních vzorců a jejich základních pravidel, ve snaze hlouběji porozumět lidskému zdraví a chorobným stavům, které by mohly být řešeny personalizovanou léčbou prostřednictvím nutričních, mikrobiálních a farmaceutických zásahů (Costea et al. 2018).

V rámci střevní mikrobioty dospělého člověka byly identifikovány tři hlavní enterotypy (Arumugam et al. 2011), které jsou rozlišovány dle relativní četnosti rodů *Bacteroidetes* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2) a *Ruminococcus* (enterotyp 3), jenž bývá spojován s enterotypem 1. Dané klastry vznikají na základě dlouhodobého dodržování specifických dietetických vzorců. Enterotyp 1 je spojován s příjmem živočišných bílkovin, řadou aminokyselin a nasycených tuků, což odpovídá vysokému zastoupení masa v potravě, které je typické pro tzv. západní stravování. Naopak tomu je u enterotypu 2, který je spojován s příjmem rostlinné stavy bohaté na karbohydráty a jednoduché cukry (Wu et al. 2011). Ukazuje se, že enterotypy mají tendenci obnovovat se a vracet se do původního stavu v důsledku vnějšího zásahu, jímž je například změna diety (Fan et al. 2020).

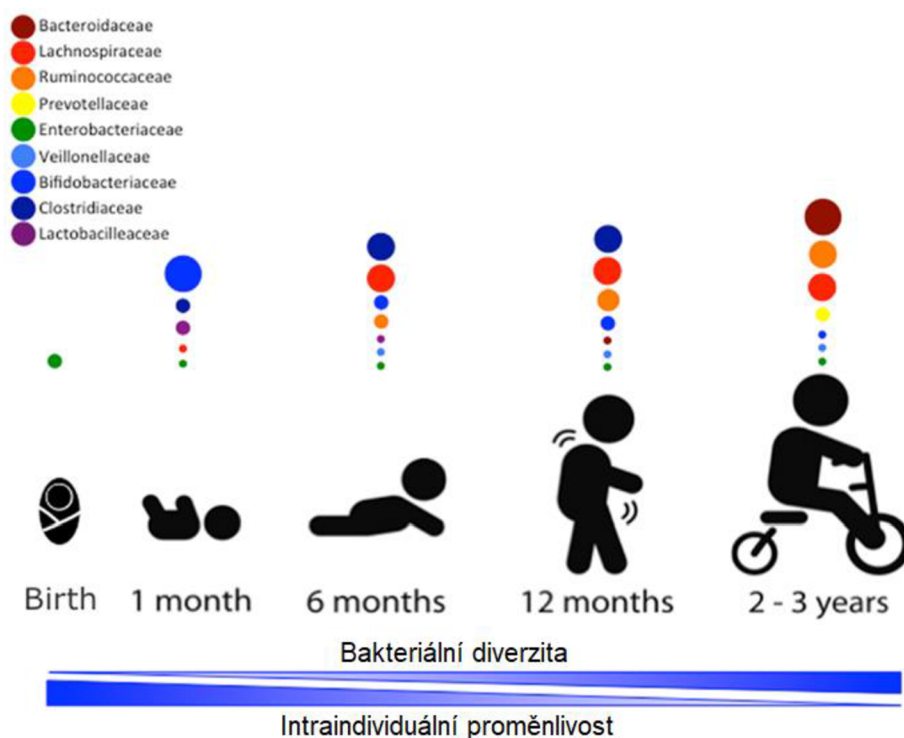
### 3.1.3 Střevní mikrobiota kojence

Definice složení „normální“ či „zdravé“ střevní mikrobioty kojenců je obtížná kvůli její značné nestabilitě, vysoké intraindividuální variabilitě a rovněž z důvodu mnoha faktorů, které vývoj střevní mikrobioty ovlivňují. Jedná se například o způsob porodu, gestační věk při narození, výživa kojence, výživový stav matky během těhotenství, vliv prostředí a genetické predispozice jedince. Nekonečné kombinace těchto faktorů dávají vzniknout unikátním bakteriálním populacím ukrývajících se v prostředí střev každého jedince (Milani et al. 2017).

V prvních měsících života je pro střevní mikrobiotu kojence charakteristická nízká diverzita a značná dominance kmenů *Proteobacteria* a *Actinobacteria* (Rodríguez et al. 2015). Zejména u kojených jedinců dominují bakterie rodu *Bifidobacterium* (Turroni et al. 2012). Během začleňování pevné stravy do jídelníčku kojence, dochází k postupné dominanci bakterií rodů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, které bývají typické pro střevní mikrobiotu dospělého



člověka (Koenig et al. 2011). Podrobný popis vývoje střevní mikrobioty a faktory, které jej ovlivňují, jsou popsány v následujících podkapitolách. Na obrázku č. 1 je přehledně vyzobrazen postupný vývoj střevní mikrobioty člověka od narození až do věku 2-3 let.



Obrázek č. 1 – Vývoj střevní mikrobioty člověka od narození do věku 2-3 let (Arrieta et al. 2014) – pozn.: volně přeloženo z angličtiny.

## 3.2 Vývoj střevní mikrobioty kojence

### 3.2.1 Prenatální vývoj kojence

Tvrzení, že děloha matky představuje za normálních podmínek sterilní prostředí, je dnes již zpochybňováno. Byla zaznamenána přítomnost mikroorganismů v plodové vodě, pupeční šňůře, placentě, mekoniu či plodových obalech u zdravé gravidní ženy. Tyto objevy naznačují, že k prvnímu kontaktu jedince s mikroorganismy by mohlo docházet již v nitroděložním prostředí (Hu et al. 2013). Přítomnost mikroorganismů v amniové dutině je rovněž spojována s patologickými stavy. Jedním z nich je například předčasný odtok plodové vody před termínem porodu (PPROM, preterm premature rupture of membranes), v následku čehož nastává předčasný porod s velmi vysokou pravděpodobností úmrtnosti novorozence. U pacientek s PPRM jsou nejčastěji identifikované bakterie rodu *Sneathia* a druhů *Ureaplasma parvum* a *Ureaplasma urealyticum* (Romero et al. 2015; Tchirikov et al. 2018).

Zásadní roli při prenatální kolonizaci střev by měla hrát plodová voda, která je plodem konstantně polykána, čímž se dostává do jeho trávicího traktu (Yang et al. 2021). Hypotézu potvrzuje zjištění, že mikrobiota mekonie sdílí více společných znaků s mikrobiotou plodové vody než s vaginální či střevní mikrobiotou matky (He et al. 2020). Je nicméně předmětem sporu, zda je plodová voda u nekomplikovaného těhotenství přirozeně sterilní, přičemž

k mikrobiální kolonizaci dochází až po stazích dělohy a prasknutí plodových obalů během porodu (Rehbinder et al. 2018), zda se naopak bakterie přirozeně nachází v plodové vodě a placentě i během těhotenství probíhajícího bez zdravotních komplikací, přičemž kolonizace střev plodu nastává již *in utero* (Collado et al. 2016).

V rámci placentární mikrobioty byla identifikována nízká početnost nepatogenních komenzálních bakterií spadajících do kmenů Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes a Fusobacteria. Byla pozorována podobnost mezi placentárním a orálním mikrobiomem, avšak mechanismus, který by umožňoval bakteriální transport mezi dvěma zmíněnými částmi, nebyl objasněn. Zároveň by při kolonizaci placenty mohl hrát roli specifický přenos střevních mikroorganismů matky, při kterém rovněž dochází k jejich transportu do mléčné žlázy (Aagaard et al. 2014; Collado et al. 2016).

### 3.2.2 Vliv mateřské mikrobioty

Během těhotenství dochází k zásadním změnám ve složení střevní mikrobioty matky, které probíhají především v průběhu třetího trimestru, kdy dochází ke zvýšení početnosti zástupců kmene Proteobacteria a Actinobacteria. Zároveň dochází ke snížení početnosti probiotických bakterií, mezi které se řadí například *Faecalibacterium prausnitzii* produkující butyrát. Výše popsané změny ústí ve vznik metabolického syndromu, se kterým se pojí metabolické změny, jež mají pozitivní vliv na průběh těhotenství a zároveň přispívají ke správnému vývoji plodu (Koren et al. 2012). Složení mateřské střevní mikrobioty je rovněž ovlivňováno metabolickým stavem a hmotností matky, užíváním antibiotik či probiotik, výživou a také fyzickým a psychickým stavem. Uvedené faktory mohou mít rovněž vliv na přenos mikroorganismů matky na dítě (Yang et al. 2021).

### 3.2.3 Gestační věk dítěte

Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organization) definuje předčasný porod jako porod uskutečněný před ukončením 37. týdnem těhotenství (Walani 2020). Předčasně narozené děti mají nevyzrálé střevo s nevyvinutou peristaltikou, bariérovou funkcí a imunitou, čímž se stává náchylnější k potencionálním infekcím a zánětům. Novorozenci často podstupují léčbu antibiotiky a zůstávají delší dobu hospitalizováni na nemocniční jednotce. Zároveň bylo u předčasně narozených dětí pozorováno rozdílné složení střevní mikrobioty a její nižší diverzita do věku 4 let než u dětí narozených v řádném termínu (Fouhy et al. 2019).

Předčasně narození kojenci prokazovali nižší zastoupení rodů *Bacteriodes* a *Bifidobacterium*, které jsou typické pro děti narozené bez komplikací v řádném termínu, u nichž není potřeba hospitalizace. Střevní mikrobiota u předčasně narozených dětí prochází několika fázemi vývoje, jež začínají dominancí rodu *Staphylococcus* a pokračují dominancemi rodů *Enterococcus*, *Enterobacter* a konečně *Bifidobacterium*. Fáze, při které dochází k přemnožení *Enterococcus* spp. a která vede k narušení vývoje střevní mikrobioty, se vyskytuje pouze u extrémně předčasně narozených dětí (gestační věk 28 týdnů a méně). Zdravý vývoj mikrobioty může být podporován podáváním mateřského mléka u středně předčasně narozených jedinců (gestační věk 32 až 34 týdnů) či suplementací prebiotik s bifidogenním účinkem u extrémně předčasně narozených jedinců (Fouhy et al. 2019; Korpela et al. 2018; Walani 2020).

Gestační věk při narození vykazuje vliv na modulaci střevní mikrobioty až do čtyř let věku dítěte. U dětí narozených v řádném termínu je charakteristická převaha *Bacteroidetes* v prvním, *Parabacteroides* ve druhém a *Christensenellacea* ve čtvrtém roce. Pro děti předčasně narozené je naopak typická dominance rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Carnobacterium* ve stejném pořadí roků (Fouhy et al. 2019).

### 3.2.4 Způsob porodu

Během porodu i bezprostředně po něm dochází ke kolonizaci GITu novorozence mikroorganismy pocházejícími přímo od matky či z okolí, kterým je obklopuván. Počáteční proces kolonizace střev je silně ovlivněn způsobem porodu (Munyaka et al. 2014). V případě Císařského řezu není novorozenec přímo vystaven fekální a poševní mikrobiotě matky, jak je tomu v případě vaginálního porodu, ale přichází do kontaktu s mikroorganismy kůže matky, nemocničního prostředí a personálu (Milani et al. 2017). V případě zákroku Císařského řezu se mezi prvotní kolonizátory střevního prostředí novorozence řadí bakterie rodu *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, a *Propionibacterium*, které jsou přirozenou součástí kožní mikrobioty člověka. Rovněž byla u těchto jedinců pozorována nižší bakteriální diverzita do dvou let věku a zároveň méně častá kolonizace zástupci kmene *Bacteroidetes*. Oproti tomu u dětí narozených vaginálně převládají zpočátku bakterie, jež jsou typické pro poševní mikrobiotu matky, přičemž převážně dominují rody *Lactobacillus* či *Prevotella* (Dominguez-Bello et al. 2010; Jakobsson et al. 2014).

Způsob porodu, jak vyplývá z předešlého odstavce, může mít vliv na proces kolonizace střevní mikrobioty v raném období života a následném vzniku dysbiózy. Dlouhotrvající stav dysbiózy může vyústit v řadu metabolických onemocnění či onemocnění imunitního systému, mezi které se řadí například potravinová alergie, astma, diabetes či obezita (Zhang et al. 2021).

### 3.2.5 Výživa

Mezi složením střevní mikrobioty kojenců kojených mateřským mlékem a těmi krmenými umělou kojeneckou výživou panují značné rozdíly. Kojení jedinci prokazují v rámci střevní mikrobioty nízkou druhovou diverzitu a vysokou nestabilitu během prvního roku života. Zároveň vykazují výrazně vyšší relativní početnost bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení včetně laktobacilů a *Enterococcus spp.* oproti jedincům přijímajícím výhradně kojeneckou formuli, u kterých byla pozorována vyšší početnost čeledě *Bacteroidaceae* (Bergstöröm et al. 2014; Lemaire et al. 2018).

#### 3.2.5.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko je komplexní tekutina obsahující řadu bioaktivních složek včetně imunoglobulinů, mastných kyselin, hormonů a cytokinů, která kromě kompletní výživy kojence zajišťuje rovněž vývoj a růst jeho trávicího a imunitního systému. Příjem mateřského mléka kojencem jako výhradní stravy je standardní do 6 měsíců věku, s možností pokračovat v kojení do doby stáří 1 roku až 2 let či déle (Ballard & Morrow 2013).

Jedná se současně o přirozené prebiotikum a probiotikum díky svému obsahu oligosacharidů a prospěšných bakterií. Modulace kojenecké střevní mikrobioty mateřským

mlékem probíhá nepřímo skrze podporu růstu specifických bakterií probiotiky a zároveň také přímo vertikálním přenosem, jenž zajišťuje přítomnost klíčových bakterií (Kim et al. 2019). Složení mateřského mléka se liší dle stádia laktace a dle gestačního věku dítěte při narození (Smilowitz et al. 2014).

Důležitou a významně zastoupenou bioaktivní složkou mateřského mléka jsou oligosacharidy. Jedná se o komplex rozpustných glykanů s vysokou strukturální diverzitou, která je určena genetikou matky. Oligosacharidy, které jsou pro kojence nestravitelné, přechází do tlustého střeva, kde slouží jako zdroj uhlíku pro bakterie střevní mikrobioty, přispívají k rozvoji imunitního systému a zlepšují funkci střevní bariéry (Smilowitz et al. 2014).

Oligosacharidy mateřského mléka (HMO, human milk oligosacharid) podporují růst především některých specifických zástupců kmene *Bacteroidetes* a rodu *Bifidobacterium*, především však druhu *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (Donovan & Comstock 2016). Produktem metabolismu HMO *Bifidobacterium infantilis* jsou krátké mastné kyseliny (SCFA, short chain fatty acids), kdy se jedná především o acetát, který hraje důležitou roli ve vývoji imunitního systému a ovlivňuje protizánětlivé děje. Zároveň slouží jako zdroj uhlíku pro bakterie produkující butyrát, jenž kolonocyty preferují jako zdroj energie (Chichlowski et al. 2020) a společně s ostatními produkty fermentace snižuje pH ve střevech kojenců (Henrick et al. 2018).

HMO zároveň působí preventivně proti bakteriálním infekcím díky své funkci tzv. „návnadových receptorů“, kdy je struktura glykanů mateřského mléka shodná se strukturou receptorů buněk střevního epitelu, v následku čehož se na ně vážou patogeny namísto jejich adheze na povrch sliznice. Zároveň mohou glykany působit vůči patogenům konkurenčně svým navázáním na receptory buněk namísto nich (Morrow et al. 2005; Smilowitz et al. 2014).

Mikrobiota mateřského mléka zahrnuje rozmanitou škálu bakteriálních druhů, které svou koncentrací odpovídají přibližně 1000 KTJ/ml. Jedná se o další významný zdroj bakteriální kontaminace, které je novorozenec po porodu vystaven a která přímo přispívá k vytvoření jeho střevní mikrobioty (Le Doare et al. 2018). Dominantní bakterie kultivované z lidského mléka se řadí především mezi rody *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium*. Bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení jsou zastoupeny v menší míře. Původ mikrobioty mateřského mléka je stále předmětem zkoumání a debat. V potaz je brána možnost enteromamární cesty, kdy dochází k migraci střevních bakterií matky za pomoci mononukleárních buněk do její mléčné žlázy během pozdního těhotenství a laktace (Fernández & Rodríguez 2020).

Velká část střevní mikrobioty kojence nachází v prvním roce života původ právě v mikrobiotě mateřského mléka matky. Bylo zjištěno, že kompozice střevní mikrobioty kojence se více podobá mléčné a kožní mikrobiotě matky oproti mikrobiotě patřící nepříbuzné ženě. Množství sdílených mikroorganismů se zvyšuje s rostoucí frekvencí příjmu mateřského mléka a s velikostí jeho dávky. Bakterie, jež jsou nejčastěji shodně izolované z mateřského mléka a stolice kojence, se řadí mezi rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Staphylococcus* (Wang et al. 2020). Mikroorganismy mateřského mléka rovněž ovlivňují ostatní střevní bakterie, neboť se účastní procesu boje o živiny a o vazebná místa na střevní sliznici. Zároveň mohou mít přímý inhibiční vliv či mohou přispívat do trofických řetězců. Těmito vztahy mléčná mikrobiota nepřímo přispívá k utváření kojenecké střevní mikrobioty (Boudry et al. 2021).

### 3.2.5.2 Kojenecká výživa

V případě, že výživa kojence mateřským mlékem není ze zdravotních či jiných důvodů možná, stává se kojenecká formula základní složkou stravy novorozence. Můžeme se setkat s kojeneckou výživou odvozenou od kravského či kozího mléka, případně se sójovou variantou a dalšími speciálními formulami (např. hypoalergenní), které obsahují všechny důležité živinové složky potřebné ke správnému vývoji kojence (Lyons et al. 2020).

Z důvodu příznivých zdravotních účinků, které jsou přisuzovány HMO (viz podkapitola Prebiotický vliv mateřského mléka), jsou kojenecké formule obohacovány galaktooligosacharidy (GOSs, galactooligosaccharides), fruktooligosacharidy (FOSs, fructooligosaccharides), polydextrózou, laktulózou a rovněž inzulinem, jemuž je přikládán bifidogenní účinek. Tyto složky mohou svým působením na střevní mikrobiotu zastupovat prebiotika obsažená v mateřském mléce (Wiciński et al. 2020). Neexistuje však garance zdravotního benefitu z užívání kojenecké formuly obohacené o jakékoliv oligosacharidy udělená Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA, The European Food Safety Authority) (Salminen et al. 2020).

Nejčastěji používanými probiotiky v kojenecké výživě jsou bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které jsou obsaženy buď samostatně nebo v kombinované formě a jež byly izolované z GITu člověka, mateřského mléka nebo mléčných výrobků. Normalizace narušené střevní mikrobioty nebo produkce SCFAs patří mezi široce rozšířené účinky probiotik, nicméně konkrétní změny v mikrobiálním složení jsou závislé na použitém bakteriálním druhu a rovněž na období života, ve kterém jsou kojenci podávána. Účinnost specifických probiotik byla prokázána v případě léčby akutní gastroenteritidy, v prevenci nekrotizující enterokolitidy, při léčbě průjmů souvisejících s léčbou antibiotiky a rovněž u nozokomiálních průjmů u kojenců a dětí (Bertelsen et al. 2016; Lemaire et al. 2018).

Náhradní kojenecká strava obsahující samostatně prebiotika či probiotika sama o sobě plně nenahrazuje komplexní výživu mateřským mlékem, a proto se nabízí možnost kombinace těchto dvou složek v tzv. symbiotikum, kdy dochází k jejich synergickému působení na střevní mikrobiotu. Nicméně Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN, The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) v současnosti nedoporučuje používání kojenecké výživy obsahující symbiotika z důvodu prozatímního nedostatku informací ohledně jejich fyziologických a metabolických účinků na uživatele (Lemaire et al. 2018).

### 3.2.5.3 Přechod na pevnou stravu

Jídelníček kojence by měl být dle doporučení WHO obohacován o pevnou stravu od 6. měsíce života, nicméně mnoho matek ji zahrnuje do stravy dítěte i před dovršením tohoto věku (Rogers & Blissett 2019). Seznámení kojence s potravinami běžného jídelníčku člověka je spojené s významnou populační změnou v rámci střevní mikrobioty, kdy se jedinec dostává do kontaktu s řadou dosud nepoznaných nestravitelných polysacharidů, které po vstupu do tlustého střeva fungují jako nové živinové substráty, jež mohou podporovat přežití a následnou dominanci některých bakteriálních druhů, které neprosplývaly z dříve přijímaných karbohydrátů mateřského mléka či kojenecké výživy (Fallani et al. 2011). Dochází k nárůstu populace kmene

Bacteroidetes, jehož zástupci dokážou rozkládat rostlinné polysacharidy a svou metabolickou aktivitou přímo či nepřímo zvyšovat produkci SCFAs ve střevech. Zároveň dochází k obohacení genů spojených s užitím karbohydrátů, biosyntézou vitamínů a degradací xenobiotik (Koenig et al. 2011). Vybraní zástupci kmenů Firmicutes a *Actinobacteria* vlastní některé geny umožňující snáze se vyrovnat s přechodem na stravu obsahující nestravitelné rostlinné polysacharidy (Matamoros et al. 2013). Zároveň dochází v rámci střevní mikrobioty novorozence k obohacení bakteriálních druhů produkujících butyrát, jimiž jsou například *Clostridium leptum*, *Eubacterium halli* a *Roseburia* spp., které jsou z velké části zodpovědné za užití vlákniny a rezistentního škrobu (Voreades et al. 2014).

### 3.2.6 Vlivy vnějšího prostředí

Mezi popsání vnější faktory ovlivňující mikrobiální kolonizaci střev kojence se řadí rodina a blízcí příbuzní, zejména však přítomnost či absence sourozenců. Byl zaznamenán vyšší poměr bifidobakterií u dětí majících sourozence oproti dětem jedináčkům (Penders et al. 2006). Zároveň byla pozorována pozitivní korelace mezi počtem starších sourozenců a bakteriální diverzitou střevní mikrobioty kojence (Laursen et al. 2015).

Geografická poloha může rovněž vykazovat vliv na utváření rané střevní mikrobioty člověka, především z důvodů rozdílných stravovacích zvyklostí, odlišného způsobu života a variabilních kulturních a náboženských zvyklostí charakteristických pro dané oblasti (Milani et al. 2017). Roli hraje rovněž rozvinutost dané země či regionu, kdy pro populaci chudých oblastí je typičtější strava složená z lokálně vyprodukovaných potravin a plodin s vyšším obsahem vlákniny, přičemž tato strava bývá podávána kojencům současně s mateřským mlékem již v brzkém věku. Chudé státy se zároveň potýkají s problémem malnutrice u většiny obyvatel. Pro rozvinuté státy, ve kterých lidé netrpí nedostatečným příjmem potravy, je naopak charakteristický častý výskyt zánětlivých onemocnění u kojenců. U kojenců pocházejících z těchto dvou rozdílných světů byl vyzorován rozdíl ve složení střevní mikrobioty, kdy u dětí z jihovýchodní Afriky byl zaznamenán vyšší poměr rodu *Bifidobacterium*, zatímco u dětí původem ze severní Evropy byl tento poměr nižší. Zároveň byla u těchto kojenců detekována přítomnost bakterií druhu *Bifidobacterium adolescentis*, *Clostridium perfringens* a *Staphylococcus aureus*, jejichž přítomnost může reflektovat zvýšené riziko autoimunitních onemocnění (Grześkowiak et al. 2012).

### 3.3 Střevní sporobiota

Bakterie mohou být vystaveny řadě stresorů z vnějšího prostředí, jimiž jsou například extrémní teploty, voda, nedostatek živin, nízké pH, kyslík, antibiotika a UV záření. U vybrané části bakterií dochází vlivem působení nepříznivých podmínek k tvorbě metabolicky utlumených a vysoce odolných forem zvaných endospory, které jim umožňují tyto nehostinné podmínky přežít. Germinace je návrat do vegetativního stádia bakteriální buňky, která je indukována přítomností germinantů v prostředí, jimiž jsou například živiny (Egan et al. 2021). Sporující bakterie se díky své odolnosti snadno šíří v prostředí, kdy dochází k přenosu mezi rozdílnými ekologickými nikami a časté výměně mezi organismy, včetně člověka (Tetz & Tetz 2017).

Bylo zjištěno, že schopností tvořit endospory je vybaveno 50-60 % střevních bakteriálních rodů (Appert et al. 2020), což reprezentuje zhruba 30 % celkové střevní mikrobioty. Schopnost sporulace v rámci lidské střevní mikrobioty byla zjištěna napříč čeleděmi *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* a *Bacillaceae* (Egan et al. 2021).

### 3.3.1 Čeleď *Lachnospiraceae*

Čeleď *Lachnospiraceae* je fylogeneticky a morfologicky heterogenní taxon řadící se do kmene Firmicutes, konkrétně do klostridiální skupiny Cluster XIVa. Členové této čeledě jsou bez výjimky anaerobní, fermentativní a chemoorganotrofní mikroorganismy, které v některých případech rovněž vykazují silnou hydrolytickou aktivitu. Čeleď *Lachnospiraceae*, mezi jejíž hlavní rody detekované v lidském střevě patří *Blautia*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Lachnospira*, *Oribacterium*, *Roseburia* a *L-Ruminococcus* (rod *Ruminococcus* přidělený k této čeledi), je přítomná již u novorozenců a v jejich střevní smolce a jejíž zvyšující se početnost je spojena se stárnutím jedince (Vacca et al. 2020). Schopnost vytvářet endospory je napříč čeledí dána specifickým stanovištěm výskytu bakterie, kdy pouze zástupci spojení s GIT člověka vlastní kompletní sadu genů pro sporulaci (Meehan & Beiko 2014).

Hlavní zdravotní přínos čeledi *Lachnospiraceae* pro člověka spočívá především ve schopnosti některých jejích zástupců fermentovat ve střevě nestrávené karbohydráty za produkce SCFA, především butyrátu, který je důležitým energetickým substrátem a regulátorem zánětlivých reakcí. Mezi bakteriální druhy mající tuto schopnost se řadí *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale*, *Eubacterium jalli* a *Anaerostipes* spp (O Sheridan et al. 2016). Nicméně zvýšená početnost bakterií čeledi *Lachnospiraceae* bývá rovněž spojována s některými patologickými stavy, například s obezitou či diabetem 2. typu (Zeng et al. 2016).

### 3.3.2 Čeleď *Bacillaceae*

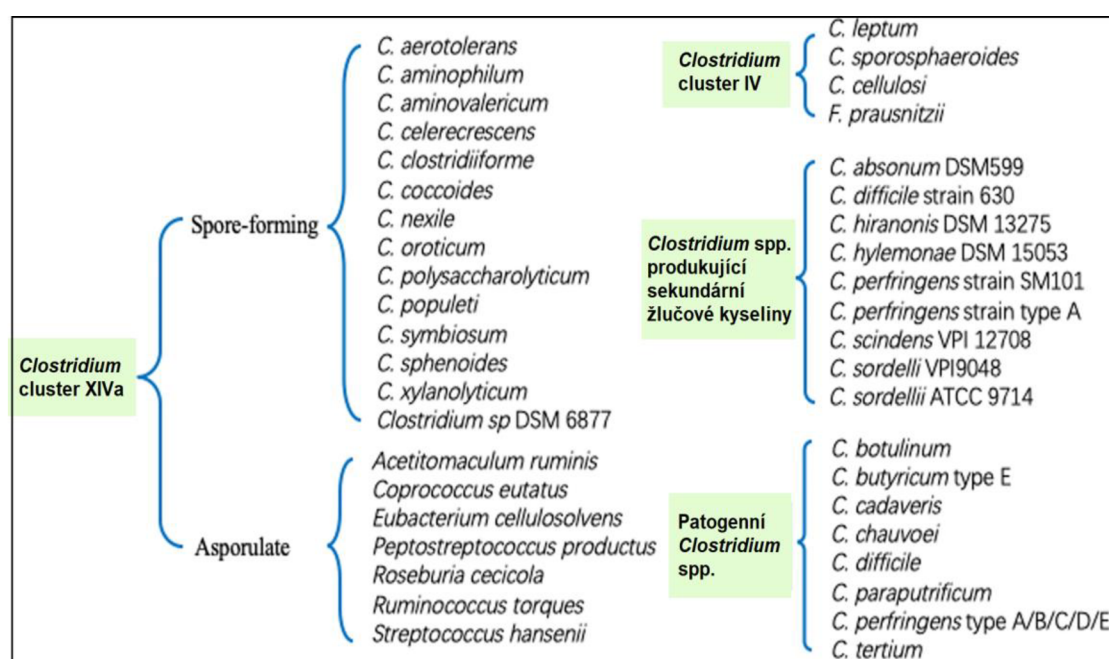
Zástupci čeledi *Bacillaceae* jsou aerobní endosporulující bakterie, jež se nejčastěji nalézají v půdě a jejichž spory mají vysokou schopnost šířit se do okolního prostředí pomocí větru, vody a prachových částic. Přítomnost *Bacillaceae* v GIT člověka a zvířat byla vysvětlována právě jejich značným rozšířením v okolí, ze kterého mohou být jako součást stravy či vody snadno spolknuty. Nicméně bylo zjištěno, že se tyto bakterie mohou adaptovat na život ve střevním prostředí a zároveň jsou schopné navazovat symbiotický vztah se svým hostitelem (Fakhry et al. 2008).

Druhy *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* a *Bacillus licheniformis* jsou zkoumány a využívány jako tzv. probiotické spory, které jsou vysoce odolné vůči nízkému pH žaludečních šťáv a jsou proto vhodné jako doplněk stravy člověka i zvířat. Studie ukázaly, že proces germinace vyvolává reakci imunitního systému, což může být podstata probiotického účinku. Zajímavé bylo rovněž zjištění, že *B. subtilis* podporuje vývoj lymfoidní tkáně asociované se střevem. Spekuluje se však o bezpečnosti tohoto typu probiotik z důvodu možné patogenity některých použitých druhů bakterií (Cutting 2011). Mezi patogenní druhy se řadí například *Bacillus cereus*, který způsobuje alimentární onemocnění u lidí a je spojován se syndromem dráždivého tračníku a některými negastrointestinálními infekcemi (Kotiranta et al. 2000).



### 3.3.3 Čeleď Clostridiaceae

Čeleď *Clostridiaceae* se dle klasifikačního systému řadí pod kmen Firmicutes, třídu *Clostridia* a řád *Clostridiales*, přičemž sama zahrnuje několik rodů včetně rodu *Clostridium*, který se svým počtem bakteriálních druhů řadí mezi jeden z největších. Klostridie jsou tyčinkovité, Gram pozitivní, anaerobní, sporulující bakterie, neschopné disimilační redukce síranu. Na základě uvedených kritérií došlo k zařazení příslušných bakterií do rodu *Clostridium*, avšak díky analýze sekvence genu 16S rRNA byla zavedena sofistikovanější klasifikace taxonu, která uspořádává rod do 19 klastřů, z nichž jsou některé nadále rozděleny do dalších podskupin. Nově se mezi klostridiální skupiny řadí i druhy nesporeující, například *Roseburia cecicola* či *Coprococcus eutatus*. Druhy klostridiálního klastru XIVa a IV patří mezi nejpočetnější bakterie v lidském střevě, kdy zahrnují 10-40 % všech přítomných bakterií (Dürre 2007; Guo et al. 2020). Přehled klastřů XIVa a IV je znázorněn na obrázku č. 2. Druhy *Clostridium* budou v rámci práce nadále rozebírány na základě této nové klasifikace.



Obrázek č. 2 – Přehled bakteriálních druhů řadících se do klostridiálního klastru XIVa a IV. Druhy *Clostridium* produkující sekundární žlučové kyseliny a patogenní druhy *Clostridium* (Guo et al. 2020) – pozn.: volně přeloženo z angličtiny.

### 3.3.4 Clostridium spp.

Jak již bylo řečeno dříve, bakterie druhu *Clostridium*, především z klastřů XIVa a IV, se řadí mezi nejpočetnější mikroorganismy střevní mikrobioty člověka. Klostridie produkují enzymy, díky kterým jsou schopné rozkládat nestrávené polysacharidy a oligosacharidy za produkce SCFAs, jejichž přítomnost je ve střevě důležitá k udržení homeostázy. Část druhů *Clostridium* je schopná produkovat toxiny a být patogenní, nicméně většina klostridií žije se svým hostitelem v komenzálním vztahu. Bakterie *Clostridium* spp. nejsou ve střevě náhodně rozptýleny, nýbrž jsou převážně koncentrovány v oblastech mezi záhyby sliznice vzestupného



tlustého střeva, zatímco lumen střev je početně bohatý na čeledě *Bacteroidaceae*, *Enterococcaceae* a *Lactobacillaceae* (Nagano et al. 2012).

### 3.3.5 Kolonizace *Clostridium* spp.

Klostridie se řadí mezi prvotní bakteriální kolonizátory střeva novorozence, jejich přítomnost ve stolici můžeme detekovat již během prvního týdne života, kdy se jedná především o *Clostridium butyricum*, *Clostridium paraputrificum* a *Clostridium difficile* (Guo et al 2020). Větší množství a častější výskyt jmenovaných druhů, společně s *Clostridium tetrium*, byl pozorován první měsíc po narození u dětí krmených kojeneckou výživou oproti dětem kojeným mateřským mlékem (Tonooka et al. 2005). Kojení jedinci prokazují celkově nižší stupeň kolonizace klostridii v porovnání s těmi krmenými kojeneckou formulou (Albenberg & Wu 2014). Znatelný vliv má rovněž způsob porodu, kdy u dětí narozených pomocí Císařského řezu byl zaznamenán během prvních šesti měsíců zvýšený výskyt *Clostridium g4* a *C. difficile* (Lee et al. 2016). Během prvního týdne života dochází k postupnému vyčerpání kyslíku ve střevech novorozence, což umožňuje osídlení anaerobními bakteriemi, mezi které rovněž patří *Clostridium* spp. (Alipour et al. 2018).

Nicméně není jisté, zda jsou všechny druhy *Clostridium* spp. schopné dlouhodobě kolonizovat prostředí střev. Příkladem může být druh *C. butyricum*, u kterého v rámci výzkumu došlo pouze k vyklíčení a růstu, avšak nikoli k osídlení střev zkoumaného organismu (Guo et al. 2020).

### 3.3.6 Pozitivní vliv *Clostridium* spp. na zdraví

Komenzální druhy klostridií interagují s dalšími mikroorganismy střevního prostředí a poskytují specifické a esenciální funkce, kterými přispívají k udržení střevní homeostázy. Stálost prostředí ovlivňují přímo působením na buňky imunitního systému a nepřímo skrze produkty metabolismu (Guo et al. 2020).

#### 3.3.6.1 Přímý vliv na buňky imunitního systému

Střevní epitelální buňky představují první linii styku mezi hostem a střevní mikrobiotou. Tato jednovrstvá buněčná stěna pokrytá hlenovou vrstvou vykonává důležitou preventivní bariérovou funkci zabraňující adhezi a invazi střevních bakterií a zároveň podporuje koexistenci mezi střevní mikrobiotou a hostem. Fyziologický stav střevních epitelálních buněk, společně s celistvostí a vývojem celé střevní bariéry, se odvíjí od tohoto vztahu. Správně regulovaná odpověď na přítomnost střevních mikroorganismů a jejich metabolitů je důležitým aspektem ve zdraví člověka (Korecka et al. 2013). Intraepitelální lymfocyty a buňky produkující imunoglobulin A hrají v tlustém střevě důležitou roli při utváření odpovídající imunologické odpovědi vyvolané požitými antigeny či patogeny. Klostridie podporují rozvoj těchto buněk skrze produkci SCFAs a sekundárních žlučových kyselin, jejichž hladinu následně zaznamenávají epitelové buňky, které v návaznosti na danou koncentraci zahajují imunologickou signalizaci (Lopetuso et al. 2013).

Regulační T buňky patří mezi nejvýznamnější regulační buňky v lidském těle, které sehrávají roli v udržování střevní homeostázy, kontrole zánětlivých reakcí a zachování

tolerance vůči střevní mikrobiotě. V rámci lidského těla jich je nejvíce zastoupeno ve střevní bariéře, konkrétně ve vrstvě lamina propria. Toto uspořádání naznačuje, že střevní mikrobiota má vliv na jejich akumulaci a funkci. Výzkumy naznačují, že právě bakteriální druhy klostridiálních klastřů XIVa a IV vykazují významný vliv na hromadění T buněk. U pacientů s diagnostikovanou Crohnovou nemocí byl zaznamenán výrazně nižší počet bakterií klostridiálních klastřů XIVa a IV, kde se jednalo především o *F. prausnitzii*. Naopak tomu bylo u experimentálních modelů se zvýšeným množstvím bakteriálních druhů jmenovaných klastřů, u kterých došlo k resistenci vůči alergiím a střevním zánětům (Atarashi et al. 2011; Lopetuso et al. 2013).

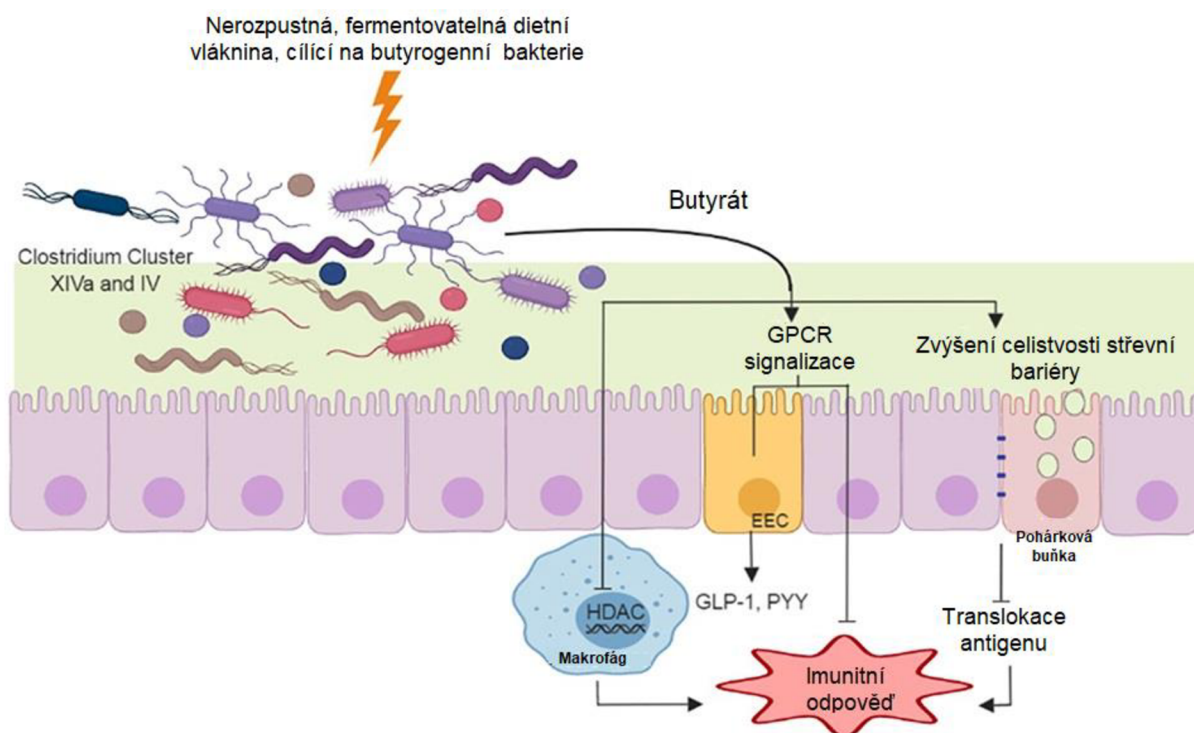
### 3.3.6.2 Vliv produktů metabolismu

Klostridiální druhy jsou chemoorganotrofní bakterie, které v lidském střevě fermentují především nestrávené polysacharidy za produkce SCFAs a dalších látek, ze kterých má většina pozitivní vliv na zdraví střev (Guo et al. 2020). Vyprodukované metabolity slouží jako důležitý zdroj energie pro epitelální buňky, rovněž mají rozmanité regulační schopnosti a vykazují vliv na fyziologii hosta a jeho imunitu. Jedná se především o acetát, propionát a butyrát, který zastává nejvýznamnější funkci (Appert et al. 2020).

Butyrát je hlavním produktem fermentace u mnoha klostridií (Dürre 2014). Většina butyrátu vzniká z karbohydrátů skrze glukózu, po které následuje přeměna acetylu-CoA na butyryl-CoA. Tvorba butyrátu z butyryl-CoA je možná dvěma cestami, které se odlišují zúčastněnými enzymy a vstupními látkami. První cesta potřebuje pro tvorbu butyrátu exogenní acetát a probíhá za účasti enzymu butyryl CoA:acetát CoA-transferázy. Tato cesta je využívána 85 % butyrát produkujícími bakteriemi střevní mikrobioty dospělého člověka, mezi které se řadí například *F. prausnitzii* nebo *Roseburia* spp.. Druhá cesta produkce butyrátu zahrnuje enzymy fosfotransbutyrylázu a butyrát kinázu a je využívána endosporulujícími bakteriemi *Clostridium* sensu stricto, jimiž se myslí například *C. butyricum* a *C. paraputrificum*, a také bakteriemi z čeledě *Peptostreptococcaceae*, zahrnující například *C. difficile* (Appert et al. 2020). Pro prosperitu butyrát produkujících bakterií jsou rovněž důležité ostatní produkty fermentace, zejména již zmíněný acetát, jenž je produkován většinou střevních bakterií, ale také laktát, který je metabolitem probiotických bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení. Oba tyto metabolity mohou být využity jako substrát pro tvorbu butyrátu a podporovat růst butyrát produkující populace (Fu et al 2019).

Bakterie schopné produkovat butyrát jsou rozseté napříč několika klostridiálními klastry, nicméně mezi nejdůležitější se řadí klastř IV, v čele s *F. prausnitzii* a klastř XIVa, zahrnující *Roseburia* spp.. Butyrát je hlavním zdrojem energie pro kolonocyty, který přímo ovlivňuje jejich růst a diferenciaci. Zároveň přispívá k udržení střevní homeostázy, kdy přesný mechanismus akce není zcela objasněn, nicméně má se za to, že butyrát ovlivňuje funkci buněk skrze regulaci exprese genů. Ukázalo se, že zastává důležitou roli při modulaci imunitní a zánětlivé reakce. Mezi nejlépe prostudované protizánětlivé mechanismy se řadí proces, kdy butyrát inhibuje nukleární faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), který kontroluje expresi genů kódujících informaci pro prozánětlivé cytokiny, enzymy indukující zánět, adhezní molekuly, růstové faktory, proteiny teplotního šoku a imunitní receptory. Ochranou funkci střevní bariéry podporuje butyrát stimulací produkce hlenu, jehož vrstva chrání střevní epitel proti střevním

patogenům. Navíc moduluje expresi proteinů těsných spojů, čímž se minimalizuje mezibuněčná propustnost. Podpora funkce střevní bariéry butyrátem je znázorněna na obrázku č. 3. Butyrát má funkci jako antioxidant, redukuje oxidativní stres vyvolaný zánětem tlustého střeva, který může souviset s narušením střevní bariéry nebo může být příznakem rakoviny. Několik studií poukázalo na spojitost mezi prevencí kolorektálního karcinomu a butyrátem, jenž je schopen indukovat buněčnou apoptózu a zastavit buněčný cyklus. Dle posledních výzkumů by se mohl butyrát navíc podílet na snižování nadváhy člověka a zvýšení senzitivity k inzulinu (Fu et al. 2019; Leonel & Alavarez-Leite 2012).



Obrázek č. 3 – Podpora funkce střevní bariéry skrze butyrát produkující bakterie (Cantu-Junges et al. 2019), Použité zkratky: EEC – enteroendokrinní buňka (enteroendocrine cell), GLP-1 – glukagonu podobný peptid-1 (glucagon-like peptide-1), GPCR – receptor sprážený s G proteinem (G protein-coupled with receptor), HDAC – histon deacetyláza (histone deacetylase), PYY – peptid YY (peptide YY) – pozn.: volně přeloženo z angličtiny.

### 3.3.7 Patogenní klostridie

Bakterie druhu *Clostridium* spp. mají bezesporu mnoho pozitivních účinků na zdraví člověka, avšak některé druhy vykazují značnou patogenitu. Jedná se především o *C. difficile*, *C. perfringens* a *Clostridium botulinum* (Guo et al. 2020).

*C. difficile* je celosvětově jedním z nejčastějších původců nozokomiálního průjemového onemocnění. Náchylnost k infekcím způsobených *C. difficile* se zvyšuje hospitalizací, dlouhodobým pobytem ve zdravotním zařízení, ale především užíváním širokospektrálních antibiotik, která narušují složení a fungování střevní mikrobioty, což má za následek snížení schopnosti pacienta bránit se kolonizaci různými patogeny (Kochan et al. 2018). Vegetativní forma *C. difficile* produkuje dva toxiny, toxin A a toxin B. Toxin A působí především na střevní

epitel a způsobuje sekreci tekutin, zánět a nekrózu tkáně, zatímco toxin B účinkuje jako potencionální cytotoxin (Heinlen & Ballard 2010).

*C. perfringens* je bakterie vyskytující se především v půdě v trávicím traktu lidí a zvířat. *C. perfringens* produkuje čtyři druhy toxinů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ) a některé enterotoxiny, na základě jejichž tvorby se *C. perfringens* dělí do pěti skupin (A až E), z nichž nejčastěji se vyskytujícím patogenem u člověka je typ A (Ohtani & Shimizu 2016). U lidí i zvířat způsobuje řadu závažných systémových a střevních chorob, mezi které se řadí plynová gangréna (klostridiální myonekróza), otrava jídlem, průjem a enterokolitida (Kiu & Hall 2018).

*C. botulinum* vytváří vysoce silný neurotoxický jed botulotoxin způsobující onemocnění potravinový, kojenecký a ranný botulismus. Potravinový botulismus je způsoben pozřením již vzniklého toxinu v potravě, čímž se liší od kojeneckého a ranného botulismu, v jejichž případě vzniká toxin *in situ*. Symptomy botulismu jsou především neurologické a můžou vést až k paralýze dýchacího a srdečního svalu (Peck et al. 2011).

Mezi další patogenní druhy klostridií se řadí *C. butyricum*, *C. tetrium* a *C. paraputrificum*, které jsou spojovány se vznikem nekrotizující enterokolitidy u předčasně narozených novorozenců (Guo et al. 2020).

### 3.3.8 Způsoby identifikace sporulujících bakterií

Sporulující bakterie tvoří podstatnou část střevní mikrobioty člověka, avšak studium této části populace je limitováno obtížnou kultivací, mnoha neznámými faktory germinace a složitou extrakcí DNA z endospor. Proto je pravděpodobné, že velká část sporulujících bakterií střevní mikrobioty nebyla dosud identifikována (Avershina et al. 2020). Nové přístupy kultivace „nekultivovatelných“ bakterií střevní mikrobioty člověka byly v minulých letech a doposud stále jsou předmětem zkoumání.

V roce 2016 Brown *et al.* popsali nový pracovní postup, kdy charakterizovali sporulující bakterie ze vzorků stolice odebraných od zdravých dospělých lidí. Vzorky byly podrobeny kultivaci zahrnující ošetření ethanolem s následným přidáním směsi žlučových kyselin (Browne et al. 2016). V roce 2018 navrhl Kearney *et al.* postup bez kultivace, obohacující vzorek lidské stolice o DNA endospor a dalších stresu odolných buněčných forem, které prošly sérií ošetření způsobujících jejich lýzu. Navržený postup umožňuje charakterizaci DNA spor, při kterém dochází k inaktivaci DNA bakterií ve vegetativní fázi a současným zachováním neporušené DNA spor (Kearney et al. 2018). V roce 2020 byla aplikována dle Avershina *et al.* nová metoda charakterizující endospory obsažené ve vzorcích stolice bez potřeby kultivace. Vzorky byly v rámci výzkumu vystaveny dvoustupňovému purifikačnímu procesu, který zahrnoval ošetření ethanolem a ethidium monoazidem, kdy nejprve došlo k zabití vegetativních forem buněk a následné eliminaci jejich DNA ze vzorku (Avershina et al. 2020).

## 4 Metodika

### 4.1 Cíl metodiky

Cílem experimentální části práce bylo provedení kvalitativní analýzy populace sporulujících bakterií ve střevní mikrobiotě kojence. Vzorky stolice byly vystaveny laboratorním metodám vedoucím k potlačení vegetativních forem mikroorganismů pomocí tří různých na sobě nezávislých metod zahrnující ošetření teplotami 60 °C, 80 °C a 70% ethanolem. Takto ošetřené vzorky byly poté zpracovány buď s krokem subkultivace anebo bez. Vlastní kvantifikace a izolace přítomných sporulujících bakterií byla provedena na 2 typech kultivačních medií. K identifikaci izolovaných bakterií byla použita metoda hmotnostní spektrometrie MALDI TOF.

Pro experiment byly použity vzorky stolice odebrané v měsíčních intervalech během prvního roku života od zdravého kojence. Celkem bylo tedy analyzováno 12 vzorků ve 3 variantách, bez a se subkultivací.

### 4.2 Metodika odběru vzorků a informace o kojenci

Čerstvé vzorky stolice (zhruba 1 g) byly sterilně odebírány v pravidelných intervalech matkou dítěte do předem připravených a zvážených zkumavek s médiem obsahující glycerol a skleněné perly (určené pro budoucí homogenizaci). Odebrané vzorky byly ihned zamrazeny. Následná manipulace a transport byly prováděny na ledu. Všechny uvedené analýzy vzorků stolice dítěte byly provedeny s informovaným souhlasem zákonných zástupců dítěte.

Vzorky stolice určené k analýze pocházely od chlapce, který byl porozen vaginálně v termínu, měl normální porodní hmotnost a nevyskytovaly se u něj žádné zdravotní komplikace, krom kolik vyskytujících se v prvních dvou měsících po narození. Chlapec byl do svého 1. roku života částečně kojen a zároveň dokrmován kojeneckým mlékem s následným začleňováním pevné stravy do jídelníčku od 4. měsíce věku. Od 6. měsíce života přicházel pravidelně do kontaktu se psem a začal lézt, v následku čehož přicházel častěji do kontaktu s cizími předměty.

### 4.3 Příprava vzorků

Vzorky stolice byly uchovávány zmrazené (při teplotě -20 °C) v odběrových zkumavkách. Uchovávaný vzorek představoval „1. ředění“, ze kterého bylo pro zamýšlený experiment nutné vytvořit ředící řadu (pro vzorky bez sub kultivace od  $1 \times 10^{-2}$  do  $1 \times 10^{-5}$ , se subkultivací od  $1 \times 10^{-2}$  do  $1 \times 10^{-9}$ ). Před vlastní analýzou byly vzorky rozmrazeny za pokojové teploty. V momentě, kdy byl obsah zkumavek tekutý, byly promíchány pomocí vortexu, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení složek. Injekční stříkačkou bylo odebráno předem kvantifikované množství stolice vypočítané dle vztahu uvedeného níže. Získaným množstvím vzorku bylo inokulováno 2. ředění. Nadcházející ředění byla inokulována vždy 1 ml („1 g“).

Vzorky byly nezávisle na sobě ošetřeny třemi druhy metod. Ošetřené vzorky určené pro subkultivaci byly následně vloženy do termostatu na 37 °C po dobu 24 hodin.

Vzoreček pro výpočet odebraného množství vzorku stolice:

$$m_{vz.} = \frac{1}{m_1 - m_2} (g)$$

Kde platí:

$m_{vz.}$  – odebrané množství vzorku

$m_1$  – hmotnost zkumavky před odběrem vzorku

$m_2$  – hmotnost zkumavky po odběru vzorku

#### 4.3.1 Tepelné ošetření (60 °C, 80 °C)

Vzorky určené pro tepelné ošetření byly zahřáty na danou teplotu ve vodní lázni. Doba tepelného ošetření se odvíjela od stanovené teploty pro danou metodu. Délky ošetření jsou uvedeny v tabulce č. 1.

#### 4.3.2 Chemické ošetření (70% ethanol)

Vzorek homogenizované stolice byl umístěn do 9 ml 70% ethanolu po dobu 4 hodin. Po uplynutí dané doby byl vzorek odstředěn (12000 rpm, 5 minut), ethanol slit a sediment naředěn 9 ml peptonové vody. Následně byl postup odstředění opakován. Vzniklá peleta byla pomocí vortexu ve stejném objemu peptonové vody resuspendována.

Tabulka č. 1 – druh ošetřující metody a doba její aplikace.

Metoda	Čas [min]
60 °C	60
80 °C	20
Ethanol 70 %	240

## 4.4 Kultivační média

Pro kultivaci bakterií byly použity dva druhy kultivačních médií – modifikovaný Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (WSP) a Brain Heart Infusion Agar (BHI). Podle požadovaného objemu bylo vypočteno potřebné množství ingrediencí pro přípravu příslušného agaru. Jednotlivé složky byly odváženy na automatické váze a následně smíchány s požadovaným objemem destilované vody. Přesné složení uvedených kultivačních médií je uvedeno v tabulkách č. 2 a č. 3. Po dostatečném rozvaření všech složek připravené směsi a následné sterilaci v tlakovém hrnci po dobu 50 minut, byla hotová média umístěna do vodní lázně předehřáté na 50 °C. Média byla použita po vyrovnání jejich teploty s teplotou v lázni.

Tabulka č 2. - potřebné ingredience a jejich množství pro přípravu 1000 ml modifikovaného Wilkins-Chalgren Anaerobe agaru (vše Oxoid).

Složení	Wilkins Chalgren	Sójový pepton	L – cystein	Tween
Množství	43 g	5 g	0,5 g	1 ml

Tabulka č 3. - potřebné ingredience a jejich množství pro přípravu 1000 ml Brain Heart Infusion agaru (Oxoid).

Složení	BHI médium/ bujón	Technický agar
Množství	37 g	1,2 g

Uvedené komponenty jsou po promíchání a rozvaření v destilované vodě rozdávkovány do zkumavek pro anaerobní kultivaci „Hungate zkumavek“, které jsou zahřívány v lázni na 100 °C s cílem redukce kyslíku a následně probublávány CO<sub>2</sub>, uzavřeny a sterilovány.

#### 4.5 Plotnová kultivační metoda

Nejprve byly ošetřené vzorky naředěny na požadovanou koncentraci. Použitá ředění pro následnou inokulaci jsou vyznačena v tabulce č. 4. Pro metodu plotnové kultivace byly použity Petriho misky, na jejichž víčko byla poznamenána metoda ošetření vzorku, číslo ředění a typ kultivačního média. Do misek bylo nanášeno pomocí injekční stříkačky 0,5 ml vzorku. Inokulační dávky byly následně zality daným kultivačním médiem do zhruba 1/3 výšky Petriho misky a jemnými krouživými pohyby do obou stran opatrně promíseny. Po ztuhnutí agaru byly Petriho misky vloženy do anaerostatu společně s vyvíječem anaerobní atmosféry (AnaeroGen, Biomérieux) a umístěny do termostatu na 37 °C po dobu 48 hodin.

Tabulka č. 4 – ředění použitá ke kultivaci na vybraných médiích.

Ředění		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
Bez subkultivace	WSP	X	X	X	X				
	BHI	X	X	X	X				
Subkultivace	WSP					X	X	X	X
	BHI					X	X	X	X

#### 4.6 Izolace kolonií

K izolaci jednotlivých kolonií z agarových ploten byly použity jednorázové bakteriologické kličky o objemu 1 µl. Pomocí kličky byly kolonie separovány a přemístěny do uzavíratelné zkumavky s neselektivním kultivačním médiem připravovaným anaerobně. Jednalo se o modifikovaný Wilkins Chalgren bujón. Výběr izolovaných kolonií byl prováděn na základě rozdílných charakteristik. Rozlišována byla například barva, tvar, velikost a rovněž zápach. Izoláty byly umístěny do termostatu na 37 °C po dobu 24 hodin.



## 4.7 Vyhodnocení plotnové kultivační metody

Počet kolonií na jednotlivých plotnách byl stanoven pomocí manuální počítačky kolonií. Výsledný počet kolonií byl vynásoben číslem 2 (plotny byly očkovány 0,5 ml inokula). Celkový počet mikroorganismů v 1 g vzorku byl vypočítán dle následujícího vztahu (viz níže).

Vzoreček pro výpočet KJT/g:

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

Kde platí:

*P1*, *P2* – počet kolonií po dvou sobě jdoucích počitatelných plotnách

*F* – převrácená hodnota nejvyššího ředění

## 4.8 Kontrola čistoty a popis morfologie

Po uplynutí doby kultivace bylo přistoupeno ke kontrole čistoty izolovaných kolonií a k následné přípravě izolátů pro identifikační metodu MALDI TOF. Nejdříve byly připraveny kontrolní vzorky, které byly zkoumány pomocí světelného mikroskopu s metodou fázového rozlišení. Na podložní skličko byla injekční stříkačkou nanášena kapka homogenizovaného izolátu narostlého v bujónu, která byla následně přikryta krycím sklíčkem. U připraveného vzorku byla pozorována morfologie, na jejímž základě byla určena čistota narostlé kolonie. Morfologické rysy mikroorganismů byly následně zaznamenávány a u vybraných izolátů byly rovněž pořízeny fotografie. Vše bylo pozorováno se zvětšením 400x.

## 4.9 Příprava vzorků pro MALDI TOF MS identifikaci

Z izolátů, které byly vyhodnoceny jako čisté, byl pomocí injekční stříkačky odebrán objem 1 ml a přemístěn do 1,5 ml mikrozkušavky typu Eppendorf. Označené mikrozkušavky se vzorky byly odstředěny při 14500 otáčkách po dobu 5 minut. Z odstředěných vzorků byl opatrně slit supernatant tak, aby na dně zůstala peleta, která byla následně rozpuštěna v 500 µl 70 % ethanolu, došlo tak k fixaci vzorku. Vzorky byly znovu odstředěny na stejný počet otáček, po stejnou dobu. Ethanol byl slit a jeho zbytek důkladně odsán pomocí automatické pipety (objem 20-200 µl). Zkušavky s peletami byly ponechány 10 minut otevřené, aby došlo k vytěkání zbytku ethanolu. K peletě bylo přidáno 15 µl 70 % mravenčí kyseliny a 15 µl acetonitrilu (obojí Sigma-Aldrich). Obsah byl důkladně zhomogenizován pomocí automatické pipety a následně byl vzorek odstředěn. Na MALDI destičku (MTP 384, leštěná ocel) bylo nanášeno po 1 µl supernatantu vzorku ve dvou kopiích. Po zaschnutí nanášeného roztoku bylo na všechny zaplněné terčíky přidáno po 1 µl HCCA matrice (Sigma-Aldrich), kterou bylo nutné nechat při pokojové teplotě uschnout. Všechny obsazené pozice na destičce byly zaznamenány do připravené tabulky. Poté byly vzorky změřeny a identifikovány (Bruker Daltonik GmbH).



#### **4.10 Statistické vyhodnocení**

Pro statistické vyhodnocení byl použit STATISTICA software (StatSoft, Prague, Czechia) a Microsoft Office Professional Plus 2016.

## 5 Výsledky

Celkem bylo kultivačně analyzováno 12 vzorků stolice, které byly odebrány přibližně s měsíčním odstupem od 1. měsíce do 12. měsíce narození kojence. První vzorek zařazený k analýze byl odebrán 32. den po narození a poslední byl vzorek odejmut 365. den věku dítěte.

Kultivační analýza byla zaměřena na sporulující bakterie, které byly zastoupeny především druhem *Clostridium* spp..

### 5.1 Počty detekovaných mikroorganismů v závislosti na metodě ošetření, aplikaci přímé kultivace či subkultivace a použitém médiu

Počty mikroorganismů ve vzorku stolice se lišily v závislosti na metodě ošetření, aplikaci přímé kultivace či subkultivace a rovněž použitém druhu média, i když se jednalo o elektivní média. Způsob, jakým byl vzorek ošetřen, neměl na celkový počet mikroorganismů výrazný vliv.

Největší rozdíl v celkovém množství mikroorganismů byl znatelný mezi vzorky s přímou kultivací a subkultivací. U vzorků s přímou kultivací se počty mikroorganismů pohybovaly v průměru kolem  $6,95 \pm 2,83$  log KTJ na g stolice, zatímco u vzorků, kde byla navíc zahrnuta subkultivace, se množství napočítaných mikroorganismů pohybovalo v průměru kolem  $11,28 \pm 4,31$  log KTJ na g stolice.

Celkem u sedmnácti ošetřených vzorků nedošlo během kultivace provedené deskovou metodou k nárůstu kolonií. Ve čtrnácti případech se jednalo o vzorky, u kterých byla aplikována metoda ošetření 80 °C a subkultivace. U vzorků odebraných v 3., 4., 6., 7. a 12. měsíci nebyl bakteriální růst detekován současně na WSP i BHI médiu a u vzorku z 8. měsíce nedošlo k detekci pouze na BHI médiu. Dále se jednalo se o dva vzorky ze 4. a 9. měsíce, jež byly podrobeny subkultivací, ošetření ethanolem a jež byly kultivovány na BHI médiu. V posledních dvou případech nedošlo k nárůstu kolonií u vzorků s přímou kultivací a s metodou ošetření 80 °C. Jednalo se o vzorek odebraný v 8. měsíci, který byl kultivován na WSP a vzorek z 10. měsíce, který byl kultivován na BHI. Detekované počty mikroorganismů prezentované jako log KTJ/g stolice ošetřené výše uvedenými metodami u všech 12 vzorků jsou uvedeny v příloze č. 1, průměrné počty jsou uvedeny níže v tabulce č. 5.

Průměrný počet detekovaných mikroorganismů (log KTJ/g)			
Použité médium		WSP	BHI
Ošetřující metoda a způsob kultivace	60 °C/60 min	6,77±2,98	7,08±1,09
	80 °C/20 min	6,49±2,37	7,49±1,28
	EtOH/240 min	6,85±1,61	7,06±1,92
	SUB 60 °C/60 min	12,13±1,46	11,66±1,47
	SUB 80 °C/20 min	11,22±2,07	11,28±1,72
	SUB EtOH/240 min	10,50±5,84	10,74±3,77

Tabulka č. 5 – Průměrný počet detekovaných mikroorganismů v závislosti na způsobu kultivace, ošetřující metodě a použitém médiu.

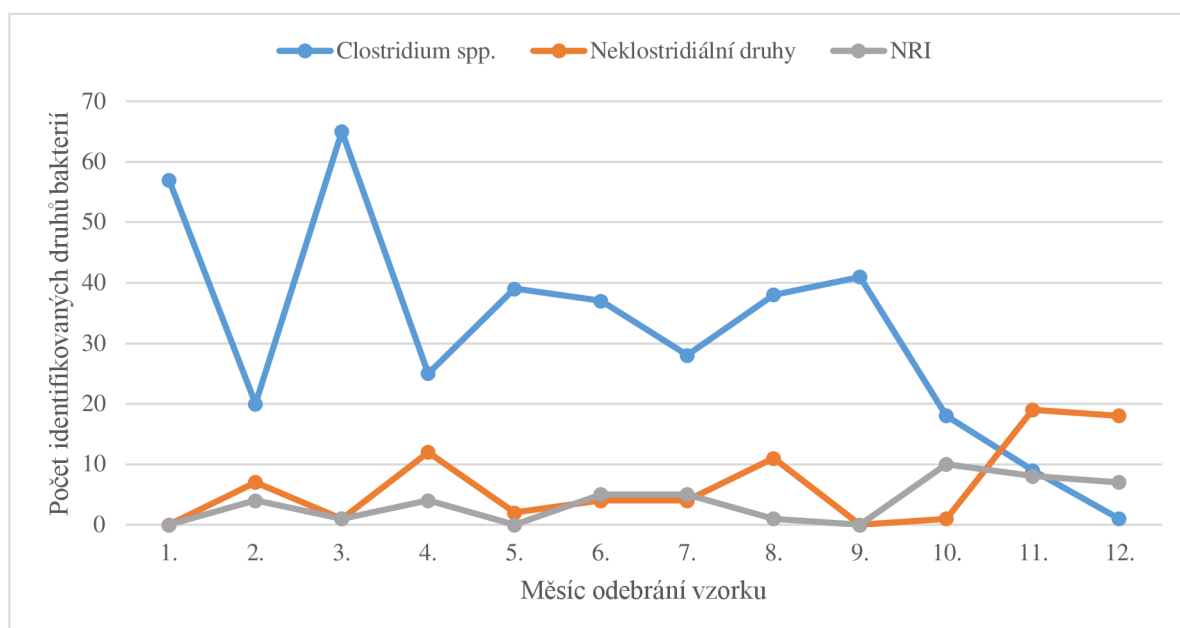
## 5.2 Identifikované bakteriální druhy a jejich výskyt ve vzorcích

Ze vzorků stolice, odebraných od kojence během prvních 12 měsíců života, bylo identifikováno celkem 21 bakteriálních druhů, z čehož bylo 6 druhů zařazeno mezi klostridie. Z celkového počtu 483 izolátů bylo metodou MALDI TOF MS identifikováno jako *Clostridium* spp. dohromady 364 izolátů, dalších 72 izolátů bylo identifikováno jako jiné bakteriální druhy a zbylých 47 izolátů se nepodařilo identifikovat.

Identifikované druhy klostridií společně s četností identifikací zaznamenaných od 1. do 12. měsíce stáří kojence jsou uvedeny v tabulce č. 6. Data v tabulce jsou rozdělena na základě způsobu kultivace z důvodu značných početních rozdílů v množství identifikací mezi přímou kultivací a subkultivací. Následně je na grafu č. 1 znázorněn vývoj v počtu identifikací klostridií, ostatních bakteriálních druhů a neidentifikovatelných bakterií v závislosti na věku dítěte.

	Identifikované druhy klostridií	Věk kojence (měsíce)												Celkem
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
Přímá kultivace	<i>C. butyricum</i>	6	0	0	2	14	1	0	0	0	0	0	0	23
	<i>C. difficile</i>	0	4	7	0	0	0	2	3	0	0	0	0	16
	<i>C. jeddahense</i>	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	<i>C. paraputrificum</i>	0	0	1	1	0	10	17	9	10	0	7	1	56
	<i>C. perfringens</i>	26	19	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	47
	<i>C. ramosum</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	5	0	0	7
	<i>C. tertium</i>	0	2	0	18	0	12	4	0	13	0	0	0	49
Sub-kultivace	<i>C. butyricum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>C. difficile</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>C. jeddahense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>C. paraputrificum</i>	0	0	2	0	0	4	4	5	4	0	0	0	19
	<i>C. perfringens</i>	24	32	0	0	23	0	0	9	13	0	0	0	101
	<i>C. ramosum</i>	0	0	0	0	0	8	0	2	1	13	0	0	24
	<i>C. tertium</i>	0	0	13	3	0	0	1	0	0	0	0	0	17

Tabulka č. 6 – Identifikované druhy klostridií a jejich četnost v závislosti na stáří kojence. Četnost identifikací jednotlivých druhů klostridií je rozdělena na základě typu kultivace.



Graf č. 1 – Počet identifikovaných druhů bakterií v závislosti na měsíci, ve kterém byl vzorek stolice odebrán od dítěte. Bakterie jsou rozlišeny na klostridie, neklostridiální druhy a bakterie, které se nepodařilo identifikovat.

První analyzovaný vzorek stolice se vyznačoval nízkou bakteriální diverzitou, kdy byly identifikovány pouze dva druhy klostridií. Jednou z nich, a zároveň jednou z nejfrekventovaněji identifikovaných klostridií během prvních dvou měsíců života kojence, byla *Clostridium perfringens*. *C. perfringens* byla nadále zaznamenávána i u ostatních analyzovaných vzorků, nicméně v nižších počtech. Druhou identifikovanou bakterií v tomto měsíci byla *Clostridium butyricum*, jejíž přítomnost byla zaznamenávána až do 6. měsíce života kojence.

Zvýšení bakteriální diverzity bylo znatelné již 2. měsíc po porodu, kdy byly identifikovány čtyři klostridiální druhy. Vedle *C. perfringens* byly identifikovány druhy *Clostridium jeddahense*, *Clostridium difficile* a *Clostridium tertium*. Přítomnost *C. tertium* byla ve vyšších počtech zaznamenávána až do 9. měsíce. *C. difficile* bylo možné pozorovat ještě ve vzorcích z 3., 7. a 8. měsíce života kojence. Identifikace *C. jeddahense* se podařila pouze u vzorku z 2. měsíce po narození kojence.

Ze vzorku odebraného v období 3. měsíce života kojence byl prvně identifikován druh *Clostridium paraputrificum*. Tento druh klostridie byl zaznamenán celkem v 9 vzorcích stolice, čímž se stal nejčastěji identifikovanou klostridií v rámci celé analýzy vzorků stolice odebíraných do 12 měsíců po narození kojence. Nejpočetněji byl druh *C. paraputrificum* zastoupen ve vzorcích ze 6. až 9. měsíce života.

Mezi další identifikované klostridie se řadí druh *Clostridium ramosum*, jenž byl identifikován ve vzorku charakterizujícím střevní mikrobiotu 6. měsíce věku dítěte. Přítomnost této bakterie byla rovněž zaznamenána v 8. až 11. měsíci věku.

Od 10. měsíce byl znatelný pokles počtu identifikovaných klostridií a zároveň v této době již nedošlo k identifikaci nových klostridiálních druhů. V 10. měsíci byl zachycen vyšší výskyt *C. ramosum* a v 11. měsíci došlo k identifikaci především bakterie *C. perfringens*, která byla rovněž identifikována ve 12. měsíci, avšak pouze v jediném případě.

Ve vzorcích byly rovněž identifikovány sporulující bakterie, které se neřadí mezi klostridie. Ve vzorku z 5. měsíce byla identifikována bakterie *Paeniclostridium sordellii*, která byla dříve klasifikována jako *Clostridium sordellii*. Dále byly jako sporulující bakterie identifikovány *Bacillus licheniformis*, *Bacillus animalis* a *Coprobacillus cateniformis*.

Mezi nesporulujícími bakteriemi byly identifikovány *Flavonifactor plautii*, *Sphingomonas* sp. společně s dalšími druhy enterokoků, ruminokoků, streptokoků a stafylokoků.

Do 10. měsíce bylo ve vzorcích stolice možné pozorovat značnou převahu v množství identifikací klostridiálních druhů bakterií nad ostatními neklostridiálními druhy, nicméně tento trend se v 11. měsíci změnil, kdy počet identifikovaných klostridií výrazně poklesl, a naopak počet identifikovaných neklostridiálních druhů začal růst. Od 10. měsíce je také znatelný růst v počtu neidentifikovatelných bakteriálních druhů. Popsanou změnu trendů je možné pozorovat na grafu č. 1.

### **5.3 Identifikované druhy bakterií a jejich četnost v závislosti na použité metodě, způsobu kultivace a zvoleném kultivačním médiu**

Nejvyšší četnost identifikací klostridií byla zaznamenána ve vzorcích, které byly ošetřeny metodou využívající 70% ethanol. Z celkových 169 identifikací jich bylo 101 ze vzorků kultivovaných na WSP médiu, z čehož 58 záchyťů spadalo pod vzorky s přímou kultivací. Při této kombinaci bylo identifikováno 6 druhů klostridií z celkových 7 druhů, které se podařilo kultivovat a identifikovat v průběhu celého experimentu. Ošetřující metoda využívající ethanol se zdá být co do počtu a druhové diverzity klostridií úspěšná.

V opačném případě byl nejmenší počet identifikovaných klostridií a zároveň nejmeší počet identifikovaných klostridiálních druhů zaznamenán u vzorků, u nichž byla aplikována subkultivace, byly ošetřeny teplotou 80 °C a následně byly kultivovány na BHI médiu. Tento výsledek vyplývá i ze skutečnosti, že u vzorků, u nichž byla použita tato kombinace metody a kultivačních způsobů, nedošlo až u poloviny případů k detekci nárůstu kolonií. Podobná situace nastala též u vzorků, u nichž bylo použito WSP médium. Daná metoda společně se subkultivací vedla v malém množství k rozpoznání pouhých tří klostridiálních druhů, které však patří v rámci ostatních metod k nejfrekventovaněji identifikovaným bakteriím.

U vzorků, jež byly rovněž ošetřeny metodou využívající teplotu 80 °C, avšak u nich nebyla aplikována subkultivace, byly výsledky odlišné. V kombinaci s BHI médiem se u těchto vzorků podařilo identifikovat všech 7 druhů klostridií včetně *C. jeddahense*, který se u jiné metody ošetření nepodařilo identifikovat. Tento druh byl zaznamenán rovněž na WSP médiu.

V případě metody ošetření teplotou 60 °C byl podobně jako u ostatních metod vidět rozdíl mezi přímou kultivací a subkultivací, kdy u vzorků, u nichž došlo k subkultivaci, byl nižší rozsah diverzity klostridiálních druhů. Naopak tato kombinace metody a kultivace byla přívětivá pro růst neklostridiálních druhů bakterií, jejichž diverzita a početnost zde byla značně zvýšená oproti jiným vzorkům. Jednalo se především o druhy laktobacilů, enterokoků a streptokoků, které mohly ovlivňovat růst klostridiálních druhů. Mezi jednotlivými médii nebyl v tomto případě znatelný rozdíl.

Při pohledu na tabulku č. 7 je znatelný rozdíl v počtu identifikovaných druhů klostridií mezi vzorky, u kterých byla použita buď přímá kultivace nebo subkultivace. U vzorků se

subkultivací nedošlo v žádném případě k identifikaci druhů *C. butyricum*, *C. difficile* a *C. jejjdahense*, a zároveň u nich nebyl identifikován jediný klostridiální druh, který by nebyl zaznamenán u vzorků s přímou kultivací. Vyšší druhová diverzita byla rovněž zaznamenána u ostatních identifikovaných bakterií, kdy u vzorků s přímou kultivací bylo zaznamenáno celkem 11 druhů a u vzorků se subkultivací celkem 7. Ve vzorcích odebraných v 10. až 12. měsíci byl rovněž znatelný rozdíl v množství neidentifikovatelných bakteriálních druhů, který byl výrazně vyšší u vzorků, u nichž byla použita pouze přímá metoda kultivace.

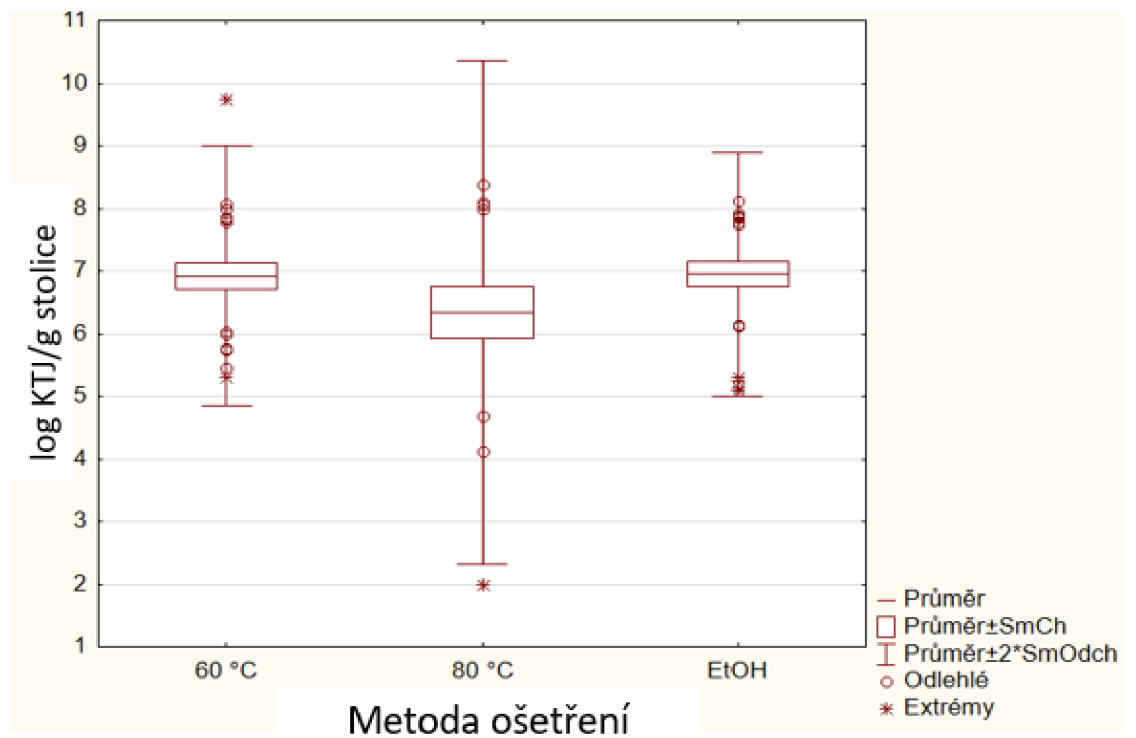
			Identifikované druhy klostridií a jejich početní zastoupení							
Metoda ošetření	Médium	Sub-kultivace	<i>C. butyricum</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. jejjdahense</i>	<i>C. paraputrificum</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. ramosum</i>	<i>C. tetrium</i>	NRI
60 °C	WSP	-	3	2	0	13	7	0	10	3
		SUB	0	0	0	1	16	3	2	10
	BHI	-	6	4	0	10	1	0	3	5
		SUB	0	0	0	0	19	4	3	8
80 °C	WSP	-	2	0	2	0	7	0	14	6
		SUB	0	0	0	5	17	0	0	0
	BHI	-	2	1	3	2	7	2	7	4
		SUB	0	0	0	0	16	0	1	0
EtOH	WSP	-	6	4	0	21	16	3	8	5
		SUB	0	0	0	12	15	10	6	0
	BHI	-	4	5	0	10	9	2	7	2
		SUB	0	0	0	1	18	7	5	4

Tabulka č. 7 – Identifikované druhy klostridií a počty jejich identifikací v závislosti na použité metodě, médiu a subkultivaci.

#### 5.4 Statistické vyhodnocení metod ošetření vzorku

Získané výsledky prezentované v této práci sice zahrnují data kvantitativního charakteru, tedy počty bakterií detekovaných kultivačním stanovením, nicméně z identifikace získaných izolátů je patrná značná variabilita mezi vzorky a metodami ošetření. Navíc při subkultivaci často docházelo k dominantnímu nárůstu jen jednoho taxonu nebo se nejednalo o sporující bakterie. Tudíž byly statisticky hodnoceny pouze počty bakterií (log KTJ/g stolice) detekované metodou přímé kultivace, s cílem porovnat, zda má zvolená metoda ošetření vzorku vliv na detekované počty bakterií. Průměrný počet bakterií detekovaný na WSP a BHI médiu během 12 měsíců života po ošetření 60 °C byl  $6,93 \pm 1,04$ , u 80 °C to bylo  $6,34 \pm 2,01$  a u 70% etanolu  $6,95 \pm 0,97$  log KTJ/g stolice. Normalita dat byla hodnocena Shapiro-Wilk W testem ( $\alpha = 0,05$ ) a rozdíly mezi bakteriálními počty v rámci různého ošetření pomocí Kruskal-Wallis testu ( $\alpha = 0,05$ ). Uvedené vyhodnocení ukázalo, že získaná data jsou bez statisticky detekovaných významných rozdílů mezi skupinami, tedy metodami ošetření. Vliv způsobu ošetření před

subkultivací na růst sporulujících bakterií v log KTJ/g stolice je znázorněn krabicovými grafy v obrázku č. 4.



Obrázek č. 4 – Krabicové grafy znázorňující vliv způsobu ošetření před subkultivací na růst sporulujících bakterií v log KTJ/g stolice.

## 6 Diskuze

Lidské tělo, především jeho sliznice, je kolonizováno významným množstvím mikroorganismů, utvářejících na jednotlivých stanovištích rozmanité komunity. Komplex těchto mikroorganismů je souhrnně nazýván jako mikrobiota (Ignacio et al. 2019). Nej hustěji osídlené je tlusté střevo, ve kterém se nachází přibližně tři čtvrtiny všech mikroorganismů, jejichž celkový počet se odhaduje na  $10^{14}$  buněk (Sekirov et al. 2010). Dle Brown et al. (2016) je 50-60 % bakteriálních druhů střevní mikrobioty, což činí přibližně 30 % celkové střevní komunity, obdařeno schopností vytvářet odolné spory, které jsou určené především k jejich přenosu mezi různými hostiteli (Brown et al. 2016).

Ke kolonizaci střev sporujícími bakteriemi dochází již během prvního týdne života novorozence. Stark & Lee (1982) izolovali ze vzorků stolice odebraných během prvního týdne věku dítěte převážně klostridie druhu *C. paraputrificum*, *C. difficile* a *C. butyricum*. Ze vzorků stolice, které byly následně odebrány po celý první rok života, docházelo s největší frekvencí k identifikaci druhů *C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *C. ramosum*, *C. butyricum* a *Clostridium sartagoforme* (Stark & Lee 1982). Výsledky výzkumné části této práce se s výsledky dané studie shodují, nicméně se zde nepodařilo identifikovat *C. sartagoforme*, ale naopak se mezi nejčastěji identifikované bakterie řadila *C. tertium*. Klostridie, jako stálí kolonizátoři střev dítěte během prvního roku života, jsou spojeny s podáváním kojenecké výživy, zatímco u dětí kojených výhradně mateřským mlékem jejich kolonizace s věkem postupně slábe (Stark & Lee 1982). Právě zvýšený výskyt druhů *C. butyricum*, *C. paraputrificum*, *C. difficile* a *C. tertium* je spojován s umělou kojeneckou výživou (Tonooka et al. 2005). Vyšší zastoupení klostridií ve střevní mikrobiotě u kojenců krmenými kojeneckou formulou rovněž zaznamenal Harmsen et al. (2000), jenž pozoroval vývoj střevní mikrobioty novorozenců v průběhu prvních tří týdnů po jejich narození (Harmsen et al. 2000). Vzorky stolice použité pro účely praktické části této práce byly odebrány od kojence, jenž byl částečně kojen mateřským mlékem přímo z prsu a současně přikrmován kojeneckou výživou po celou dobu dvanácti měsíců od narození. Bylo pozorováno, že již relativně malé množství kojenecké formuly podávané kojenci krmenému převážně mateřským mlékem může mít za následek posun ve složení střevní mikrobioty směrem k typu mikrobioty charakteristické pro děti krmené umělou dětskou výživou (O'Sullivan et al. 2015). Již dle Bullen et al. (1977) dochází u kojenců, kteří byli krmeni kojeneckou výživou či kombinovaně formulou a mateřským mlékem, během prvních šesti týdnů ke zvýšení zastoupení třídy Clostridia. Oproti tomu u dětí kojených výhradně mateřským mlékem nebyla přítomnost zástupců této třídy během prvních šesti týdnů zaznamenána vůbec či pouze na nízké úrovni (Bullen et al. 1977). Ve studii od Penders et al. (2006) byl zaznamenán posun ve složení střevní mikrobioty u kojenců krmených kombinovanou formou ve věku jednoho měsíce do podoby střevní mikrobioty kojenců krmených výhradně kojeneckou formulou. Hlavní posun byl pozorován především ve zvýšení zastoupení bakteriálních druhů *C. difficile*, *Escherichia coli* a zástupců skupiny *Bacteroidetes fragilis* (Penders et al. 2006). Podobnost mezi složením střevní mikrobioty kojenců krmených kombinovanou formou a těmi výhradně krmenými kojeneckou výživou byl zaznamenán rovněž ve studii od Forbes et al. (2018). Nicméně vliv kombinovaného krmení na kojeneckou střevní mikrobiotu je doposud málo prozkoumanou oblastí, která by si zasloužila více pozornosti.



Přítomnost klostridií v kojenecké střevní mikrobiotě může vykazovat pozitivní i negativní vliv na zdraví jedince, který se odvíjí od druhu dané klostridie či jejím početním zastoupením. Komenzální druhy klostridií jsou prospěšné především svým přímým působením na imunitní systém, skrze jejich podporu vývoje intraepiteliálních T lymfocytů a buněk podporujících produkci imunoglobulinu A, které hrají důležitou roli při vzniku odpovídající imunologické reakce. Zároveň klostridie, především zástupci klostridiálních klastřů XIVa a IV, vykazují vliv na akumulaci a správnou funkci regulačních T buněk, jež jsou důležité pro udržování střevní homeostázy (Lopetuso et al. 2013). Zástupci klostridiálních klastřů XIVa a IV jsou zároveň významnými producenty butyrátu, jež slouží jako hlavní zdroj energie kolonocyty, hraje důležitou roli při modulaci imunitní a zánětlivé reakce, podporuje produkci hlenu střevní sliznicí a působí jako antioxidant (Leonel & Alavarez-Leite 2012). Mezi klostridie s probiotickým efektem, jež se podařilo ze vzorků stolice identifikovat, se řadí především *C. butyricum*, která byla nepravidelně přítomna ve vzorcích od 1. do 5. měsíce věku kojence. *C. butyricum* se využívá jako probiotikum a zároveň je zkoumána pro svůj potenciálně prospěšný účinek v prevenci a zlepšení průběhu některých onemocnění, jimiž jsou například syndrom dráždivého tračníku, chronické záněty tlustého střeva, neurodegenerativní a metabolická onemocnění a kolorektální karcinom (Stoeva et al. 2021). Nicméně u novorozenců je tento druh bakterie zkoumán spíše pro svou roli patogenu majícího vliv na vznik nekrotizující enterokolitidy u předčasně narozených jedinců. Hosny et al. (2019) ve své studii zaznamenal významně větší četnost *C. butyricum* ve vzorcích stolice předčasně narozených novorozenců oproti vzorkům kontrolním a potvrdil tak roli *C. butyricum* jako potenciálního patogenu (Hosny et al. 2019). *C. butyricum* typu E může rovněž produkovat botulinu podobný neurotoxin vyvolávající onemocnění potravinový a kojenecký botulismus (Fenicia et al. 1999).

Na druhé straně jsou bakterie *C. paraputrificum*, *C. perfringens* a *C. tertium*, jejichž přítomnost byla ve stolici kojence zaznamenávána se značnou pravidelností po celou dobu dvanácti měsíců, *C. difficile*, jež byla v menších počtech identifikována ve vzorcích z prvních sedmi měsíců a *C. ramosum*, která byla ve vzorcích přítomná až od 6. měsíce života dítěte, spojovány převážně s negativními účinky, jak na zdraví kojenců, tak i dospělých lidí. Infekce *C. perfringens* může být jedním z faktorů vyvolávajících nekrotizující enterokolitidu u předčasně narozených dětí (Sim et al. 2015), s jejímž propuknutím jsou rovněž spojovány *C. tertium* a *C. paraputrificum* (Kiu et al. 2017). Dominantní zastoupení *C. perfringens* ve vzorku reprezentujícího první dva měsíce života kojence lze spojit s možnou počáteční kolonizací, ke které mohlo dojít během pobytu kojence v nemocnici, což bývá typické pro děti porozené císařským řezem (Ferraris et al. 2012). Mimoto se kojeneček v daném období potýkal s kolikami. Kolonizace *C. difficile* je u dospělých lidí spojována především s nozokomiálními infekcemi (Kochan et al. 2018), nicméně u dětí do věku 12 až 24 měsíců bývá mohutnější osídlení tímto druhem bakterií asymptomatické. Dle Jangi and Lamont (2010) je střevo kojence odolné vůči účinkům toxinů A a B produkovaných *C. difficile*. Důvodem by mohla být nedostatečná exprese genů pro receptory vázající oba či jeden z toxinů ve střevech dítěte, případně by s asymptomatickým průběhem mohlo souviset složení kojenecké střevní mikrobioty (Jangi and Lamont 2010). Dle Kociólek et al. (2020) je zodpovědná humorální imunitní reakce proti toxinům A a B (Kociólek et al. 2020). *C. ramosum* byla v několika případech identifikována u klostridiální bakterémie a jiných bakteriálních infekcí, nicméně s onemocněním člověka je spojována zřídka (Legaria et al. 2020).

Ze vzorku odebraného během 5. měsíce života kojence se rovněž podařilo izolovat bakterii *Paeniclostridium sordellii*, jenž byla dříve klasifikována jako *Clostridium sordellii*. Tento druh bakterie se podobně jako u *C. jeddahense* podařilo identifikovat pouze v jednom měsíci reprezentujícím vzorku stolice. *P. sordellii* je nebezpečným patogenem lidí, ale zároveň také zvířat, kdy se vyskytuje například u koní (Nyaoke et al. 2020) a psů (Capewell et al. 2020). Je možné, že právě styk se zvířetem jako je pes, měl za následek přítomnost *P. sordellii* ve vzorku stolice námi sledovaného kojence.

Klostridie byly identifikovány ze vzorků stolic ošetřených třemi různými metodami, jež byly použity nezávisle na sobě. Při celkovém porovnání ošetřujících metod z hlediska celkového počtu mikroorganismů, diverzity a četnosti identifikovaných klostridií se jeví jako nejkompexnější metoda využívající 70% ethanol, ve kterém byl vzorek ponechán po dobu 4 hodin. 70% ethanol byl rovněž použit ve studii od Brown et al. (2016), kde ošetření ethanolem zásadně změnilo kompozici kultivovatelných bakterií a v porovnání se vzorky, u nichž k ošetření ethanolem nedošlo, došlo u ošetřených vzorků k obohacení o ethanol rezistentní druhy bakterií, což umožnilo jejich snadnější izolaci (Brown et al. 2016). Ošetření vzorků stolice 70% ethanolem za účelem jejich obohacení o sporulující bakterie bylo rovněž využito ve studii od Avershina et al. (2020).

Metody využívající tepelné ošetření vykazovaly v některých ohledech mírné nedostatky. V případě metody využívající ošetření vzorku stolice teplotou 60 °C po dobu 60 minut, docházelo zřejmě k nedostatečné eliminaci nesporelujících bakterií, jejichž následná přítomnost znesnadňovala či neumožňovala izolaci sporulujících bakterií. Mezi bakterie, které přežily tuto ošetřující metodu, patřily některé druhy laktobacilů, streptokoků, enterokoků a ruminokoků. Studie dle Appert et al. (2020) využívala rovněž k obohacení sporulujících bakterií tepelný stres, konkrétně 80 °C po dobu 20 min. Rovněž zde byla zaznamenána vysoká míra enterokoků, která byla zdůvodněna jejich schopností odolávat tepelnému stresu skrze mnohé regulační systémy a díky fekální matici, která jim mohla poskytnout dodatečnou ochranu (Appert et al. 2020). Metoda využívající teploty ošetření 80 °C po dobu dvaceti minut se zdála být v našem testování vzhledem čtým nulovým detekcím nárůstu kolonií, především u vzorků se subkultivací, nadměrně stresující. V tomto případě by mohla pomoci kultivace vzorků v přítomnosti taurocholátu sodného, který by podpořil vyklíčení endospor (Appert et al. 2020). Nicméně pouze u vzorků ošetřených touto metodou se podařilo identifikovat *C. jeddahense*, jejíž přítomnost se ve vzorcích ošetřených jinou metodou neprokázala. Je však důležité mít na paměti, že výběr kolonií k izolaci je čistě závislý na úsudku laboratorního pracovníka, který kolonie izoluje na základě jejich rozdílných charakteristik.

Z hlediska izolace DNA sporulujících bakterií přímo ze vzorků stolice a její následné identifikace se jako efektivnější jeví metoda nevyužívající kultivaci, která byla použita ve studii Avershina et al. (2020). Jedná se o metodu využívající dvoufázový purifikační proces, kdy jsou nejprve pomocí ethanolu zničeny vegetativní formy buněk a následně je jejich DNA eliminováno ethidium monoazidem. Rezistentní DNA je posléze charakterizováno pomocí sekvence genu pro 16S rRNA (Avershina et al. 2020). Na druhou stranu, díky metodě zahrnující kultivaci máme možnost získat čisté bakteriální izoláty, se kterými je nadále možno pracovat a nadále je charakterizovat. Podařilo se nám například izolovat čistou kulturu *Flavonifactor plautii*, o jejímž působení jako bakterie střevní mikrobioty člověka nebylo doposud mnoho zjištěno, nicméně dosavadní studie naznačují, že by *F. plautii* mohla vykazovat probiotické

účinky. Dle zjištění Ogita et al. (2020) by *F. plautii* mohla být v budoucnu využívána jako protialergicky působící probiotikum (Ogita et al. 2020) či jako podpůrné probiotikum při léčbě zánětlivých onemocnění střev dle Mikami et al. (2021).

## 7 Závěr

Primárním cílem této práce bylo analyzovat přítomnost endosporulujících bakterií, především klostridií, ve střevní mikrobiotě kojence a jejich výskyt uvést do souvislosti s vnitřními a vnějšími faktory, které mohly mít na kolonizaci vliv.

Hypotéza se do značné míry potvrdila. Je evidentní, že populace endosporulujících bakterií, jež byly převážně zastoupeny klostridiemi, se s rostoucím věkem dítěte stává rozmanitější. Ve vzorcích odebraných během 1. měsíce života kojence byly identifikovány pouze dva druhy klostridií, nicméně již během následujících dvou měsíců došlo k identifikaci dalších 4 klostridiálních druhů, přičemž tento trend trval až do 9. měsíce věku. Kolonizace *C. butyricum*, *C. difficile*, *C. tertium* a *C. paraputrificum* je zřejmě spojena s kojeneckou výživou, která byla společně mateřským mlékem kojenci podávána již od prvního měsíce narození. Zvýšený počet identifikací *C. perfringens* v prvních dvou měsících by mohl souviset s výskytem kolik, se kterými se v dané době kojenec potýkal. Od 6. měsíce života, kdy začal kojenec aktivně lézt, se ve vzorcích se značnou pravidelností objevovat *C. ramosum*.

Ošetřující metody obohacující vzorky stolice o ethanol a teple rezistentí bakterie se ukázaly být účinné. Niméně ve vzorcích stolice odebraných během 10. až 12. měsíce života kojence začaly i navzdory ošetření převažovat nesporulující bakterie, především laktobacili, enterokoky a streptokoky či druhy bakterií, které nebylo možné identifikovat. Zdokonalení dosavadních metod či hledání nových způsobů, jak efektivně izolovat sporulující bakterie, by mohlo být předmětem studií zajímavých se v budoucnu o podobnou problematiku.

## 8 Literatura

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine* **6** (e237) DOI: 10.1126/scitranslmed.3008599.
- Albenberg LG, Wu GD. 2014. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology* **146**(6):1564-1572.
- Alipour MJ, Jalanka J, Pessa-Morikawa T, Kokkonen T, Satokari R, Hynönen U, Iivanainen A, Niku M. 2018. The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific reports* **8**(1) (e10437) DOI: 10.1038/s41598-018-28733-y.
- Appert O, et al. 2020. Initial butyrate producers during infant gut microbiota development are endospore formers. *Environmental mikrobiology* **22**(9):3909-3921.
- Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. 2014. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in immunology* **5** (e427) DOI: 10.3389/fimmu.2014.00427.
- Arumugam M, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**(7346):174-180.
- Atarashi K, et al. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331**(6015):337-341.
- Avershina E, Larsen MG, Aspholm M, Lindback T, Storrø O, Øien T, Johnsen R, Rudi K. 2020. Culture dependent and independent analyses suggest a low level of sharing of endospore-forming species between mothers and their children. *Scientific Reports* **10** (1) (e1832) DOI: 10.1038/s41598-020-58858-y.
- Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EM. 2013. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterology & Motility* **25**(1):4-15.
- Ballard O, Morrow AL. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America* **60**(1):49-74.
- Bergström A, Skov TH, Bahl MI, Roager HM, Christensen LB, Ejlerskov KT, Mølgaard C, Michaelsen KF, Licht TR. 2014. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Applied and environmental mikrobiology* **80**(9):2889-2900.
- Bertelsen RJ, Jensen ET, Ringel-Kulka T. 2016. Use of probiotics and prebiotics in infant feeding. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **30**(1):39-48.
- Bibbò S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrì F, Masucci L, Gasbarrini A, Cammarota G. 2016. The role of diet on gut microbiota composition. *European review for medical and pharmacological sciences* **20**(22):4742-4749.

- Boudry G, Charton E, Le Huerou-Luron I, Ferret-Bernard S, Le Gall S, Even S, Blat S. 2021. The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota. *Frontiers in Nutrition* 8 (e629740) DOI: 10.3389/fnut.2021.629740.
- Browne HP, Forster SC, Anonye BO, Kumar N, Neville BA, Stares MD, Goulding D, Lawley TD. 2016. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* **533**(7604):543-546.
- Bullen CL, Tearle PV, Stewart MG. 1977. The effect of "humanised" milks and supplemented breast feeding on the faecal flora of infants. *Journal of medical microbiology* **10**(4):403-413.
- Cantu-Jungles TM, Rasmussen HE, Hamaker BR. 2019. Potential of Prebiotic Butyrogenic Fibers in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neurology* 10 (e663).
- Capewell P, Rupp A, Fuentes M, McDonald M, Weir W. 2020. Fatal *Clostridium sordellii*-mediated hemorrhagic and necrotizing gastroenteropathy in a dog: case report. *BMC Veterinary Research* 2020 **16**(1) (e152) DOI: 10.1186/s12917-020-02362-y.
- Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports* 6 (e23129) DOI: 10.1038/srep23129.
- Costea PI, et al. 2018. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature Microbiology* 2018 **3**(1):8-16.
- Cutting SM. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* **28**(2):214-220.
- Le Doare K, Holder B, Bassett A, Pannaraj PS. 2018. Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Frontiers in Immunology* 9 (e361) DOI: 10.3389/fimmu.2018.00361.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(26):11971-11975.
- Donovan SM, Comstock SS. 2016. Human Milk Oligosaccharides Influence Neonatal Mucosal and Systemic Immunity. *Annals of Nutrition and Metabolism* **69**(2):42-51.
- Dürre P. 2007. Clostridia. *Encyclopedia of Life Sciences* DOI: 10.1002/9780470015902.a0020370.
- Dürre P. 2014. Physiology and Sporulation in *Clostridium*. *Microbiology Spectrum* **2**(4):TBS-0010-2012.
- Egan M, Dempsey E, Ryan CA, Ross RP, Stanton C. 2021. The Sporobiota of the Human Gut. *Gut Microbes* **13**(1):1-17.
- Fakhry S, Sorrentini I, Ricca E, De Felice M, Baccigalupi L. 2008. Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* **105**(6):2178-2186.

- Fallani M, et al. 2011. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology* **157**(5):1385-1392.
- Fan C, Zhang L, Fu H, Liu C, Li W, Cheng Q, Zhang H, Jia S, Zhang Y. 2020. Enterotypes of the Gut Microbial Community and Their Response to Plant Secondary Compounds in Plateau Pikas. *Microorganisms* **8**(9) (e1311) DOI: 10.3390/microorganisms8091311.
- Fenicia L, Franciosa G, Pourshaban M, Aureli P. 1999. Intestinal toxemia botulism in two young people, caused by *Clostridium butyricum* type E. *Clinical Infectious Diseases* **29**(6):1381-1387.
- Fernández L, Rodríguez JM. 2020. Human Milk Microbiota: Origin and Potential Uses. Nestle Nutrition Institute workshop series **94**:75-85.
- Ferraris L, Butel MJ, Campeotto F, Vodovar M, Rozé JC, Aires J. 2012. Clostridia in premature neonates' gut: incidence, antibiotic susceptibility, and perinatal determinants influencing colonization. *PLoS One*. **7**(1) (e30594) DOI: 10.1371/journal.pone.0030594.
- Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **9**(10):577-589.
- Forbes JD, et al. 2018. Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) Study Investigators. Association of Exposure to Formula in the Hospital and Subsequent Infant Feeding Practices With Gut Microbiota and Risk of Overweight in the First Year of Life. *JAMA Pediatrics* **172**(7) (e181161) DOI: 10.1001/jamapediatrics.2018.1161.
- Fouhy F, Watkins C, Hill CJ, O'Shea CA, Nagle B, Dempsey EM, O'Toole PW, Ross RP, Ryan CA, Stanton C. 2019. Perinatal factors affect the gut microbiota up to four years after birth. *Nature Communications* **10**(1) (e1517) DOI: 10.1038/s41467-019-09252-4.
- Fu X, Liu Z, Zhu C, Mou H, Kong Q. 2019. Nondigestible carbohydrates, butyrate, and butyrate-producing bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**(1):130-152.
- Grześkowiak Ł, Collado MC, Mangani C, Maleta K, Laitinen K, Ashorn P, Isolauri E, Salminen S. 2012. Distinct gut microbiota in southeastern African and northern European infants *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **54**(6):812-816.
- Guo P, Zhang K, Ma X, He P. 2020. Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **11** (e24) DOI: 10.1186/s40104-019-0402-1.
- Hakansson A, Molin G. 2011. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*. **3**(6):637-682.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **30**(1):61-76.
- He Q, Kwok LY, Xi X, Zhong Z, Ma T, Xu H, Meng H, Zhao F, Zhang H. 2020. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal



- and vaginal microbiota. *Gut Microbes* **12**(1) (e1794266) DOI: 10.1080/19490976.2020.1794266.
- Heinlen L, Ballard JD. 2010. Clostridium difficile infection. *The American Journal of the Medical Sciences* 340(3):247-252.
- Henrick BM, Hutton AA, Palumbo MC, Casaburi G, Mitchell RD, Underwood MA, Smilowitz JT, Frese SA. 2018. Elevated Fecal pH Indicates a Profound Change in the Breastfed Infant Gut Microbiome Due to Reduction of Bifidobacterium over the Past Century. *MSphere*. **3**(2) (e00041-18) DOI: 10.1128/mSphere.
- Hosny M, Bou Khalil JY, Caputo A, Abdallah RA, Levasseur A, Colson P, Cassir N, La Scola B. 2019. Multidisciplinary evaluation of Clostridium butyricum clonality isolated from preterm neonates with necrotizing enterocolitis in South France between 2009 and 2017. *Scientific Reports* **9**(1) (e2077) DOI: 10.1038/s41598-019-38773-7.
- Hu J, Nomura Y, Bashir A, Fernandez-Hernandez H, Itzkowitz S, Pei Z, Stone J, Loudon H, Peter I. 2013. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PLoS One* **8**(11) (e78257) DOI: 10.1371/journal.pone.0078257.
- Chen P. 2020. Introduction. Pages 1-10 in Chen P, editor. *Gut Microbiota and Pathogenesis of Organ Injury*. Springer Nature, Singapore.
- Chichlowski M, Shah N, Wampler JL, Wu SS, Vanderhoof JA. 2020. Bifidobacterium longum Subspecies infantis (B. infantis) in Pediatric Nutrition: Current State of Knowledge. *Nutrients* **12**(6) (e1581) DOI: 10.3390/nu12061581.
- Ignacio A, Terra FF, Watanabe IKM, Basso PJ, Câmara NOS. 2019. Role of the Microbiome in Intestinal Barrier Function and Immune Defense. Pages 127-138 in Faintuch J, Faintuch S, editors. *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications*. Elsevier.
- Ishiguro E, Haskey N, Campbell K. 2018. An Overview of the Human Microbiome. Pages 1-16 in Ishiguro E, Haskey N, Campbell K, editors. *Gut Microbiota*. Elsevier.
- Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Björkstén B, Engstrand L, Andersson AF. 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* **63**(4):559-566.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology* **21**(29):8787-8803.
- Jangi S, Lamont JT. 2010. Asymptomatic colonization by Clostridium difficile in infants: implications for disease in later life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**(1):2-7.
- Kearney SM, Gibbons SM, Poyet M, Gurry T, Bullock K, Allegretti JR, Clish CB, Alm EJ. 2018. Endospores and other lysis-resistant bacteria comprise a widely shared core community within the human microbiota. *The ISME journal* **12**(10):2403-2416.



- Kim H, Sitarik AR, Woodcroft K, Johnson CC, Zoratti E. 2019. Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children. *Current allergy and asthma reports* **19**(4) (e22). DOI: 10.1007/s11882-019-0851-9.
- Kiu R, Hall LJ. 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging microbes & infections* **7**(1) (e141) DOI: 10.1038/s41426-018-0144-8.
- Kiu R, Caim S, Alcon-Giner C, Belteki G, Clarke P, Pickard D, Dougan G, Hall LJ. 2017. Preterm Infant-Associated *Clostridium tertium*, *Clostridium cadaveris*, and *Clostridium paraputrificum* Strains: Genomic and Evolutionary Insights. *Genome biology and evolution* **9**(10):2707-2714.
- Kociolek LK, et al. 2020. Natural *Clostridioides difficile* Toxin Immunization in Colonized Infants. *Clinical infectious diseases* **70**(10):2095-2102.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(1):4578-4585.
- Kochan TJ, Foley MH, Shoshiev MS, Somers MJ, Carlson PE, Hanna PC. 2018. Updates to *Clostridium difficile* Spore Germination. *Journal of Bacteriology* **200**(16) (e00218-18) DOI: 10.1128/JB.00218-18.
- Korecka A, de Wouters T, Cultrone A, Lapaque N, Pettersson S, Doré J, Blottière HM, Arulampalam V. 2013. ANGPTL4 expression induced by butyrate and rosiglitazone in human intestinal epithelial cells utilizes independent pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **304**(11):G1025-G1037.
- Koren O, et al. 2012. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012 **150**(3):470-480.
- Korpela K, Blakstad EW, Moltu SJ, Strømme K, Nakstad B, Rønnestad AE, Brække K, Iversen PO, Drevon CA, de Vos W. 2018. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Scientific Reports* **8**(1) (e2453) DOI: 10.1038/s41598-018-20827-x.
- Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and infection* **2**(2):189-198.
- Laursen MF, Zachariassen G, Bahl MI, Bergström A, Høst A, Michaelsen KF, Licht TR. 2015. Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. *BMC microbiology* **15** (e154) DOI: 10.1186/s12866-015-0477-6.
- Lee E, et al. 2016. Dynamics of Gut Microbiota According to the Delivery Mode in Healthy Korean Infants. *Allergy, asthma & immunology research* **8**(5):471-477.
- Legaria MC, García SD, Tudanca V, Barberis C, Cipolla L, Cornet L, Famiglietti AMR, Stecher D, Vay CA. 2020. *Clostridium ramosum* rapidly identified by MALDI-TOF MS. A rare

- gram-variable agent of bacteraemia. *Access Microbiology* **2**(8) (e000137) doi: 10.1099/acmi.0.000137.
- Lemaire M, Le Huërrou-Luron I, Blat S. 2018. Effects of infant formula composition on long-term metabolic health. *Journal of developmental origins of health and disease* Dec;**9**(6):573-589.
- Leonel AJ, Alvarez-Leite JJ. 2012. Butyrate: implications for intestinal function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **15**(5):474-479.
- Loo YT, Howell K, Chan M, Zhang P, Ng K. 2020. Modulation of the human gut microbiota by phenolics and phenolic fiber-rich foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety* **19**(4):1268-1298.
- Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens* **5**(1) (e23) DOI: 10.1186/1757-4749-5-23.
- Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. 2020. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients*. **12**(4) (e1039) DOI: 10.3390/nu12041039.
- Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF. 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in mikrobiology* **21**(4):167-173.
- Meehan CJ, Beiko RG. 2014. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome biology and evolution* **6**(3):703-713.
- Mathé BA, et al. 2012. A framework for human microbiome research. *Nature* **486**(7402):215-221.
- Mikami A, Ogita T, Namai F, Shigemori S, Sato T, Shimosato T. 2021. Oral Administration of Flavonifractor plautii, a Bacteria Increased With Green Tea Consumption, Promotes Recovery From Acute Colitis in Mice via Suppression of IL-17. *Frontiers in nutrition* **7** (e610946) DOI: 10.3389/fnut.2020.610946.
- Milani C, et al. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81**(4) (e00036-17) DOI: 10.1128/MMBR.00036-17.
- Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS. 2005. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *The Journal of nutrition* **135**(5):1304-1307.
- Munyaka PM, Khafipour E, Ghia JE. 2014. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Frontiers in pediatrics* **2** (e109) DOI: 10.3389/fped.2014.00109.
- Nagano Y, Itoh K, Honda K. 2012. The induction of Treg cells by gut-indigenous Clostridium. *Current opinion in immunology* **24**(4):392-397.

- Nyaoke AC, Navarro MA, Fresneda K, Diab SS, Moore J, Lyras D, Awad M, Uzal FA. 2020. Paeniclostridium (Clostridium) sordellii-associated enterocolitis in 7 horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **32**(2):239-245.
- O'Sullivan A, Farver M, Smilowitz JT. 2015. The Influence of Early Infant-Feeding Practices on the Intestinal Microbiome and Body Composition in Infants. *Nutrition and Metabolic Insights* 8(S1):1-9. doi: 10.4137/NMI.S29530.
- Ogita T, Yamamoto Y, Mikami A, Shigemori S, Sato T, Shimosato T. 2020. Oral Administration of Flavonifractor plautii Strongly Suppresses Th2 Immune Responses in Mice. *Frontiers in immunology* 11 (e379) DOI: 10.3389/fimmu.2020.00379.
- Ohtani K, Shimizu T. 2016. Regulation of Toxin Production in Clostridium perfringens. *Toxins (Basel)*. **8**(7) (e207) DOI: 10.3390/toxins8070207.
- Parker A, Fonseca S, Carding SR. 2020. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes* **11**(2):135-157.
- Peck MW, Stringer SC, Carter AT. 2011. Clostridium botulinum in the post-genomic era. *Food Microbiology* **28**(2):183-191.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**(2):511-521.
- Rehbinder EM, Lødrup Carlsen KC, Staff AC, Angell IL, Landrø L, Hilde K, Gaustad P, Rudi K. 2018. Is amniotic fluid of women with uncomplicated term pregnancies free of bacteria? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **219**(3) (289.e1-289.e12) DOI: 10.1016/j.ajog.2018.05.028.
- Rodríguez JM, et al. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease* 26 (e26050) DOI: 10.3402/mehd.v26.26050.
- Rogers SL, Blissett J. 2019. Infant temperament, maternal feeding behaviours and the timing of solid food introduction. *Maternal & child nutrition* **15**(3) (e12771) DOI: 10.1111/mcn.12771.
- Romero R, et al. 2015. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine* **28**(12):1394-409.
- Salminen S, Stahl B, Vinderola G, Szajewska H. 2020. Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives. *Nutrients* **12**(7) (e1952) DOI: 10.3390/nu12071952.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews* **90**(3):859-904.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology* **14**(8) (e1002533) DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533.

- O Sheridan P, Martin JC, Lawley TD, Browne HP, Harris HMB, Bernalier-Donadille A, Duncan SH, O'Toole PW, P Scott K, J Flint H. 2016. Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. *Microbial genomics* **2**(2) (e000043) DOI: 10.1099/mgen.0.000043.
- Sim K, et al. 2015. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clinical infectious diseases* **60**(3):389-397.
- Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL. 2014. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annual review of nutrition* **34**:143-169.
- Stark PL, Lee A. 1982. Clostridia isolated from the feces of infants during the first year of life. *The Journal of pediatrics* **100**(3):362-365.
- Stoeva MK, Garcia-So J, Justice N, Myers J, Tyagi S, Nemchek M, McMurdie PJ, Kolterman O, Eid J. 2021. Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease. *Gut Microbes* **13**(1):1-28.
- Tetz G, Tetz V. 2017. Introducing the sporobiota and sporobiome. *Gut pathogens* **9** (e38) DOI: 10.1186/s13099-017-0187-8.
- Tchirikov M, Schlabritz-Loutsevitch N, Maher J, Buchmann J, Naberezhnev Y, Winarno AS, Seliger G. 2018. Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome. *Journal of perinatal medicine* **46**(5):465-488.
- Tonooka T, Sakata S, Kitahara M, Hanai M, Ishizeki S, Takada M, Sakamoto M, Benno Y. 2005. Detection and quantification of four species of the genus *Clostridium* in infant feces. *Microbiology and immunology* **49**(11):987-992.
- Turrone F, et al. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One*. **7**(5) (e36957) DOI: 10.1371/journal.pone.0036957.
- Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. 2012. Defining the human microbiome. *Nutrition reviews* 2012 **70**(1):S38-44.
- Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M. 2020. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* **8**(4) (e573) DOI: 10.3390/microorganisms8040573.
- Ventura M, O'Flaherty S, Claesson MJ, Turrone F, Klaenhammer TR, van Sinderen D, O'Toole PW. 2009. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nature Reviews Microbiology* **7**(1):61-71.
- Voreades N, Kozil A, Weir TL. 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in microbiology* **5** (e494) DOI: 10.3389/fmicb.2014.00494.
- Walani SR. 2020. Global burden of preterm birth. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* **150**(1):31-33.

- Wang F, Roy S. 2017. Gut Homeostasis, Microbial Dysbiosis, and Opioids. *Toxicologic pathology* **45**(1):150-156.
- Wang S, Ryan CA, Boyaval P, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. 2020. Maternal Vertical Transmission Affecting Early-life Microbiota Development. *Trends in mikrobiology* **28**(1):28-45.
- Wiciński M, Sawicka E, Gębalski J, Kubiak K, Malinowski B. 2020. Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. *Nutrients* **12**(1) (e266) DOI: 10.3390/nu12010266.
- Wu GD, et al. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**(6052):105-108.
- Yang L, Sakandar HA, Sun Z, Zhang H. 2021. Recent advances of intestinal microbiota transmission from mother to infant. *Journal of Functional Foods* 87 (e104719) DOI: 10.1016/j.jff.2021.104719.
- Zeng H, Ishaq SL, Zhao FQ, Wright AG. 2016. Colonic inflammation accompanies an increase of  $\beta$ -catenin signaling and Lachnospiraceae/Streptococcaceae bacteria in the hind gut of high-fat diet-fed mice. *The Journal of nutritional biochemistry* **35**:30-36.
- Zhang C, Li L, Jin B, Xu X, Zuo X, Li Y, Li Z. 2021. The Effects of Delivery Mode on the Gut Microbiota and Health: State of Art. *Frontiers in microbiology* 12 (e724449) DOI: 10.3389/fmicb.2021.724449.

## 9 Samostatné přílohy

CELKOVÉ POČTY MIKROORGANISMŮ [log KTJ/g]												
KULTIVACE	PŘÍMÁ KULTIVACE						SUBKULTIVACE					
MÉDIUM	WSP			BHI			WSP			BHI		
METODA OŠETŘENÍ	60 °C	80 °C	EtOH	60 °C	80 °C	EtOH	60 °C	80 °C	EtOH	60 °C	80 °C	EtOH
1.	9,75	8,10	7,88	7,49	7,99	7,86	-	-	-	-	-	-
2.	6,55	6,99	7,50	8,07	7,94	7,69	12,86	10,61	12,89	12,54	13,00	12,65
3.	6,92	4,69	7,09	6,65	8,39	7,79	10,66	nd	10,10	10,55	nd	9,26
4.	7,66	7,96	7,56	6,03	6,90	6,14	11,27	nd	7,16	11,61	nd	nd
5.	7,87	7,54	6,50	7,80	7,72	7,60	11,07	13,04	11,21	11,24	11,13	11,99
6.	7,48	7,18	7,60	7,59	8,06	7,47	12,12	nd	8,27	10,19	nd	6,97
7.	6,32	4,92	6,12	7,83	7,89	7,76	12,80	nd	9,16	12,66	nd	9,71
8.	5,75	nd	5,24	6,45	nd	5,32	12,83	9,15	13,00	12,72	nd	11,58
9.	6,42	6,95	7,93	6,61	6,73	6,76	12,63	12,81	9,23	11,08	10,42	nd
10.	5,46	4,12	7,02	5,99	nd	5,14	13,05	nd	12,04	11,25	nd	11,56
11.	5,78	6,83	6,66	6,43	7,07	8,13	11,29	10,51	9,42	11,45	10,55	9,95
12.	5,32	6,09	5,09	7,98	6,21	7,04	12,81	nd	13,00	12,95	nd	13,02

Příloha č 1. – Celkové počty mikroorganismů. U vzorků se subkultivací, jež byly odebrány během 1. měsíce života, chybí data.